

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-523724

(P2005-523724A)

(43) 公表日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 1/16	C O 7 K 1/16		4 B O 6 4
C O 7 K 1/30	C O 7 K 1/30		4 B O 6 5
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47		4 H O 4 5
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18		
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 74 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-501610 (P2004-501610)	(71) 出願人	501153452
(86) (22) 出願日	平成15年5月1日(2003.5.1)		プロシオン バイオフィーマ インク.
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月28日(2004.12.28)		カナダ国 H 9 P 1 H 7 ケベック州
(86) 国際出願番号	PCT/CA2003/000639		ドルバル トランス-カナダ ハイウエイ
(87) 国際公開番号	W02003/093474		1 6 5 0
(87) 国際公開日	平成15年11月13日(2003.11.13)	(74) 代理人	100064908
(31) 優先権主張番号	2,380,662		弁理士 志賀 正武
(32) 優先日	平成14年5月1日(2002.5.1)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	カナダ(CA)		弁理士 渡邊 隆
(31) 優先権主張番号	2,391,438	(74) 代理人	100108453
(32) 優先日	平成14年6月25日(2002.6.25)		弁理士 村山 靖彦
(33) 優先権主張国	カナダ(CA)	(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P S P 9 4 結合タンパク質および P S P 9 4 診断分析

(57) 【要約】

血清中で、P S P 9 4 は、遊離型として存在する、または、担体タンパク質と会合している。結合型の P S P 9 4 は、前立腺癌患者の血中で定量化され、これらの測定値は、予後の評価時に有用性を示す。本発明は、P S P 9 4 が結合する担体タンパク質 (P S P 9 4 結合タンパク質と称される)、その精製方法、その核酸およびアミノ酸配列を同定し、P S P 9 4 関連疾患の診断および予後におけるこれらの配列の使用に関する。より特には、本発明は、前立腺癌および良性の前立腺肥大など、異常もしくは上昇した P S P 9 4 レベルに関連した状態の評価に有用な試薬だけでなく、改善された診断および予後分析を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 配列番号 1 に記載のポリヌクレオチド、
 - b) 配列番号 6 に記載のポリヌクレオチド、
 - c) 配列番号 6 の配列 1 から 1 3 9 2 を有するポリヌクレオチド、
 - d) 配列番号 6 の配列 1 から 1 6 5 3 を有するポリヌクレオチド、
 - e) 配列番号 1 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 1 0 塩基の連続部分に順に一致する 1 0 から 2 0 0 5 塩基長の間のサイズのポリヌクレオチド、および、
 - f) 配列番号 6 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 1 0 塩基の連続部分に順に一致する 1 0 から 1 8 7 6 塩基長の間のサイズのポリヌクレオチド、
- からなる群から選択されるメンバーを含むポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 1 に記載のものである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 6 に記載のものである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 6 の配列 1 から 1 3 9 2 を有する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 6 の配列 1 から 1 6 5 3 を有する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドが、ポリリボヌクレオチド、ポリデオキシリボヌクレオチド、修飾ポリリボヌクレオチド、修飾ポリデオキシリボヌクレオチド、および相補的ポリヌクレオチドからなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

- a) 配列番号 2 に記載のポリペプチド、
 - b) 配列番号 3 に記載のポリペプチド、
 - c) 配列番号 7 に記載のポリペプチド、
 - d) 配列番号 8 に記載のポリペプチド、
 - e) 配列番号 9 に記載のポリペプチド、
 - f) 配列番号 2 の同じサイズの連続部分に一致する 1 0 から 5 0 5 のサイズのアミノ酸長のポリペプチド、
 - g) 配列番号 3 の同じサイズの連続部分に一致する 1 0 から 5 9 2 のサイズのアミノ酸長のポリペプチド、
 - h) 配列番号 7 の同じサイズの連続部分に一致する 1 0 から 6 2 4 のサイズのアミノ酸長のポリペプチド、
 - i) 配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、または、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列に一致する少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、
 - j) 配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、または、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列に一致する少なくとも 7 0 % のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、
 - k) 配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、または、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列に一致する少なくとも 5 0 % のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、
 - l) - 配列番号 2 の、1 0 から 5 0 5 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、
 - 配列番号 3 の、1 0 から 5 9 2 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、または、
 - 配列番号 7 の、1 0 から 6 2 4 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、
- のアミノ酸配列に一致する少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

30

40

50

m) - 配列番号 2 の、10 から 505 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、
 - 配列番号 3 の 10 から 592 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、または、
 - 配列番号 7 の、10 から 624 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、
 のアミノ酸配列に一致する少なくとも 70% のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

n) - 配列番号 2 の、10 から 505 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、
 - 配列番号 3 の、10 から 592 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、または、
 - 配列番号 7 の、10 から 624 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、
 のアミノ酸配列に一致する少なくとも 50% のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

10

からなる群から選択される単離ポリペプチド。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 に記載のものである請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 に記載のものである請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、配列番号 7 に記載のものである請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記ポリペプチドが、配列番号 8 に記載のものである請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

前記ポリペプチドが、配列番号 9 に記載のものである請求項 7 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 13】

a) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、および、

b) 希釈剤または緩衝剤、

を含む免疫化組成物。

【請求項 14】

更にアジュバントを含む、請求項 13 に記載の免疫化組成物。

【請求項 15】

更に、PSP94、PSP94 変異体、PSP94 断片、PSP94 をコードするポリヌクレオチド、PSP94 変異体をコードするポリヌクレオチド、PSP94 断片をコードするポリヌクレオチド、およびその組み合わせを含む、請求項 14 に記載の免疫化組成物。

30

【請求項 16】

a) 請求項 7 に記載のポリペプチド、および、

b) 希釈剤または緩衝剤、

を含む免疫化組成物。

【請求項 17】

更にアジュバントを含む、請求項 16 に記載の免疫化組成物。

【請求項 18】

更に、PSP94、PSP94 変異体、PSP94 断片、PSP94 をコードするポリヌクレオチド、PSP94 変異体をコードするポリヌクレオチド、PSP94 断片をコードするポリヌクレオチド、およびその組み合わせを含む、請求項 16 に記載の免疫化組成物。

40

【請求項 19】

哺乳動物に、請求項 15 に記載の免疫化組成物を投与することを含む、ポリペプチドに対する抗体を生産する方法。

【請求項 20】

哺乳動物に、請求項 18 に記載の免疫化組成物を投与することを含む、ポリペプチドに対する抗体を生産する方法。

【請求項 21】

50

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも一つを組み込んでいる細胞。

【請求項 2 2】

請求項 7 に記載のポリペプチドの少なくとも一つを組み込んでいる細胞。

【請求項 2 3】

請求項 7 に記載のポリペプチドの少なくとも一つを発現している細胞。

【請求項 2 4】

P S P 9 4 または P S P 9 4 結合タンパク質の増大したレベルと関連した状態の診断または予後における、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項 2 5】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 に記載のものである、請求項 2 4 に記載の使用。 10

【請求項 2 6】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 6 に記載のものである、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 7】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 6 の配列 1 から 1 3 9 2 を有する、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 8】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 6 の配列 1 から 1 6 5 3 を有する、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 9】

P S P 9 4 または P S P 9 4 結合タンパク質の増大したレベルに関連した状態の診断または予後における、請求項 7 に記載のポリペプチドの使用。 20

【請求項 3 0】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9 からなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の使用。

【請求項 3 1】

A T C C に特許寄託番号：P T A - 4 2 4 2 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、およびその抗原結合断片。

【請求項 3 2】

A T C C に特許寄託番号：P T A - 4 2 4 3 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、およびその抗原結合断片。 30

【請求項 3 3】

A T C C に特許寄託番号：P T A - 4 2 4 2 として寄託されたハイブリドーマ細胞系。

【請求項 3 4】

A T C C に特許寄託番号：P T A - 4 2 4 3 として寄託されたハイブリドーマ細胞系。

【請求項 3 5】

試料中における、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および、配列番号 9 からなる群から選択されるポリペプチド、またはその組み合わせの量を測定するための方法であって、前記試料を、前記ポリペプチドを認識することができる分子と接触させることを含む方法。

【請求項 3 6】

前記分子が、特許寄託番号 P T A - 4 2 4 2 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、特許寄託番号 P T A - 4 2 4 3 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される抗体である、請求項 3 5 の方法。 40

【請求項 3 7】

前記分子が、P S P 9 4 およびその類似体である、請求項 3 5 の方法。

【請求項 3 8】

さらに、前記分子によって、または、標識を担持する第二の分子によって、提供される、標識からのシグナルを検出することを含む、請求項 3 5 の方法。

【請求項 3 9】

試料に関して得られたシグナルを、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9 からなる群から選択される少なくとも一つのポリペプチド、または、その組み合わせの既知量を含む対照試料に関して得られたシグナルと比較する、請求項 38 の方法。

【請求項 40】

試料中における、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9、またはその組み合わせからなる群から選択される、PSP94 に結合していないポリペプチドの量を測定するための方法であって、

a) PSP94 と、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9 からなる群から選択されるいずれか一つのポリペプチドとによって形成される複合体を前記試料から除去すること、複合体不含試料を生成すること、および、

b) 配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9 からなる群から選択されるいずれか一つのポリペプチドを認識することができる抗体と、前記複合体不含試料を接触させること、を含む方法。

【請求項 41】

前記抗体が、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4242 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4243 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項 40 の方法。

【請求項 42】

さらに、前記抗体によって、または、標識を担持する第二の分子によって提供される、標識からのシグナルを検出することを含む、請求項 40 の方法。

【請求項 43】

試料に関して得られるシグナルを、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および、配列番号 9 からなる群から選択されるポリペプチドの既知量を含む対照試料に関して得られるシグナルと比較する、請求項 42 の方法。

【請求項 44】

ATCC に特許寄託番号 PTA - 4240 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4241 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4242 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4243 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される抗体の、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9、またはその組み合わせの量を評価するための使用。

【請求項 45】

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9 に記載のポリペプチド、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4240 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4241 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4242 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4243 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される分子の、PSP94 の量を評価するため、または、異常もしくは増大した PSP94 レベルに関連した状態の診断のための使用。

【請求項 46】

前記状態が、前立腺癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、卵巣癌、他の上皮分泌部の癌、および良性の前立腺肥大からなる群から選択される、請求項 45 に記載の使用。

【請求項 47】

10

20

30

40

50

第一部分と第二部分を含む抗体接合物であって、前記第一部分は、ATCCに特許寄託番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択され、前記第二部分は、薬剤、固形支持体、レポーター分子、レポーター分子を担持する基、キレート剤、アシル化剤、架橋剤、および標的基からなる群から選択される、抗体接合物。

【請求項48】

10

前記固形支持体が、炭水化物、リポソーム、脂質、コロイド状金、微粒子、マイクロカプセル、マイクロエマルジョン、およびアフィニティーカラムのマトリックスからなる群から選択される、請求項47の接合物。

【請求項49】

前記レポーター分子が、フルオロホア、クロモホア、染料、酵素、放射性分子、および結合/リガンド複合体分子からなる群から選択される、請求項47の接合物。

【請求項50】

前記薬剤が、毒素、薬、およびプロドラッグの群から選択される、請求項47の接合物。

【請求項51】

20

PSP94を認識することができる分子を有する容器を含む、PSP94の量を評価する際に用いるための、または、PSP94の異常もしくは増大したレベルに関連した状態の診断のための、キット。

【請求項52】

前記分子が、ATCCに特許寄託番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、請求項47

30

【請求項53】

前記分子が、配列番号2に記載のポリペプチド、配列番号3に記載のポリペプチド、配列番号7に記載のポリペプチド、配列番号8に記載のポリペプチド、および配列番号9に記載のポリペプチドからなる群から選択される、請求項51のキット。

【請求項54】

配列番号2に記載のポリペプチド、配列番号3に記載のポリペプチド、配列番号7に記載のポリペプチド、配列番号8に記載のポリペプチド、および配列番号9に記載のポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを認識することができる抗体を有する容器を更に含む、請求項53のキット。

40

【請求項55】

前記抗体が、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項54のキット。

【請求項56】

配列番号2に記載のポリペプチド、配列番号3に記載のポリペプチド、配列番号7に記載のポリペプチド、配列番号8に記載のポリペプチド、および配列番号9に記載のポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを調製するための方法であって、

a) 細胞による前記ポリペプチドの発現をもたらす条件下において、宿主細胞を、培養

50

すること、および、

b) 一つ以上の精製工程により、ポリペプチドを回収すること、を含む方法。

【請求項 57】

前記精製工程が、単独もしくは組み合わせて、硫酸アンモニウム沈降、サイズ除外クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーからなる群から選択される、請求項 56 の方法。

【請求項 58】

配列番号 2 に記載のポリペプチド、配列番号 3 に記載のポリペプチド、配列番号 7 に記載のポリペプチド、配列番号 8 に記載のポリペプチド、配列番号 9 に記載のポリペプチド、およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドを調製するための方法であって、

10

a) 前記ポリペプチドを含む一つ以上の生物試料を採取すること、および、

b) 一つ以上の精製工程により、ポリペプチドを回収すること、を含む方法。

【請求項 59】

前記精製工程が、単独もしくは組み合わせて、硫酸アンモニウム沈降、サイズ除外クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーからなる群から選択される、請求項 58 の方法。

【請求項 60】

20

前記精製工程が、

a) 硫酸アンモニウムを前記生物試料に加える工程、

b) イオン交換クロマトグラフィーを行なう工程、

c) P S P 9 4 接合アフィニーマトリックスを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行なう工程、

d) サイズ除外クロマトグラフィーを行なう工程、および

e) 実質的に純粋な P S P 9 4 結合タンパク質を含む画分を回収する工程、

を含む、請求項 58 の方法。

【請求項 61】

前記生物試料が、血清試料、血漿試料、血液試料、および細胞溶解試料である、請求項 58 の方法。

30

【請求項 62】

a) 硫酸アンモニウムを前記試料に、P S P 9 4 結合タンパク質の沈降が生じるように加える工程、

b) 工程 a) の混合物を遠心分離して、沈降タンパク質を回収する工程、

c) 前記沈降タンパク質を再度懸濁する工程、

d) イオン交換クロマトグラフィーを行って、P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の画分を回収する工程

e) P S P 9 4 接合アフィニーマトリックスを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行って、P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の画分を回収する工程、

40

f) サイズ除外クロマトグラフィーを行って、P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の画分を回収する工程、および

g) 実質的に純粋な P S P 9 4 結合タンパク質を含む画分を回収する工程、

を含む、試料から P S P 9 4 結合タンパク質を精製する方法。

【請求項 63】

前記試料が、ヒト男性血清である、請求項 62 の方法。

【請求項 64】

P S P 9 4 結合タンパク質の沈降が、硫酸アンモニウムを 4.7% 以下の最終濃度まで加えることによってもたらされる、請求項 62 の方法。

【請求項 65】

50

前記イオン交換クロマトグラフィーが、陰イオン交換クロマトグラフィーマトリックスを用いることによって行なわれる、請求項 6 2 の方法。

【請求項 6 6】

前記 P S P 9 4 結合タンパク質が、配列番号 2 に記載のポリペプチド、配列番号 3 に記載のポリペプチド、配列番号 7 に記載のポリペプチド、配列番号 8 に記載のポリペプチド、および、配列番号 9 に記載のポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドである、請求項 6 2 の方法。

【請求項 6 7】

請求項 6 2 の方法から得られる生成物。

【請求項 6 8】

P S P 9 4 が他のポリペプチドに結合している時でさえ利用できる P S P 9 4 エピトープを、認識することができる抗体。

【請求項 6 9】

前記ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および、配列番号 9 からなる群から選択される、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 0】

前記抗体が、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体である、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 1】

請求項 6 8 に記載の抗体を生産するハイブリドーマ細胞系。

【請求項 7 2】

A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、およびその抗原結合断片。

【請求項 7 3】

A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、およびその抗原結合断片。

【請求項 7 4】

A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系。

【請求項 7 5】

A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系。

【請求項 7 6】

a) 前記試料を、P S P 9 4 に結合することができる分子と接触させること、および、
b) P S P 9 4 を含まない試料を回収すること、
を含む、試料から P S P 9 4 を除去するための方法。

【請求項 7 7】

前記分子が、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記試料が、血液、血漿、血清、尿、精液、細胞培養培地、および細胞溶解物からなる群から選択される、請求項 7 6 の方法。

【請求項 7 9】

P S P 9 4 と、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、または、配列番号 9 に記載されたポリペプチドおよびその組み合わせのいずれか一つによって形成される複合体を、試料から除去するための方法であって、

a) 前記試料を、前記複合体の露出したエピトープを認識することができる抗体と接触させること、および、

b) 前記複合体を含まない試料を回収すること、

10

20

30

40

50

を含む方法。

【請求項 80】

前記抗体が、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項79の方法。

【請求項 81】

前記抗体が、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体である、請求項79の方法。

10

【請求項 82】

試料中のPSP94の総量を測定するための方法であって、PSP94が他のポリペプチドに結合している時でさえ、PSP94を認識することができる抗体と、前記試料を接触させることを含む方法。

【請求項 83】

前記抗体が、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体である、請求項82の方法。

【請求項 84】

前記抗体によって、または、標識を担持する第二の分子によって、提供される、標識からのシグナルを検出することをさらに含む、請求項82の方法。

20

【請求項 85】

試料に関して得られるシグナルを、PSP94、PSP94断片、その変異体もしくは類似体の既知量を含む対照試料に関して得られるシグナルと比較する、請求項84の方法。

【請求項 86】

a) PSP94と、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、および配列番号9、およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドのいずれか一つとによって形成される複合体を除去すること、複合体不含試料を生成すること、

b) 前記複合体不含試料を、PSP94を認識することができる抗体と接触させること、を含む、試料中の遊離PSP94の量を測定するための改善された方法。

30

【請求項 87】

前記抗体が、ATCCに特許寄託番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項86の方法。

【請求項 88】

前記抗体によって、または、標識を担持する第二の分子によって、提供される、標識からのシグナルを検出することをさらに含む、請求項86の方法。

【請求項 89】

試料に関して得られるシグナルを、PSP94の既知量を含む対照試料に関して得られるシグナルと比較する、請求項88の方法。

40

【請求項 90】

試料中の遊離PSP94の量を測定するための改善された方法であって、前記試料を、PSP94を認識することができる抗体と、接触させることを含む方法。

【請求項 91】

前記抗体が、ATCCに特許寄託番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項90の方法。

【請求項 92】

50

前記抗体によって、または、標識を担持する第二の分子によって、提供される、標識からのシグナルを検出することをさらに含む、請求項 90 の方法。

【請求項 93】

試料に関して得られるシグナルを、PSP94 の既知量を含む対照試料に関して得られるシグナルと比較する、請求項 92 の方法。

【請求項 94】

PSP94 がポリペプチドに結合している時でさえ、PSP94 に結合することができる第一および第二の抗体を用いることを含み、前記第一および第二の抗体が異なる PSP94 エピトープに結合する、試料中の全ての PSP94 のレベルを測定するための方法。

【請求項 95】

試料中の PSP94 のレベルを測定するための方法であって、前記試料を、遊離および結合形態で PSP94 を認識することができる抗体と接触させることを含む方法。

【請求項 96】

前記抗体が、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4241 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体である、請求項 95 の方法。

【請求項 97】

第一および第二の抗体を用いることを含み、前記第一の抗体は、PSP94 が他のポリペプチドに結合している時でさえ、PSP94 に結合することができ、前記第二の抗体は、PSP94 に結合することができ、かつ、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9 からなる群から選択されるポリペプチドのいずれか一つを、PSP94 と前記ポリペプチドとによって形成される複合体から外すことができる、試料中の全 PSP94 を測定するための方法。

【請求項 98】

前記第一の抗体が、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4241 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体である、請求項 97 の方法。

【請求項 99】

前記第二の抗体が、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4240 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体である、請求項 97 の方法。

【請求項 100】

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 9 に記載のポリペプチド、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4240 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4241 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4242 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4243 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される分子の、試料中の PSP94、PSP94 変異体およびその類似体の量を評価するための使用。

【請求項 101】

PSP94 の増大したレベルを伴う状態の処置のための PSP94 抗体の使用。

【請求項 102】

前記抗体が、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4240 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4241 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項 101 に記載の使用。

【請求項 103】

PSP94 の増大したレベルを伴う状態の処置のための薬剤の製造における PSP94 抗体の使用。

【請求項 104】

前記抗体が、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4240 として寄託されたハイブリドーマ

10

20

30

40

50

マ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項103に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、PSP94を結合することができる新しいポリペプチド（PSP94結合タンパク質）、および核酸およびアミノ酸配列、および疾病の診断および予後におけるこれらの配列の使用に関する。

【0002】

また、本発明は、改善された診断分析、キット、および、PSP94もしくはPSP94結合タンパク質を認識することができる抗体などの試薬に関する。

【背景技術】

【0003】

雄の哺乳動物においてのみ見出される前立腺は、精液、および、血液のいくつかの成分、および、いくつかの調節ペプチドを生産する。前立腺は、間質および上皮細胞を含み、後者の群は、円柱分泌性細胞および基底非分泌性細胞からなる。間質細胞同様に、これらの基底細胞の増殖も、一般的な一前立腺疾患である良性の前立腺肥大（BPH）を引き起こす。他の一般的な前立腺疾患は、前立腺腺癌（CaP）であり、これは、最も一般的な致命的病態生理学的前立腺癌であり、前立腺の周辺領域における上皮細胞の悪性転換を伴う。前立腺腺癌および良性前立腺肥大は、二つの一般的な前立腺疾患であり、老人男性において高い発生率を有する。

【0004】

55歳を超えた男性のおよそ各4人に1人が、ある型、もしくは別の前立腺疾患を患う。前立腺癌は、診断されたおよそ185,000症例および米国において毎年報告される約39,000の死亡に関して、高齢男性における癌に関連した死因の二番目に一般的な原因である。

【0005】

様々な前立腺疾患の病因の理解を得るために行なわれた、正常、良性、および癌性の前立腺によって合成および分泌される様々な物質の研究により、これらの物質の幾つかが、前立腺疾患の診断における免疫組織化学の腫瘍マーカーとして用いられることができることが明らかとなる。正常な前立腺によって分泌される3つの主なタンパク質もしくはポリペプチドは、(1)前立腺酸性フォスファターゼ（PAP）；(2)前立腺特異抗原（PSA）；および、(3)前立腺インヒピンペプチド（PIP）、ヒト精漿インヒピン（HSPi）、または -マイクロセミノプロテイン（-MSP）としても知られ、以後、PSP94として称する、94アミノ酸の前立腺分泌タンパク質（PSP94）である。

【0006】

PSP94は、単一の糖化されていないシステインに富んだタンパク質であり、前立腺特異抗原（PSA）および前立腺酸性フォスファターゼ（PAP）と共に、ヒトの精液において見出された3つの主なタンパク質の1つである。PSP94は、10.7kDaの分子量を有し、このタンパク質の完全なアミノ酸配列が、既に確定されている。PSP94のcDNAおよび遺伝子は、クローン化され、特徴づけられている（Ulvsback等、Biochem. Biophys. Res. Comm., 164:1310、1989；Green等、Biochem. Biophys. Res. Comm., 167:1184、1990）。免疫組織化学およびin situハイブリダイゼーション技術により、PSP94が、主に、前立腺上皮細胞に位置することが示されている。しかしながら、それは、様々な他の分泌性上皮細胞にも存在する（Weiber等、Am. J. Pathol., 137:593、1990）。PSP94は、前立腺腺癌細胞系、LNCaPにおいて発現されることが示されている（Yang等、J. Urol., 160:2240、1998）。さらに、腫瘍細胞の増殖における外因性PSP94の阻害効果が、in

10

20

30

40

50

vivoおよびin vitroの両方において観察されており (Gardie等、Prostate、22:225、1993; Lokeshwar等、Cancer Res., 53:4855、1993)、これは、PSP94が、腫瘍細胞において、同種の受容体との相互作用を介し、前立腺癌の成長に対して負の調節因子であり得たことを示している。

【0007】

天然のPSP94は、ホルモン難治性前立腺癌(および潜在的に他の前立腺の兆候)の処置時に治療効果を有することが示されている。例えば、前立腺癌内でのPSP94の発現は、腫瘍の進行度および攻撃力が増えるにつれて、減ることが知られている。腫瘍のPSP94の発現は、抗アンドロゲン処置時に、特に高い進行度の腫瘍において、刺激される。ここに参照によって組み込まれる米国特許第5,428,011号(Sheeth A. R.等、1995年6月27日発行)は、前立腺、胃腸および胸の腫瘍成長のin vitroおよびin vivoの阻害に用いられる天然のPSP94を含む製剤を記載している。これらの製剤は、天然のPSP94単独、または、天然PSP94と、例えば、マイトマイシン、イダルピシン、シスプラチン、5-フルオロウラシル、メトトレキサート、アドリアマイシンおよびダウノマイシンなどの抗癌剤との混合物を含む。更に、組換えヒトPSP94(rhPSP94)、および、PCK3145などのポリペプチド類似体の治療効果は、カナダ特許出願第2,359,650号(参照によってここに組み込まれる)において記載されている。

10

【0008】

mRNAレベルでの免疫組織化学的研究および調査により、前立腺がPSP94の主要源であることが示されている。PSP94は、成体雄ラットのin vitroおよびin vivoの両方において、循環卵胞刺激ホルモン(FSH)の、フィードバック制御に参与し、分泌抑制に作用する。前立腺部位ならびに下垂体の両方で、両方にPSP94に対する受容体部位が存在するため、PSP94は作用する。PSP94は、前立腺によるFSH様ペプチドの合成/分泌に影響を及ぼし得るだけでなく、ラット下垂体からのFSHの生合成および分泌を抑制することも示されている。これらの発見は、in vivoの腫瘍成長におけるPSP94の作用が、血清FSHレベルの低減の結果であり得ることを示唆する。

20

【0009】

最近、BPHまたはCaP患者の血清中のPSP94濃度が、正常者よりも有意に高いことが示されている。正常男性において観察されたPSP94の最高血清濃度が、およそ40ng/mlであるのに対し、BPHまたはCaPを伴う男性におけるPSP94の血清濃度は、400ng/mlまで観察されている。

30

【0010】

血清において、PSP94は、遊離(非結合)形、または未知の正体の担体タンパク質と会合した結合形として存在する。結合形(状態)のPSP94は、前立腺癌患者の血中において定量化され、これらの測定値は、予後の評価時のそれらの有用性について分析されている(Bauman, G. S., 等、The Prostate J. 2:94-101、2000; Xuan, J. W., 米国特許第6,107,103号; Wu, D. 等、J. Cell. Biochem. 76:71-83、1999)。遊離形および結合形のPSP94の測定値が、遊離形単独の測定値よりも、前立腺癌のいくつかの領域において、より大きな臨床的関連性を有するであろうことが示唆された。更に、PSP94の両方の形態の測定値は、放射線治療後の前立腺癌における再発しない間隔の正確な予測を可能とすることが示された。しかしながら、Xuan, J. W. 米国特許第6,107,103号に記載されたものなど、今日のPSP94測定分析は、タンパク質の結合および遊離形態を分離するための精製工程に依存しており、それゆえ、有用かつ能率的な工業用分析のために必要である簡易性に欠いている。

40

【特許文献1】米国特許第5,428,011号(Sheeth A. R.等、1995年6月27日発行)

【特許文献2】カナダ特許出願第2,359,650号

【特許文献3】Xuan, J. W. 米国特許第6,107,103号

50

- 【特許文献4】カナダ特許出願第2,359,650号
- 【特許文献5】国際特許出願第02/33090号
- 【特許文献6】米国特許第6,156,515号
- 【特許文献7】米国特許第4,196,265号
- 【特許文献8】米国特許第3,817,837号
- 【特許文献9】米国特許第3,850,752号
- 【特許文献10】米国特許第3,939,350号
- 【特許文献11】米国特許第3,996,345号
- 【特許文献12】米国特許第4,277,437号
- 【特許文献13】米国特許第4,275,149号 10
- 【特許文献14】米国特許第4,366,241号
- 【非特許文献1】Ulv sb ack等、Biochem. Biophys. Res. Comn., 164:1310、1989
- 【非特許文献2】Green等、Biochem. Biophys. Res. Comn., 167:1184、1990
- 【非特許文献3】Weiber等、Am. J. Pathol., 137:593、1990
- 【非特許文献4】Yang等、J. Urol., 160:2240、1998
- 【非特許文献5】Garde等、Prostate, 22:225、1993
- 【非特許文献6】Lokeshwar等、Cancer Res., 53:4855、1993 20
- 【非特許文献7】Bauman, G. S., 等、The Prostate J. 2:94-101、2000
- 【非特許文献8】Wu. D. 等、J. Cell. Biochem. 76:71-83、1999
- 【非特許文献9】J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John WileyおよびSons (1984)
- 【非特許文献10】J. Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory出版社 (1989)、 30
- 【非特許文献11】T. A. Brown (編集者)、Essential Molecular Biology; A Practical Approach, 1および2巻、IRL出版社 (1991)
- 【非特許文献12】D. M. GloverおよびB. D. Hames (編集者)、DNA Cloning; A Practical Approach, 1~4巻、IRL出版社 (1995および1996)
- 【非特許文献13】F. M. Ausubel等 (編集者)、Current Protocols in Molecular Biology, Greene出版協会およびWiley-Interscience (1988、現在までの全ての改訂版を含む)
- 【非特許文献14】Todaro G JおよびGreen H., J. Cell Biol. 17:299-313、1963) 40
- 【非特許文献15】Puck TT等、J. Exp. Med. 108:945-956、1958)
- 【非特許文献16】Buckholz, R. G. および Gleeson, M. A. G., Biotechnology, 9:1067-1072、1991
- 【非特許文献17】Cregg, J. M. 等、Biotechnology, 11:905-910、1993
- 【非特許文献18】Sreekrishna, K等、J. Basic Microbiol., 28:265-278、1988
- 【非特許文献19】Wegner, G. H., FEMS Microbiology R 50

reviews、87:279-284、1990

【非特許文献20】Protein-structure and molecular properties、第二版、T.E.Creighton、W.H.Freeman and Company、New York、1993

【非特許文献21】Smith、T.F.およびWaterman M.S.(1981) Ad. Appl. Math., 2:482-489

【非特許文献22】Needleman、S.B.およびWunsch、C.D.(1970) J. Mol. Biol., 48:443-453

【非特許文献23】Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988 10

【非特許文献24】Goding、第65-66ページ、1986

【非特許文献25】Campbell、第75-83ページ、1984

【非特許文献26】Bajjal Gupta等、Prot. Exp. and Purification 8:483-488、1996)

【非特許文献27】Prot. Exp. and Purification 8:483-488、1996

【非特許文献28】Galfre G.およびMilstein C、Meth. Enzymol. 73:3-46、1981

【非特許文献29】Antibodies: A Laboratory Manual eds HarlowおよびLane、Cold Spring Harbor Laboratory 20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

PSP94(全PSP94だけでなく、遊離または結合形のPSP94)のレベルを評価(定量化)する方法が、ここに記載されている。本発明は、PSP94またはPSP94結合タンパク質に対する特異性を有する抗体、および改善された診断および予後分析、ハイブリドーマ、そのキットおよび抗体に関する。

【0012】

さらに、PSP94が結合する担体タンパク質が、本出願において、記載され、同定され、そして、特徴付けられている。 30

【0013】

PSP94との会合能により、PSP94結合タンパク質および関連抗体は、PSP94の生物活性における影響力を有することができ、それゆえ、ここに、(PSP94関連)疾患の診断および予後マーカーとして用いることができる。

【0014】

それゆえ、本発明は、ここに、PSP94結合タンパク質として同定されたポリペプチド(配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9)、精製方法、核酸およびアミノ酸配列、および、疾患(例えば、前立腺癌、または、PSP94および/または卵胞刺激ホルモン(FSH)の異常もしくは増大したレベル、および/または、PSP94結合タンパク質の異常もしくは増大したレベルによって特徴付けられる疾患)の診断および予後におけるこれらの配列の使用に関する。 40

【0015】

第一の局面において、本発明は、

a) 配列番号1に記載のポリヌクレオチド、

b) 配列番号6に記載のポリヌクレオチド、

c) 配列番号6の配列1から1392を有するポリヌクレオチド、

d) 配列番号6の配列1から1653を有するポリヌクレオチド、

e) 配列番号1に記載のポリヌクレオチドの少なくとも10塩基の連続部分に順に一致する10から2005(又は2004)塩基長の間のサイズのポリヌクレオチド、および 50

f) 配列番号 6 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 10 塩基の連続部分に順に一致する 10 から 1876 (又は 1875) 塩基長の間のサイズのポリヌクレオチド、からなる群から選択されるメンバーを含むことができる (例えば単離される) ポリヌクレオチド (例えば、PSP94 結合タンパク質をコードしている) を提供する。

【0016】

ポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号 1 に記載のポリヌクレオチド、または、配列番号 6 に記載のポリヌクレオチド、または、配列番号 6 の配列 1 から 1392 を有するポリヌクレオチド、または、配列番号 6 の配列 1 から 1653 を有するポリヌクレオチドであることができる。本発明のポリヌクレオチドは、特に、コードされたタンパク質の PSP94 結合能に基づいて、選択することができる。ここでは、配列番号 1 は、配列番号 6 の類似体とみなされてよいと理解されるべきである。

10

【0017】

第二の局面において、本発明は、例えば、

配列番号 2 に記載のポリペプチド、

配列番号 3 に記載のポリペプチド、

配列番号 7 に記載のポリペプチド、

配列番号 8 に記載のポリペプチド、

配列番号 9 に記載のポリペプチド、

配列番号 2 の同じサイズの連続部分に一致する 10 から 505 のサイズのアミノ酸長のポリペプチド、

20

配列番号 3 の同じサイズの連続部分に一致する 10 から 592 のサイズのアミノ酸長のポリペプチド、

配列番号 7 の同じサイズの連続部分に一致する 10 から 624 のサイズのアミノ酸長のポリペプチド、

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、または、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列に一致する少なくとも 90% のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、または、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列に一致する少なくとも 70% のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、または、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列に一致する少なくとも 50% のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

30

- 配列番号 2 の、10 から 505 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、

- 配列番号 3 の、10 から 592 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、または、

- 配列番号 7 の、10 から 624 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、

のアミノ酸配列に一致する少なくとも 90% のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

- 配列番号 2 の、10 から 505 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、

- 配列番号 3 の、10 から 592 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、または、

- 配列番号 7 の、10 から 624 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、

のアミノ酸配列に一致する少なくとも 70% のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

40

- 配列番号 2 の、10 から 505 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、

- 配列番号 3 の、10 から 592 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、または、

- 配列番号 7 の、10 から 624 の長さの連続アミノ酸のポリペプチド、

のアミノ酸配列に一致する少なくとも 50% のアミノ酸配列を有するポリペプチド類似体、

などのポリペプチドおよびポリペプチド類似体を提供する。

【0018】

本発明によると、ポリペプチドは、好ましくは、配列番号 2 に記載のポリペプチド、配列番号 3 に記載のポリペプチド、配列番号 7 に記載のポリペプチド、配列番号 8 に記載の

50

ポリペプチド、または、配列番号 9 に記載ポリペプチドであることができる。本発明のポリペプチドは、特に、P S P 9 4 の結合能に基づいて選択されることができる。ここでは、配列番号 2 および配列番号 3 は、配列番号 7 の類似体とみなして良いと理解されるべきである。配列番号 8 および配列番号 9 も、配列番号 7 の類似体とみなして良い。

【0019】

更なる局面において、本発明は、例えば、ここに記載されたポリヌクレオチドを含むベクターを含む免疫化組成物を提供する。(21塩基対ポリヌクレオチド配列によってコードされた)7アミノ酸のポリペプチドが、抗原呈示時に、しばしば、大きな組織適合複合体(MHC)と会合するため、時に、所望する配列の少なくとも21塩基長のポリヌクレオチドを有することが好ましい。ベクターは、例えば、配列番号1に記載のポリヌクレオチド、配列番号6に記載のポリヌクレオチド、配列番号6の配列1から1392を有するポリヌクレオチド、配列番号6の配列1から1653を有するポリヌクレオチド、配列番号1に記載のポリヌクレオチドの同じサイズの連続部分に順に一致する21から2005塩基長の間のサイズのポリヌクレオチド、または、配列番号6に記載のポリヌクレオチドの同じサイズの連続部分に順に一致する21から1876塩基長の間のサイズのポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチド、および、希釈剤または緩衝剤を含むことができる。ここで、ベクターは、前記ポリヌクレオチドからコードされたポリペプチドの発現を可能にすることができると理解されるべきである。ベクターは、直鎖状または環状であることができ、ポリヌクレオチド自身に加えて最小限の配列を含むことができる(例えば、ゲノムに組み込むための配列、プロモーター、CpG配列)。本発明のポリヌクレオチドの投与(いかなる付加的な配列も用いない、すなわち、ベクターを用いない)は、時に所望する免疫反応を始めるのに十分であることがある。

10

20

【0020】

更なる局面において、本発明は、ここに明記したポリペプチド(例えば、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9)、ポリペプチド類似体、変異体、断片、またはその組み合わせ、および希釈剤または緩衝剤を含む免疫化組成物に関する。ここに記載された免疫化組成物の任意の組み合わせを用いた免疫化も本発明に含まれる。

【0021】

免疫化組成物は、更にアジュバントを含むことができる。更なる実施態様において、免疫化組成物は、P S P 9 4 (天然体、および/または、組換え体)、P S P 9 4 変異体、P S P 9 4 断片、P S P 9 4 をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、P S P 9 4 変異体をコードするポリヌクレオチド、P S P 9 4 断片をコードするポリヌクレオチド、およびその組み合わせも含むことができる。さらに、ベクターは、前記ポリヌクレオチドからコードされるポリペプチドの発現を可能にすることができる。天然P S P 9 4、組換えP S P 9 4 (例えば、r H u P S P 9 4)、P S P 9 4 変異体、類似体、および断片における参考のために、カナダ特許出願第2,359,650号または国際特許出願第02/33090号を参照してください。

30

【0022】

更なる局面において、本発明は、ポリペプチド(例えば、P S P 9 4、P S P 9 4 結合タンパク質、および/または、P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質複合体)に対する抗体(モノクローナルまたはポリクローナル)を生産する方法であって、哺乳動物に、ここに記載された免疫化組成物(ポリペプチド、ポリペプチド類似体、ポリヌクレオチド、およびその組み合わせなどを含む)を投与することを含む方法に関する。

40

【0023】

本発明によると、本方法を用いて免疫化される哺乳動物は、例えば、ヒト、マウス、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ウシ、ラット、ブタ、および機能的な免疫システムを有する他の哺乳動物を含む。ここで、「機能的な免疫システムを有する哺乳動物」は、抗原により免疫化した時に、抗体(免疫グロブリン)を生産することができる(すなわち、抗原に対する体液性免疫反応および/または細胞免疫反応を有する)哺乳動物として理解されるべきである。

50

【0024】

本発明の更なる局面は、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体およびその抗原結合断片、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体およびその抗原結合断片、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系に関する。

【0025】

更なる局面において、本発明は、本発明の任意のポリヌクレオチド、例えば、配列番号1、配列番号6、アンチセンス、断片、変異体、mRNAなど、を、組み込んだ（形質転換した、形質導入した、トランスフェクトした、など）細胞に関する。

10

【0026】

更に、付加的な局面において、本発明は、本発明のポリペプチド、例えば、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9、変異体、断片、類似体、もしくはその組み合わせ、の少なくとも一つを、組み込み、および/または、発現している（単離される）細胞に関する。

【0027】

別の局面において、本発明は、PSP94の異常な（例えば、高い、増大した）レベル、またはPSP94結合タンパク質の異常な（例えば、高い、増大した）レベルと関連した状態の診断または予後（もしくは処置）における、ここに明記したポリヌクレオチド（配列番号1、配列番号6、断片、アンチセンス、類似体、mRNA）の使用を含む。

20

【0028】

更に、別の局面において、本発明は、PSP94の異常な（例えば、高い、増大した）レベルまたはPSP94結合タンパク質の異常な（例えば、高い、増大した）レベルと関連した状態の診断または予後（もしくは処置）における、ここに明記したポリペプチド（例えば、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9、類似体、変異体、断片）の使用を提供する。

【0029】

本発明によると、ここに明記したポリヌクレオチドまたはここに明記したポリペプチドは、例えば、前立腺癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、卵巣癌、他の上皮分泌部の癌、良性の前立腺肥大（BPH）またはFSHの増大したレベルに特徴付けられる疾患などの状態の診断または予後において用いることができる。

30

【0030】

更なる局面において、本発明は、ここに明記したポリペプチド、例えば、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、および配列番号9（ならびにその変異体、類似体、および断片）からなる群から選択されるポリペプチド、またはその組み合わせの試料中における量を測定するための方法に関する。本発明によると、方法は、前記試料を、前記ポリペプチドを認識することができる分子（抗体またはポリペプチド）と接触させることを含むことができる。ここで意図された方法は、プロット膜、プレート、マトリックスに固定化された、または、固定化されていない（溶液状態）ポリペプチドに適用することができる。

40

【0031】

ここで、ポリペプチドのレベルを評価するための定量分析を発展させるために、好ましい分子は、所望されるポリペプチドに対する十分な親和性と特異性を有するであろうと理解されるべきである。親和性と特異性は、例えば、関連性のないポリペプチドに対する分子の結合を比較する、関心のあるポリペプチドに対する競合分析などによって決定することができる。

【0032】

本発明の一実施態様において、前記方法に用いられる分子は、例えば、特許寄託番号PTA-4242としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモ

50

ノクローナル抗体、および、特許寄託番号 P T A - 4 2 4 3 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体を含むことができる。本発明の別の実施態様において、分子は、例えば、P S P 9 4 およびその類似体であることができる。

【 0 0 3 3 】

ここで意図された配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9 からなる群から選択されるポリペプチドの量を測定するための方法は、さらに、例えば、以下の工程：

a) 本発明のポリペプチドの少なくとも一つを含む試料を、適切な基材（例えば、E L I S A プレート、マトリックス、S D S - P A G E、ウエスタンブロット膜）に固定した抗体と接触させること、

b) 工程 a) に、標識またはマーカールを含む検出試薬を加えること、および、

c) 標識またはマーカールから得られるシグナルを検出すること、

を含むことができる。

【 0 0 3 4 】

適切な検出試薬は、例えば、抗体、または本発明のポリペプチドに対する親和性を有するポリペプチドを含むことができ、検出試薬は、好ましくは、抗体とは異なる結合部位を有することができる。ここに記載されたように、検出試薬は、直接、標識（もしくはマーカール）に結合させる（接合させる）ことができ、あるいは、前記標識もしくはマーカールを担持する（と接合させた）第二の分子によって認識させることができる。

【 0 0 3 5 】

工程 a) において用いられることができる抗体の例は、特許寄託番号 P T A - 4 2 4 3 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（1 7 G 9）である。その場合、特許寄託番号 P T A - 4 2 4 2 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（3 F 4）を、工程 c) における検出試薬として用いることができる。

【 0 0 3 6 】

表 1 0 に列挙される抗体（クローンとして識別されている）など、P S P 9 4 - 結合タンパク質（配列番号 2、配列番号 3 など）に結合することができるいかなる抗体も、ここに記載された方法に用いることができる（例えば、（クローン）2 B 1 0、1 B 1 1、9 B 6、P 8 C 2、B 3 D 1、2 6 B 1 0）。この方法を行なうために、二つの抗体を必要とする場合、異なるエピトープに結合する抗体を選択することが好ましいであろう。

【 0 0 3 7 】

工程 a) において用いることができる抗体の別の例は、特許寄託番号 P T A - 4 2 4 2 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（3 F 4）である。その場合、特許寄託番号 P T A - 4 2 4 3 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（1 7 G 9）を、工程 c) における検出試薬として用いることができる。

【 0 0 3 8 】

更なる局面において、本発明は、P S P 9 4 に結合していない（すなわち、遊離している（未結合の））、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9（変異体、類似体、断片）からなる群から選択されるポリペプチドまたはその組み合わせの試料中における量を測定するための方法に関し、前記方法は、

a) 前記試料から、P S P 9 4 と、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9（変異体、類似体、断片）からなる群から選択されるポリペプチドのいずれか一つとによって形成される複合体を除去し、複合体不含試料を生成すること、および、

b) 前記複合体不含試料を、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、および配列番号 9（変異体、類似体、断片）およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドのいずれか一つを認識することができる抗体と接触させること、

10

20

30

40

50

を含む。

【0039】

本発明の一実施態様において、工程b)で用いられる抗体は、特許寄託番号PTA-4242としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、特許寄託番号PTA-4243としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択されることができる。

【0040】

前記で意図されたPSP94に結合していない本発明のポリペプチドの量を測定するための方法は、例えば、以下の工程；

a) 前記試料から、PSP94と、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、および配列番号9からなる群から選択されるポリペプチドのいずれか一つとによって形成される複合体を除去し、複合体不含試料を生成すること、

b) 抗体を、適切な基材(ELISAプレート、マトリックス、SDS-PAGE、ウエスタンブロット膜)に、固定する(被覆する、吸着させる)こと、

c) 前記複合体不含試料を加えること、

d) 標識またはマーカを含む検出試薬を加えること、および、

e) 標識またはマーカから得られるシグナルを検出すること、

を含むことができる。

【0041】

複合体の除去は、例えば、特許寄託番号PTA-4241としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体を用いることによって、行なうことができる。

【0042】

工程b)において用いることができる適切な抗体は、特許寄託番号PTA-4242としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(3F4)、および、特許寄託番号PTA-4243としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(17G9)からなる群から選択される抗体である。

【0043】

更なる局面において、本発明は、特許寄託番号PTA-4240としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(2D3)、特許寄託番号PTA-4241としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(P1E8)、特許寄託番号PTA-4242としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(3F4)、および、特許寄託番号PTA-4243としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(17G9)からなる群から選択される(モノクローナル)抗体の、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9、変異体、断片、類似体、および/または、その組み合わせの(試料中における)量(分量、濃度)(遊離型、結合型、および/または、全ての量)を評価するための使用を含む。

【0044】

別の局面において、本発明は、配列番号2に記載のポリペプチド、配列番号3に記載のポリペプチド、配列番号7に記載のポリペプチド、配列番号8に記載のポリペプチド、配列番号9に記載のポリペプチド、特許寄託番号PTA-4240としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(2D3)、特許寄託番号PTA-4241としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(P1E8)、特許寄託番号PTA-4242としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(3F4)、および、特許寄託番号PTA-4243としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(17G9)からなる群から選択される分子の、

10

20

30

40

50

P S P 9 4 の（試料中における）量を評価するため、または、P S P 9 4 もしくは P S P 9 4 結合タンパク質の異常または増大したレベルに関連した状態の診断のための使用を含む。

【0045】

別の局面において、本発明は、第一部分と第二部分を含み、前記第一部分が、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（2 D 3）、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（P 1 E 8）、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 2 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（3 F 4）、および、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 3 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（1 7 G 9）からなる群から選択され、かつ、前記第二部分が、薬剤、固形支持体、レポーター分子、レポーター分子を担持する基、キレート剤、アシル化剤、架橋剤、および標的基からなる群から選択される、抗体接合物であって、前記第二部分もしくは前記第二部分の接合が、第一部分の生物活性（例えば、親和性、安定性）を妨げない抗体接合物に関する。

10

【0046】

本発明の一実施態様において、固形支持体の例は、炭水化物、リポソーム、脂質、コロイド状金、微粒子、マイクロカプセル、マイクロエマルジョン、およびアフィニティーカラムのマトリックスであることができる。

20

【0047】

更なる実施態様において、レポーター分子は、フルオロホア（例えば、ローダミン、フルオロセイン、および緑色蛍光タンパク質）、クロモホア、染料、酵素（例えば、アルカリ・ホスファターゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ）、放射性分子、および結合/リガンド（例えば、ビオチン/アビジン（ストレプトアビジン））複合体の分子からなる群から選択されることができ。

【0048】

更に、付加的な実施態様において、薬剤は、毒素（例えば、細菌毒素）、（例えば、抗癌）薬、およびプロドラッグの群から選択されることができ。

30

【0049】

更なる局面において、本発明は、（結合）P S P 9 4 を認識することができる分子を有する容器を含む、（試料中の）P S P 9 4 の量を評価する際に用いるための、または、P S P 9 4（またはP S P 9 4 結合タンパク質）の異常な（高い、もしくは増大した）レベルに関連した状態の診断のための、キットを含む。ここで、キットは、分離した構成要素で提供される（売られる）ことができると理解されるべきである。

【0050】

本発明の一実施態様において、キットに含まれることができるP S P 9 4 を認識できる分子は、（以下の一つ以上）A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（2 D 3）、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（P 1 E 8）、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 2 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（3 F 4）、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 3 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（1 7 G 9）、本発明の抗体接合物、および、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、および配列番号9からなる群から選択されるポリペプチドからなる群から選択される分子である（例えば、含む）ことができる。

40

【0051】

本発明の別の実施態様において、キットは、配列番号2に記載のポリペプチド、配列番号3に記載のポリペプチド、および配列番号7に記載のポリペプチド、配列番号8に記載

50

のポリペプチド、配列番号 8 に記載のポリペプチド、変異体、断片、類似体およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドを認識（結合）することができる抗体を有する容器を更に含むことができる。ATCC に特許寄託番号 PTA - 4243 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（17G9）、および、ATCC に特許寄託番号 PTA - 4242 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体（3F4）が、本発明によって考慮されている。

【0052】

ここで、キットは、個別の構成要素で提供されてよいと理解されるべきである。キットで提供された抗体は、プレートもしくは膜、もしくは別の型の固形マトリックスに結合させるなど、種々の形態で、または、濃縮形態または適切な抗体の作用希釈物を含むガラス

10

【0053】

別の局面において、本発明は、ここに明記したポリペプチド（PSP94 結合タンパク質、例えば、配列番号 2 に記載のポリペプチド、配列番号 3 に記載のポリペプチド、配列番号 7 に記載のポリペプチド、配列番号 8 に記載のポリペプチド、および配列番号 9 に記載のポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド）を調製するための方法であって、

a) 細胞による前記ポリペプチドの発現をもたらす条件下において、宿主細胞を、培養すること、および、

b) 一つ以上の精製工程により、ポリペプチドを回収すること、
を含む方法を提供する。

20

【0054】

更に別の局面において、本発明は、ここに明記したポリペプチド（PSP94 結合タンパク質、例えば、配列番号 2 に記載のポリペプチド、配列番号 3 に記載のポリペプチド、配列番号 7 に記載のポリペプチド、配列番号 8 に記載のポリペプチド、配列番号 9 に記載のポリペプチド、およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチド）を調製するための方法であって、

a) 前記ポリペプチドを含む一つ以上の生物試料を採取すること、および、

b) 一つ以上の精製工程により、ポリペプチドを回収すること、
を含む方法を提供する。

30

【0055】

ここにおいて、単独もしくは組み合わせた精製工程が、硫酸アンモニウム沈降、サイズ除外クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーなどからなる群から選択されることができる。

【0056】

本発明の別の実施態様において、精製工程は、

a) 硫酸アンモニウムを前記生物試料に加える工程、

b) イオン交換クロマトグラフィーを行なう工程、

c) PSP94 接合アフィニティマトリックスを用いるアフィニティークロマトグラフィーを行なう工程、

40

d) サイズ除外クロマトグラフィーを行なう工程、および

e) 実質的に純粋な PSP94 結合タンパク質を含む画分を回収する工程、
を含むことができる。

【0057】

更なる局面において、本発明は、試料からの PSP94 結合タンパク質の精製方法であって、

a) 硫酸アンモニウムを前記試料（例えば、ヒト男性血清）に、PSP94 結合タンパク質の沈降が生じるように加える工程、

b) 工程 a) の混合物を遠心分離して、沈降タンパク質を回収する工程、

c) 前記沈降タンパク質を再度懸濁する工程、

50

d) イオン交換クロマトグラフィーを行って、P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の画分を回収する工程、

e) P S P 9 4 接合アフィニティーマトリックスを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行って、P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の画分を回収する工程、

f) サイズ除外クロマトグラフィーを行って、P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の画分を回収する工程、および

g) 実質的に純粋な P S P 9 4 結合タンパク質 (例えば、配列番号 2 に記載のポリペプチド、配列番号 3 に記載のポリペプチド、配列番号 7 に記載のポリペプチド、配列番号 8 に記載のポリペプチド、配列番号 9 に記載のポリペプチド、およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチド) を含む画分を回収する工程、
を含む方法も含む。

10

【0058】

本発明の一実施態様において、工程 a) における P S P 9 4 結合タンパク質の沈降は、硫酸アンモニウムを、47%以下の最終濃度まで加えることによって、もたらされることができる。

【0059】

本発明の第二の実施態様において、工程 d) のイオン交換クロマトグラフィーは、陰イオン交換クロマトグラフィーマトリックスを用いることによって行なわれることができる。

【0060】

その更なる局面において本発明は、P S P 9 4 結合タンパク質 (例えば、配列番号 2 に記載のポリペプチド、配列番号 3 に記載のポリペプチド、配列番号 7 に記載のポリペプチド、配列番号 8 に記載のポリペプチド、配列番号 9 に記載のポリペプチド、およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチド) のための精製方法を含む (図 8 に要約されている)。血清からの P S P 9 4 結合タンパク質の精製は、例えば、以下の工程：

20

a) 硫酸アンモニウム最終濃度が 32%の溶液を供するように、硫酸アンモニウムを、ヒト (男性) 血清試料に、加えること、

b) 非特異的ヒト血清タンパク質を含むベレット画分および P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の上清画分を回収するために前記工程の溶液を遠心分離すること、

c) P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の上清画分を回収し、P S P 9 4 結合タンパク質を含む沈降タンパク質溶液を供するように、硫酸アンモニウム濃度を、最終濃度 47%に調節すること、

30

d) P S P 9 4 結合タンパク質を含む沈降タンパク質を回収するため、混合物を遠心分離すること、

e) 水性溶剤 (例えば、水、リン酸緩衝生理食塩水、10 mM の M E S、10 mM の M O P S、10 mM の B i c i n e : これらの溶液 (適切な場合) は、例えば、4.7 から 9.0 の間、好ましくは 5.7 から 8.0 の間、より好ましくは 5.7 から 6.7 の間に含まれる pH であることができる) 中に、P S P 9 4 結合タンパク質を含む、前記沈降タンパク質を再度懸濁すること、しかしながら、好ましい水性溶剤は、pH 6.5 の 10 mM M E S 緩衝液である

40

f) P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の前記水溶液を、イオン交換 (陰イオン交換) クロマトグラフィーマトリックス (樹脂、ゲル) を含むイオン交換 (陰イオン交換) クロマトグラフィーカラムに充填すること、

g) 前記イオン交換クロマトグラフィーから、P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質を回収する (溶出する、分離する) ために、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウムからなる群から選択される塩溶液、好ましくは、例えば、100 mM から 1000 mM まで変動するモル濃度の塩化ナトリウム、を、加えること、

h) P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の画分 (ピーク) を回収すること、

i) P S P 9 4 結合タンパク質と結合した P S P 9 4 接合アフィニティーマトリックスを作るために、P S P 9 4 接合アフィニティーマトリックスを、回収された画分と、接触

50

させる（充填する、通す）こと、

j) P S P 9 4 結合タンパク質を回収する（溶出する、分離する）ために、P S P 9 4 結合タンパク質と結合した前記 P S P 9 4 接合アフィニティマトリックスに、溶出剤（遊離 P S P 9 4、尿素、酢酸ナトリウムまたは C A P S ; 好ましくは、遊離 P S P 9 4）を加えること、

k) P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の画分を回収すること、

l) P S P 9 4 結合タンパク質を不純物から分離するために、サイズ除外クロマトグラフィーマトリックスを含むサイズ除外クロマトグラフィークラムに、前記 P S P 9 4 結合タンパク質を充填すること、および

m) (実質的に) 純粋な P S P 9 4 結合タンパク質を含む画分を回収すること、
を含むことができる。

10

【0061】

ここに記載された精製工程の幾つかが、必要とされる精製レベル、または、一つ以上の残りの工程の最適化に応じて、不要になるかもしれないことを理解されるべきである。

【0062】

更なる局面において、本発明は、前記精製方法から得られる生成物に関する。

【0063】

本発明によると、ここで称される試料（例えば、生物試料）は、例えば、血液、血漿、血清、尿、精液、細胞培養培地、細胞溶解物などを 含むことができる。試料は、好ましくは、ヒト（例えば、男性）の試料である。

20

【0064】

別の局面において、本発明は、P S P 9 4 が他のポリペプチド（他の分子）に結合している時でさえ利用できる、P S P 9 4 エピトープ（すなわち、露呈されたエピトープ）を認識することができる抗体、および、その抗原結合断片に関する。そのようなポリペプチドは、例えば、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、変異体、断片、類似体、および、その組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドであることができる。そのような抗体を生成するハイブリドーマ細胞系も、本発明によって意図されている。そのような抗体の例は、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 (P 1 E 8) として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、または、P S P 9 4 の遊離および結合型を認識することができるポリクローナル抗体である

30

【0065】

露呈されたエピトープの同定は、P S P 9 4 の遊離および結合型に対する特異性について、抗体のパネルを試験することによって、行なうことができる。両方の型と反応する（認識する）抗体は、候補抗体を表すことができる。同時に、部分的トリプシン消化を、P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質複合体に行なうことができる。複合型で利用できる P S P 9 4 エピトープ（例えば、直鎖状エピトープ）を、次いで、アミノ酸配列分析によって同定することができる。この、もしくは、これらの（利用できる）エピトープに結合することができる抗体を、生産することができる。ここで、露呈されたエピトープは、好ましくは、分子または複合体が天然（自然）の状態（例えば、変性されていない、天然の、または、3 D 型）である時に、抗体に近づく分子（例えば、P S P 9 4、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、およびそれらの複合体）のエピトープとして理解されることができる。

40

【0066】

更なる局面において、本発明は、試料から P S P 9 4 を除去するための方法であって、

a) 前記試料を、P S P 9 4 に結合することができる分子と、接触させること（分子は、直接的または間接的に、マトリックスまたは固形支持体に結合させることができる）、および、

b) P S P 9 4 を含まない試料を回収すること、
を含む方法を提供する。

50

【0067】

例えば、試料（生物試料）からPSP94を除去すること、増大したPSP94レベルを有する個体の血清から過剰のPSP94を除去すること（すなわち、PSP94の血清の涸渇）、および、涸渇した血清を個体（例えば、必要とする患者）に再度注入することが有用であることが判明するかもしれない。他の場合において、他の血清構成要素の測定を最適化するために、PSP94を試料から除去することが有用であるかもしれない。PSP94の除去は、PSP94と、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9に記載された配列、PSP94抗体、およびその組み合わせのいずれか一つとの間の親和性に基づいている。

【0068】

前記分子は、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9、ATCCに特許寄託番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体からなる群から選択されることができ分子であることができる。

【0069】

また、更なる局面において、本発明は、PSP94と、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9に記載されたポリペプチドおよびその組み合わせのいずれか一つによって形成される複合体（例えば、PSP94/配列番号2、および/または、PSP94/配列番号3、および/または、PSP94/配列番号7など）を試料から

除去するための方法であって、
a) 前記試料を、前記複合体の利用できる（露出した）エピトープを認識することができる抗体と、接触させること（例えば、抗体は、直接的または間接的に、マトリックスもしくはは固形支持体に結合させることができる）、および、

b) 前記複合体を含まない試料を回収すること、
を含む方法を提供する。

【0070】

本発明の一実施態様において、工程b)に用いられる抗体は、例えば、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体を含むことができる。ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体が、好ましくは用いられる。

【0071】

本発明の別の局面は、ATCCに特許寄託（例えば、受入）番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、ならびに、ATCCに特許寄託（例えば、受入）番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、およびその抗原結合断片を包含する。

【0072】

ここに記載された抗体を生産するハイブリドーマ細胞系も、本発明によって網羅されている。これらは、ATCCに特許寄託（例えば、受入）番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系、および、ATCCに特許寄託（例えば、受入）番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系を含む。

【0073】

別の局面において、本発明は、試料中のPSP94の総量を測定するための方法を提供し、前記方法は、PSP94が、他のポリペプチド（例えば、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、および配列番号9、変異体、断片、および類似体）に、結合し

10

20

30

40

50

ている時でさえ、P S P 9 4 を認識することができる抗体と、前記試料を接触させることを含むことができる。発明のこの局面は、一以上の工程を行わなければいけない、もしくは行わない、という事に関係無く、この工程を含む、任意の方法を包含する。

【0074】

一実施態様において、試料中のP S P 9 4 の総量を測定する際に用いられることができる抗体は、例えば、A T C C に特許寄託番号P T A - 4 2 4 1として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体であることができ、または、P S P 9 4 の遊離および結合型を認識することができるポリクローナル抗体であることができる。

【0075】

前記で意図された試料中のP S P 9 4 の全体（遊離（未結合）および結合）の量を測定するための方法は、以下の工程を含むことができる；

a) P S P 9 4 - 抗体を、適切な基材（E L I S A プレート、マトリックス、S D S - P A G E、ウエスタンブロット膜）に固定化する（被覆する、吸着させる）こと。抗体は、P S P 9 4 を、P S P 9 4 結合タンパク質（配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9など）に結合している時でさえ、認識することができる；

b) P S P 9 4 を含む試料を加えること、および、

c) 標識またはマーカを含むP S P 9 4 検出試薬を加えること、および；

d) 標識またはマーカから得られるシグナルを検出すること。

【0076】

この方法の工程c)において用いられることができる適切な検出試薬の例は、P S P 9 4 に対する親和性を有する抗体およびポリペプチドを含む。しかしながら、検出試薬は、好ましくは、P S P 9 4 抗体およびP S P 9 4 結合タンパク質とは異なる結合部位を有するであろう。検出試薬は、標識（またはマーカ）に直接的に結合させる（例えば、本発明の抗体接合物）、または、前記標識またはマーカを担持する（接合させた）第二の分子によって認識させることができる。

【0077】

工程a)において用いられることができるP S P 9 4 抗体の例は、A T C C に特許寄託番号P T A - 4 2 4 1として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産される抗体（P 1 E 8）である。その場合、検出試薬は、例えば、A T C C に特許寄託番号P T A - 4 2 4 0として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産される抗体（2 D 3）（例えば、抗体接合物）、または、任意の他の適切なP S P 9 4 抗体であることができる。

【0078】

ここで、P S P 9 4 の遊離および結合型を認識することができるポリクローナル抗体（一つ以上のポリクローナル抗体）が、ここに記載された任意のモノクローナル抗体と組み合わせ、工程a)またはc)のいずれにも適しているであろうことが理解されるべきである。例えば、全てのP S P 9 4 は、ポリクローナル抗体（P S P 9 4 の遊離および結合型を認識することができる抗体）で捕らえることができ、そして、検出を、P 1 E 8などの他の抗体で、（直接的または間接的に）行なうことができる（逆の場合も同様である）。

【0079】

さらに、全てのP S P 9 4 は、例えば、ポリクローナル抗体、または、（ハイブリドーマ細胞系P T A - 4 2 4 1によって生産される）P 1 E 8抗体など、遊離および結合（例えば、ここに記載されたように、P S P 9 4 結合タンパク質に結合した）型のP S P 9 4 を認識することができる抗体で、捕捉されることができ、そして、捕捉されたタンパク質（複合体）の検出は、二つ以上の抗体の組み合わせ、すなわち、一つは、遊離P S P 9 4 を検出することができ（例えば、ハイブリドーマ細胞系P T A - 4 2 4 0によって生産される2 D 3）、かつ、一つ以上の抗体が、P S P 9 4 結合タンパク質を検出することができる（例えば、ハイブリドーマ細胞系P T A - 4 2 4 3によって生産される1 7 G 9；および/または、ハイブリドーマ細胞系P T A - 4 2 4 2によって生産される3 F 4）で行

10

20

30

40

50

なうことができる。

【0080】

更に別の局面において、本発明は、試料中の遊離 P S P 9 4 の量を測定するための改善された方法であって、(例えば、遊離型の) P S P 9 4 を認識することができる抗体と、前記試料を、接触させることを含む方法を提供する。

【0081】

本発明の一実施態様において、適切な抗体は、例えば、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、および、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体を含むことができる。しかしながら、1 2 C 3 抗体(表 1 0)など、別の適した抗体が、本発明によって、包含される。

10

【0082】

更なる局面において、本発明は、試料中の遊離(未結合 P S P 9 4) P S P 9 4 (および/または、P S P 9 4 断片およびその類似体)の量を測定するための改善された方法であって、P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質複合体不含試料を、P S P 9 4、P S P 9 4 断片およびその類似体を認識することができる抗体と接触させることを含む方法を提供する。例えば、試料中の遊離 P S P 9 4 の量を測定するための改善された方法は、

a) P S P 9 4 と、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドのいずれか一つとによって形成される複合体を、除去すること、複合体不含試料を生成すること、および;

20

b) 前記複合体不含試料を、P S P 9 4 を認識することができる抗体と接触させること、を含むことができる。

【0083】

ここで意図される試料中の遊離(未結合 P S P 9 4) P S P 9 4 の量を測定するための改善された方法は、例えば、以下の工程;

a) P S P 9 4 と、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、変異体、断片類似体、およびその組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドのいずれか一つとによって形成される複合体を、除去すること、(例えば、ここに記載された方法を用いて)複合体不含試料を生成すること、

30

b) P S P 9 4 抗体を、適切な基材(E L I S A プレート、マトリックス、S D S - P A G E、ウエスタンプロット膜)に、固定化する(被覆する、吸着させる)こと、

c) 遊離(未結合) P S P 9 4 を含む前記複合体不含試料を加えること、

d) 標識またはマーカを含む(P S P 9 4)検出試薬を加えること、および、

e) 標識またはマーカに由来するシグナルを検出すること、

も含むことができる。

【0084】

本発明において用いられることができる適した検出試薬の例は、抗体および P S P 9 4 に対する親和性を有するポリペプチドからなる群から選択される試薬である。検出試薬は、P S P 9 4 抗体とは異なる結合部位を有することができ、そして、検出試薬は、直接的に標識(またはマーカ)に結合させる、または、前記標識もしくはマーカを担持する(接合させた)第二の分子によって認識させることができる。

40

【0085】

工程 b) で用いられる P S P 9 4 抗体の例は、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(2 D 3)である。その場合、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(P 1 E 8)(例えば、接合させた)を、(ここに記載されたように、直接的または間接的に)検出試薬として用いることができる。

【0086】

50

工程 b) において用いられることができる P S P 9 4 抗体の別の例は、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体 (P 1 E 8) である。その場合、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体 (2 D 3) (例えば、接合させた) を、(ここに記載されたように、直接的または間接的に) 検出試薬として用いることができる。

【 0 0 8 7 】

更なる局面において、本発明は、試料中の全 P S P 9 4 (結合および未結合 (遊離)) の量を測定するための方法に関し、方法は、P S P 9 4 が、別のポリペプチド (例えば、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9) に、結合している時でさえ、P S P 9 4 に結合することができる第一および第二の抗体を用いることを含むことができる。第一および第二の抗体が、異なる P S P 9 4 エピトープに結合することが好ましいであろう。

10

【 0 0 8 8 】

また、更なる局面において、本発明は、試料中の全 P S P 9 4 を測定するための方法であって、第一および第二の抗体を用いることを含み、前記第一の抗体は、P S P 9 4 がポリペプチドに結合している時でさえ、P S P 9 4 に結合することができ、そして、前記第二の抗体は、P S P 9 4 に結合することができ、かつ、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 からなる群から選択されるポリペプチドのいずれか一つを、P S P 9 4 と前記ポリペプチドとによって形成される複合体から、外すことができる方法にも関する。

20

【 0 0 8 9 】

本発明の一実施態様において、第一の抗体は、例えば、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、または、任意のほかの適した抗体であることができる。第二の抗体は、例えば、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 0 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体であることができる。

【 0 0 9 0 】

更なる局面において、本発明は、試料中の P S P 9 4 のレベル (量、濃度) を測定するための方法であって、遊離および結合型の (例えば、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 などに結合した) P S P 9 4 を認識することができる抗体と、前記試料を接触させることを含む方法を提供する。

30

【 0 0 9 1 】

本発明の一実施態様において、A T C C に特許寄託番号 P T A - 4 2 4 1 として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体を用いることができる。

【 0 0 9 2 】

ここに記載された (例えば、全ての P S P 9 4、遊離 P S P 9 4、遊離もしくは全ての P S P 9 4 結合タンパク質を測定し、そして、割合を算出する) 方法は、臨床試料 (血清、血液、血漿など) に適用され、P S P 9 4 の異常な、または、増大したレベルに関連した状態 (例えば、前立腺癌 (例えば、放射線治療後の前立腺癌において、再発しない期間の予測)) について被験体をスクリーニングするために、および、例えば、前立腺癌であると診断された被験体における予後を評価するために、有用であるであろう。例えば、前立腺癌を有する個体における全 P S P 9 4 のレベル (または、遊離 P S P 9 4 / 全 P S P 9 4、または、全 P S P 9 4 結合タンパク質の割合) が、対照の被験体と比べて、高ければ高いほど、予後が悪くなる、または、(進展した再発の) 前立腺癌を有する可能性が高くなること、見出されるであろう。さらに、増大したレベルの全 P S P 9 4 (または、ここに記載した他のパラメーター) が、被験体において観察される場合、それが、被験体における前立腺癌の前兆 (または暗示) であることがある。このように、前立腺癌 (または、P S P 9 4 もしくは P S P 9 4 結合タンパク質の異常な、もしくは増大したレベルに

40

50

関連した他の任意の状態)について、被験体をスクリーニングするための診断および予後方法も、本発明によって、包含される。

【0093】

所望もしくは必要ならば、本発明の方法は、試料；例えば、PSP94の増大したレベルに関連した状態、もしくは、他の状態を有する、個体由来の血液試料を、回収して、前記方法および分析を行なう工程も含むことができる。

【0094】

本発明の方法は、さらに、前記分子(抗体、ポリペプチド)によって供与された(担持された)標識(例えば、分子に結合させる標識)から、もしくは、前記標識を担持する第二の分子(抗体または結合/リガンドシステム)によって供与される(担持された)標識から、シグナルを検出することを含むことができる。

10

【0095】

本発明の方法は、試料に関して得られるシグナル(結果)を、興味のあるポリペプチドの既知量を含む対照試料に関して得られるシグナル(結果)と、比較(検出)することを含むこともできる。

【0096】

更なる局面において、本発明は、PSP94の増大したレベルを伴う状態の処置のためのPSP94抗体の使用に関する。PSP94抗体を投与することを含む、そのような状態の患者を処置する方法も、ここに包含されると理解されるべきである。

【0097】

また、さらなる局面において、本発明は、PSP94の増大したレベルを伴う状態の処置のための薬剤の製造におけるPSP94抗体の使用に関する。

20

【0098】

PSP94抗体は、例えば、ATCCに特許寄託番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体、または、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体であることができる。

【0099】

試料は、ここでは、血液、血清、血漿、生物学的液体のアリコートとして理解されるべきであり、あるいは、例えば、ELISAプレートのウェル、膜、ゲル、マトリックスなどに結合した(他の成分を含む、または、含まない)タンパク質であることができる。

30

【0100】

また、更なる局面において、本発明は、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9に記載のポリペプチド、ATCCに特許寄託番号PTA-4240として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(2D3)、ATCCに特許寄託番号PTA-4241として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(P1E8)、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(3F4)、および、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(17G9)からなる群から選択される分子の、試料中における、(遊離、および/または、結合、および/または、全ての)PSP94、PSP94変異体、および、その類似体の量を評価するための使用に関する。

40

【0101】

本発明によると、ここに記載された方法および使用に意図される状態は、例えば、前立腺癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、卵巣癌、上皮分泌細胞の他の癌、および良性の前立腺肥大(BPH)を含むことができる。

【0102】

ここでは、他の抗体が、ここで記載された方法に、用いられることができる(適している)と、理解されるべきである。例えば、表10に列挙されたPSP94結合タンパク質特異抗体は、交換可能であり、(それらのハイブリドーマ細胞系を含む)本発明によって

50

包含される。例えば、ATCCに特許寄託番号PTA-4242として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(3F4)は、モノクローナル抗体2B10、9B6、1B11などと交換可能であることができ、そして、ATCCに特許寄託番号PTA-4243として寄託されたハイブリドーマ細胞系によって生産されるモノクローナル抗体(17G9)は、モノクローナル抗体p8C2、1B11、26B10、9B6などと交換可能であることができる。様々な他の状態が可能である。しかしながら、この方法を行なうために二つの抗体が必要とされる場合、異なるエピトープに結合する抗体を選択することが好ましい。

【0103】

また、ここで開示された任意の(モノクローナル)抗体の抗原結合断片(例えば、抗原結合部位)など、抗体断片が、本発明によって包含されることも、ここで理解されるべきである。

【0104】

一般的な分子生物学および定義

他に示さなければ、本発明において使用された組換えDNA技術は、当業者に知られた標準的な方法である。そのような技術の例は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John WileyおよびSons(1984); J. Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory出版社(1989); T. A. Brown(編集者)、Essential Molecular Biology; A Practical Approach, 1および2巻、IRL出版社(1991); D. M. GloverおよびB. D. Hames(編集者)、DNA Cloning; A Practical Approach, 1~4巻、IRL出版社(1995および1996); および、F. M. Ausubel等(編集者)、Current Protocols in Molecular Biology, Greene出版協会およびWiley-Interscience(1988、現在までの全ての改訂版を含む)などの出典文献において説明され、そして、参照によってここに組み込まれる。

【0105】

「ポリヌクレオチド」は、一般的に、修飾されていないRNAまたはDNA、または修飾されたRNAまたはDNAであることができる、任意のポリヌクレオチドもしくはポリデオキシリボヌクレオチドを指す。「ポリヌクレオチド」は、限定されずに、一本および二本鎖DNA、一本および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本および二本鎖RNA、および一本および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、もしくは、より典型的には、二本鎖もしくは一本および二本鎖領域の混合物であることができるDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を含む。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNA、または、DNA、または、RNAおよびDNAの両方を含む、三本鎖領域を指す。用語ポリヌクレオチドは、一つ以上の修飾された塩基を含むDNAまたはRNA、および、安定性または他の理由のために修飾されたバックボーンを有するDNAまたはRNAも含む。「修飾された」塩基は、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの普通でない塩基を含む。様々な修飾が、DNAおよびRNAになされ; このように、「ポリヌクレオチド」は、典型的には天然で見出されるポリヌクレオチドの化学的、酵素的、または代謝的に修飾された型、ならびに、ウィルスおよび細胞のDNAおよびRNA特性の化学的型を包含する。「ポリヌクレオチド」は、限定されないが、直鎖状および末端が閉じた分子を含む。また、「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドとして称される比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

【0106】

それゆえ、本発明によると、ポリヌクレオチドは、例えば、ポリリボヌクレオチド、ポリデオキシリボヌクレオチド、修飾されたポリリボヌクレオチド、修飾されたポリデオキシリボヌクレオチド、相補的ポリヌクレオチド(例えば、アンチセンス)またはその組み

10

20

30

40

50

合わせであることができる。

【0107】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合（すなわち、ペプチド等量線）によって、互いに接合された二つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を指す。「ポリペプチド」は、一般的には、ペプチド、オリゴペプチド、またはオリゴマーと称される短鎖、および、通常、タンパク質と称される長鎖の両方を指す。上記のように、ポリペプチドは、遺伝子コードされた20アミノ酸以外のアミノ酸を含むことができる。

【0108】

ここで用いられる用語「変異体」は、基準ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは、各々、異なるが、本質的な特性は保持する、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。典型的なポリヌクレオチド変異体は、ヌクレオチド配列が、他のもの、基準ポリヌクレオチドと異なる。変異体のヌクレオチド配列における変化により、基準ポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドのアミノ酸配列を、変える、または、変えないことができる。ヌクレオチドの変化により、ここで論じられたように、基準配列によってコードされたポリペプチドにおけるアミノ酸置換、付加、欠失、融合およびトランケーション（切断）を生じることがある。典型的なポリペプチド変異体は、アミノ酸配列が、他のもの、基準ポリペプチドと異なる。一般的に、違いは、基準ポリペプチドと変異体の配列が、全般的に酷似し、かつ、多くの領域で同一であるように、限定される。変異体および基準ポリペプチドは、アミノ酸配列において、一以上の置換、付加、欠失、またはその任意の組み合わせによって、異なることができる。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされたものであること、または、コードされたものではないことができる。変異ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、対立遺伝子変異体など、自然に生じたものであることができ、あるいは、天然に生じることが知られていない変異体であることができる。非自然的に生じるポリヌクレオチドおよびポリペプチド変異体は、突然変異生成技術または直接合成によって、作ることができる。ここで用いられる「変異体」は、（活性）突然変異体、類似体、相同体、キメラ、断片およびその一部を包含する。しかしながら、ここで用いられる「変異体」は、もともとのポリペプチドの生物活性の一部を保持することができる。

【0109】

ここで用いられるように、「薬学的組成物」は、適切な希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、および/または、担体と共に、治療的に有効な量の薬品を、を意味する。ここで用いられる「治療的に有効な量」は、所定の状態および投与計画に対して治療効果をもたらす量を指す。そのような組成物は、液体、または、凍結乾燥させた、または他の乾燥させた製剤であり、かつ、様々な緩衝成分（例えば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pH、および、イオン強度の希釈剤、表面への吸着を防ぐためのアルブミンまたはゼラチンなどの添加剤、界面活性剤（例えば、ツイーン20、ツイーン80、ブルニックF68、胆汁酸塩）、可溶化剤（例えば、グリセロール、ポリエチレングリセロール）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタバイスルファイトナトリウム）、防腐剤（例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン）、充填物質、または張性調節剤（例えば、ラクトース、マンニトール）、タンパク質へのポリエチレングリコールなどのポリマーの共有結合、金属イオンとの錯化、または、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなどの重合化合物の粒状製剤中もしくは上への、もしくは、リボソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層または複層のベシクル、赤血球影、もしくは、スフェロプラスト上への、物質の取り込み、を含む。そのような組成物は、物理状態、可溶性、安定性、in vivo遊離速度、および、in vivoクリアランスに影響を及ぼすであろう。制御された、もしくは、持続性の遊離組成物は、親油蓄積物（例えば、脂肪酸、ワックス、油）中の製剤を含む。ポリマー（例えば、ポロキサマーまたはポロキサミン）によって被覆された特定の組成物も、発明に包含される。発明の組成物の他の実施態様は、腸管外、肺、鼻および口経路を含む、様々な投与経路のための、特定の型の保護被覆剤、プロテアー

10

20

30

40

50

ゼ阻害剤、または、浸透増強剤を組み込む。一実施態様において、薬学的組成物は、腸管外的、傍癌的、経粘膜的、経皮的、粘膜内の、静脈内の、皮内の、皮下の、腹腔内の、脳室内的、頭蓋内の、および腫瘍内に投与される。

【0110】

ここで用いられる「免疫化組成物」または「免疫原性組成物」は、そのような組成物を受け入れる宿主における免疫反応を促進することができる組成物を指す。「免疫化組成物」は、例えば、抗体を探索するポリペプチド（または、ポリペプチドをコードすることができるDNAまたはRNA）などの化合物を含む。ポリペプチドは、通常、緩衝剤、希釈剤、または薬学的に許容可能な担体中に、希釈される。「免疫化組成物」は、完全フロイドアジュバント、不完全フロイドアジュバント、および水酸化アルミニウムなどのアジュバントを含むことができる。

10

【0111】

さらに、ここに用いられる「薬学的に許容可能な担体」または「薬学的担体」は、当該分野において公知であり、限定されないが、0.01~0.1M、好ましくは0.05Mリン酸緩衝液、または0.8%生理食塩水を含む。さらに、そのような薬学的許容可能な担体は、水性もしくは非水性溶剤、懸濁液、および乳濁液であることができる。非水性溶剤は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体は、水、アルコール性/水性溶液、生理食塩水および緩衝媒体を含む、乳濁液または懸濁液を含む。腸管外ビヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲルオルフィックス（*o r f i x e d*）油を含む。静脈内ビヒクルは、体液および栄養補充剤、リンゲルデキストロースなどに基づいた電解質補充剤などの電解質補充剤を含む。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、照合剤、不活性ガスなど、防腐剤および他の添加剤も、存在することができる。

20

【0112】

ここで用いられるように、「PSP94結合タンパク質」は、通常、可逆の様式で、PSP94に、結合（すなわち、会合）することができるタンパク質（配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9、など）に関する。

【0113】

ここで用いられるように、用語「遊離PSP94」は、他のポリペプチドと会合していないPSP94タンパク質に関する。用語「遊離PSP94」は、PSP94が未結合型（状態）であることを意味する。

30

【0114】

ここで用いられるように、用語「抗体」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、Fc、F(ab)2、F(ab)2'、およびFabなどを含む抗体断片のいずれかを指す。

【0115】

ここで用いられるように、用語「抗原結合断片」は、興味のある抗原を認識（結合）することができる抗体断片（抗原結合領域）を指す。「抗原結合断片」は、分子生物学的方法を用いて、抗体をコードする遺伝子（例えば、可変領域をコードする遺伝子）から単離されることができる。単離された遺伝子は、例えば、一本鎖抗体を作るように設計されていることができる。

40

【0116】

ここで用いられるように、「PSP94」は、天然および組換えPSP94に関する。

【0117】

遺伝子（cDNA）クローニングおよびタンパク質発現

同定および単離された遺伝子（すなわち、ポリヌクレオチド）は、適切なクローニングもしくは発現ベクター（すなわち、発現システム）に挿入することができる。当該分野において公知の多数のベクター宿主システムを用いることができる。可能なベクターは、限定されないが、プラスミドまたは修飾されたウィルス（例えば、バクテリオファージ、ア

50

デノウイルス、アデノ関連随伴ウイルス、レトロウイルス)を含むが、ベクターシステムは、用いられる宿主細胞と適合できなければならない。クローニングベクターの例は、限定されないが、大腸菌 (*E. coli*)、ラムダ派生体などのバクテリオファージ、または、pBR322派生体またはpUCプラスミド派生体(例えば、pGEXベクター、pMAL-c、pFLAGなど)などのプラスミドを含む。発現ベクターの例は、以下に論じられている。クローニングもしくは発現ベクターへの挿入は、例えば、相補的な付着末端を有するクローニングベクターにDNA断片を結紮することによって、成し遂げることができる。しかしながら、DNA断片に用いられた相補的な制限酵素認識部位がクローニングベクター中に存在しない場合、DNA分子の末端を、酵素的に改変することができる。あるいは、所望された任意の部位を、DNA末端にヌクレオチド配列(リンカー)を結紮することによって、作り出すことができ;これらの結紮されたリンカーは、制限酵素認識配列をコードする、特定の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを含むことができる。組換え分子は、宿主細胞に、形質転換、トランスフェクション、リポフェクション、感染、エレクトロポレーションなどによって、挿入することができる。クローン化された遺伝子は、クローニング細胞、例えば大腸菌、における増殖をもたらし、適切な発現細胞系への次の挿入のために、精製を、そのようなことが所望されれば、容易にする、シャトルベクタープラスミドに含ませることができる。例えば、一種類を超える生物体で、複製することができるベクターである、シャトルベクターは、大腸菌およびサッカロマイセス・セレヴィシエの両方における複製のために、大腸菌プラスミド由来の配列を、酵母2.m.u.プラスミド由来の配列と連結することによって、調製することができる。

【0118】

ここで、本発明のポリヌクレオチド(例えば、遺伝子、cDNA、RNA)は、適切なベクター中に挿入されると、例えば、単離のために、外来宿主細胞(細菌、酵母、昆虫、動物または植物細胞など)に、または、遺伝子治療処置もしくは(例えば、樹状細胞を用いた)細胞介在予防接種を目的として、個体由来の(単離された)細胞に、タンパク質を発現する手段として、用いられることができると理解されるべきである。例えば、細胞は、哺乳動物から単離することができ、そして、同じ個体または適合できる個体に再度注入する前に、本発明のポリヌクレオチド(cDNA、遺伝子、RNA、アンチセンス)を用いて、*ex-vivo*で処置する(例えば、さらず、トランスフェクションする、リポフェクションする、感染させる(高速マイクロプロジェクティルを用いて)衝撃を与える)ことができる。*in vivo*のポリヌクレオチドの送達は、前記した以外の方法によって行なうことができる。例えば、注入時のリポソームの形成も、ポリヌクレオチドの*in vivo*送達を媒介するのに適しているであろう。

【0119】

任意の広範囲の発現システムを、組換えポリペプチド(タンパク質)を提供するために用いることができる。用いられる明確な宿主細胞は、発明にとって重要でない。本発明のポリペプチドは、原核生物宿主(例えば、大腸菌、バシラス・サチリス(*B. subtilis*)または真核生物宿主(酵母、例えば、サッカロマイセスまたはピキア・パストリス(*Pichia Pastoris*);哺乳動物細胞、例えば、サルCOS細胞、マウス3T3細胞(Todarog JおよびGreen H., *J. Cell Biol.* 17:299-313, 1963)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)(例えば、Puck TT等、*J. Exp. Med.* 108:945-956, 1958))、BHK、ヒト腎臓293細胞(例えば、ATCC:CRL-1573)、またはヒトHEL細胞(例えば、ATCC:CCL-2)、または昆虫細胞)で発現させることができる。

【0120】

ピキア・パストリス(*P. Pastoris*)などの酵母細胞発現システムでは、本発明のポリペプチドをコードするDNA配列は、pPIC9ベクター(*Invitrogen*)などの適切な発現ベクター中にクローニングすることができる。本発明のポリペプチドの全て、もしくは、一部をコードするDNA配列を含むベクターの、*P. Pastor*

is 宿主細胞への導入時に、例えば、A O X 1 座に組換え事象が起こることがある。そのような組換え事象により、本発明のポリペプチドのDNA配列が、A O X 1 遺伝子プロモーターの依存下に置かれることがある。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子（すなわち、DNA配列）の成功した挿入によって、宿主細胞の成長培地に加えられたメタノールにより、制御および/または誘導される、前記ポリペプチドの発現がもたらされるであろう（Buckholz, R. G. および Gleeson, M. A. G., *Biotechnology*, 9: 1067-1072, 1991; Cregg, J. M. 等, *Biotechnology*, 11: 905-910, 1993; Sreekrishna, K 等, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278, 1988; Wegner, G. H., *FEMS Microbiology Reviews*, 87: 279-284, 1990を参照）。

【0121】

哺乳動物宿主細胞において、多くのウイルスに基づいた発現システムが利用できる。例えば、本発明のポリペプチドの発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合、核酸配列を、アデノウイルスの転写/翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーターおよびトリパータイトリーダー配列）に結紮することができる。このキメラ遺伝子を、アデノウイルスゲノムに、例えば、*in vitro*、もしくは、*in vivo*での組換えによって、挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域E1もしくはE3）への挿入により、感染させた宿主において、生存でき、かつ、本発明のポリペプチドを発現することができる組換えウイルスを得ることができる。

【0122】

本発明のタンパク質およびポリペプチドは、植物細胞によって、生成させることもできる。カリフラワーモザイクウイルスおよびタバコモザイクウイルスなどの発現ベクター、および、プラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）を、植物細胞におけるポリペプチドの発現のために用いることができる。そのような細胞は、広範囲の供給源（例えば、American Type Culture Collection, Rockland, Md.）から入手できる。形質転換もしくはトランスフェクションの方法、および発現ビヒクルの選択は、もちろん、選択される宿主細胞に応じて、選択されるべきである。

【0123】

スポドプテラ・フルギベルダ細胞で増殖する、オートグラフィア・カリフォルニア（*Autographa californica*）核多角体病ウイルス（AcNPV）などの昆虫細胞発現システムにおいて、AcNPVは、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA配列を、ウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）にクローニングし、AcNPVプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に置くことができる。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子（すなわち、DNA配列）の成功した挿入により、ポリヘドリン遺伝子の不活性化と、非閉塞組換えウイルス（すなわち、ポリヘドリン遺伝子によってコードされたタンパク質の被覆を欠くウイルス）の生成をもたらすであろう。これらの組換えウイルスは、挿入された遺伝子を発現するスポドプテラ・フルギベルダ細胞を感染させるために、用いることができる。

【0124】

さらに、宿主細胞は、挿入された配列の発現を調節する、または、特定の所望された様式に、遺伝子産物を修飾する、もしくはプロセッシングするための性能によって、選択されることができる。そのようなタンパク質産物の修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセッシング（例えば、開裂）は、タンパク質の機能に重要であることがある。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセッシング、および、タンパク質および遺伝子産物の修飾に関して、特性および特異的なメカニズムを有する。もちろん、細胞系または宿主システムは、発現された外来タンパク質の所望された修飾とプロセッシングを確実にするために、選択されることができる。このために、一次転写産物の適切なプロセッシング、グリコシル化、および、遺

10

20

30

40

50

伝子産物のリン酸化のための細胞機構を有する真核生物宿主細胞を用いることができる。そのような哺乳動物の宿主細胞は、例えば、限定されないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、および3T3を含む。

【0125】

あるいは、本発明のポリペプチドは、安定的にトランスフェクトした哺乳動物細胞系によって生産させることができる。哺乳動物細胞の安定的なトランスフェクションに適した多くのベクターは、一般に入手することができる；そのような細胞系を構築するための方法も、公に入手することができる。一例において、rHuPSP94タンパク質をコードするcDNAを、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子を含む発現ベクターにクローニングすることができる。宿主細胞染色体への、プラスミドの組み込み、および、それゆえ、本発明のポリペプチドのDNA配列の組み込みは、細胞培養培地中にメトトレキサートを含ませることによって、選択することができる。この選択は、殆どの細胞型で行なうことができる。

10

【0126】

また、特定の開始シグナルが、前記適切な発現ビヒクルに挿入されたDNA配列の有効な翻訳のために必要とされることがある。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接配列を含むことがある。例えば、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはcDNAが、それら自身の開始コドンおよび隣接配列を有さない場合、更なる翻訳制御シグナルが必要とされるであろう。例えば、おそらく、ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが、必要とされるであろう。当該分野において、開始コドンは、所望のポリペプチドの適切な翻訳を確実にするために、ポリペプチド配列のリーディングフレームと一致していなければならないことが知られている。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方を含む、様々な由来のものであることができる。発現効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターを含めることによって、高めることができる。転写、翻訳シグナルは、所望された発現形態とレベルを供するように、特に設計されることができる(例えば、特定の誘導因子を必要とするであろうシグナル、所定の細胞種もしくは特定の時間枠内で、発現を許容するであろうシグナル)。しかしながら、これらのシグナルは、しばしば、所望された宿主細胞でのポリペプチドの発現を可能にするプロモーターを含む、発現ベクターによって提供されることができる。

20

【0127】

ポリペプチドの修飾(突然変異体、変異体、類似体、相同体、キメラおよび部分/断片)認識されるように、本発明のポリペプチドおよび断片に、ポリペプチドもしくは断片の生物活性に有害な影響を及ぼすことなく、多くの修飾をなすことができる。本発明のポリペプチドは、例えば、翻訳後プロセッシングなどの自然の過程、または、当該分野において知られている化学的修飾技術のいずれかによって、修飾されたアミノ酸配列を含むものなどを含む。修飾は、ポリペプチドバックボーン、アミノ酸側鎖、および、アミノもしくはカルボキシ末端を含む、ポリペプチドの任意の場所に生じることがある。同じ種類の修飾が、所定のポリペプチドの幾つかの部位で、同じもしくは異なる程度で存在することがあることが認識されるであろう。また、所定のポリペプチドが、多くの種類の修飾を含むことがある。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として、分岐されることがあり、そして、分岐を有する、もしくは有さない環状であることがある。環状、分枝状、および分枝環状ポリペプチドが、翻訳後の自然の過程の結果得られることがあり、または、合成方法によって、作られることがある。修飾は、例えば、限定なしに、アセチル化、アシル化、アセトミドメチル(Acm)基の付加、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンへの共有結合、ヘム部分への共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、二硫化結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタマートの形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化およびユビキチン化など

30

40

50

のタンパク質への転移RNA介在アミノ酸付加を含む(Protein-structure and molecular properties、第二版、T.E.Creighton、W.H.Freeman and Company、New York、1993を参照)。

【0128】

他の種類のポリペプチド修飾は、例えば、そのような変化が、ポリペプチドの全生物活性を実質的には変えないポリペプチド配列において、保存的または非保存的(例えば、D-アミノ酸、脱アミノ酸)のいずれかである、アミノ酸挿入(すなわち、付加)、欠失、および、置換(すなわち、置き換え)、を含むことができる。本発明のポリペプチドは、例えば、生物学的に活性な当然変異体、変異体、断片、キメラ、および類似体を含み；断片は、一つ以上のアミノ酸のトランケーションを有するアミノ酸配列であって、該トランケーションが、アミノ末端(N-末端)、カルボキシ末端(C-末端)から、または、タンパク質の内部から、生じるであろう、アミノ酸配列を包含する。発明のポリペプチド類似体は、一つ以上のアミノ酸の挿入もしくは置換を含む。変異体、突然変異体、断片、キメラ、および、類似体は、本発明のポリペプチドの生物学的特性を有するであろう。

10

【0129】

さらに、ポリペプチドが、合成的に作られる場合、DNAによって自然にはコードされないアミノ酸による置換もなされることがあることに、留意されるべきである。例えば、代替残基は、式、 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 、式中、 n は2~6である、のオメガアミノ酸を含む。これらは、サルコシン、*t*-ブチルアラニン、*t*-ブチルグリシン、*N*-メチルイソロイシン、および、ノルロイシンのように、中性の無極性アミノ酸である。フェニルグリシンは、トリプトファン、チロシン、またはフェニルアラニンと置換することができ；シトルリンおよびメチオニンスルホキシドは、中性の無極性であり、システイン酸は酸性であり、オルニチンは塩基性である。プロリンは、ヒドロキシプロリンで置換することができ、特性を与える構造を保持することができる。

20

【0130】

当該分野において、突然変異体または変異体は、置換突然変異生成によって、生成することができ、本発明のポリペプチドの生物活性を保持することが、知られている。これらの変異体は、タンパク質分子における少なくとも一つのアミノ酸残基が除去され、その箇所に異なる残基が挿入されている。例えば、置換突然変異生成のための興味ある一部位は、限定されないが、活性部位または免疫部位として同定された部位を含むであろう。興味ある他の部位は、例えば、様々な種から得られる特定の残基が一致する部位であろう。これらの位置は、生物活性に重要であろう。「保存的置換」として同定された置換の例は、表1に示す。そのような置換により、望ましくない変化が生じた場合、次に、表1で「典型的な置換」と称された、あるいは、ここに、アミノ酸の種類として更に記載された、別の種類の置換を、挿入し、生成物をスクリーニングする。

30

【0131】

置換の例は、保存的である(すなわち、残基が、同じ一般型の別のものによって置換されている)ものであることができる。理解されるように、天然に生じるアミノ酸は、酸性、塩基性、中性かつ極性、または、中性かつ無極性として、下位区分されることができる。さらに、コードされたアミノ酸の三つは、芳香族である。本発明の決定されたポリペプチドと異なる、コードされたポリペプチドが、置換されたアミノ酸と同じ群に由来するアミノ酸に対応する置換されたコドンを含むことが有用であろう。このように、いくつかの場合において、塩基性アミノ酸のリジン(Lys)、アルギニン(Arg)、およびヒスチジン(His)が、交換可能であることがあり；酸性アミノ酸のアスパラギン酸(Asp)およびグルタミン酸(Glu)が交換可能であることがあり；中性極性アミノ酸のセリン(Ser)、スレオニン(Thr)、システイン(Cys)、グルタミン(Gln)、およびアスパラギン(Asn)が交換可能であることがあり；無極性脂肪族アミノ酸のグリシン(Gly)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、イソロイシン(Ile)、およびロイシン(Leu)が交換可能であるが、大きさのため、GlyとAlaが、最

40

50

も密接に関係し、そして、Val、Ile、およびLeuが、互いにより密接に関係し、そして、芳香族アミノ酸のフェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、およびチロシン(Tyr)が交換可能であることがある。

【0132】

【表1】

好ましいアミノ酸置換

元の残基	典型的な置換	保存的な置換
Ala (A)	Val、Leu、Ile	Val
Arg (R)	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn (N)	Gln、His、Lys、Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys (K)	Arg、Gln、Asn	Arg
Met (M)	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe (F)	Leu、Val、Ile、Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、ノルロイシン	Leu

10

20

30

【0133】

いくつかの場合において、アミノ酸置換、挿入、または欠失により、ポリペプチドの生物活性を修飾することが、興味深いかもしれない。例えば、ポリペプチドの修飾は、ポリペプチドの生物活性を増加する、その毒性を調節する、生物学的利用能もしくは安定性における変化をもたらす、または、免疫活性もしくは免疫学的同一性を調節する、ことがある。機能もしくは免疫学的同一性における実質的な修飾は、(a)例えば、シート状もしくは螺旋状構造のように、置換領域におけるポリペプチドバックボーンの構造、(b)標的部位の分子の電荷もしくは疎水性、または、(c)側鎖の容積、を、保持する効果が有意に異なる置換を、選択することによって、行なわれる。天然に生じる残基は、一般的な側鎖の特性に基づいた群に分類される：

40

(1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン(Met)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)

50

- (2) 中性親水性：システイン (Cys)、セリン (Ser)、スレオニン (Thr)
 (3) 酸性：アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)
 (4) 塩基性：アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)、ヒスチジン (His)、リジン (Lys)、アルギニン (Arg)
 (5) 鎖の配向に影響する残基：グリシン (Gly)、プロリン (Pro)；および
 (6) 芳香族：トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)。

【0134】

非保存的な置換は、これらの分類の一つのメンバーを、別のものと取り替えることを必要とするであろう。

10

【0135】

突然変異ポリペプチドは、アミノ酸残基の欠失（例えば、トランケーション）、挿入（例えば、付加）、または置換である、一つ以上の突然変異を有するであろう。突然変異は、天然に生じる（すなわち、天然源から精製もしくは単離される）、または、合成（例えば、コードしているDNAにおける特定部位突然変異誘発を行なうことによる、または、化学合成などの他の合成方法によってなされた）のいずれかのものであることができる。このように、発明のポリペプチドが、天然に生じる、または、組換え体（すなわち、組換えDNA技術から調製される）のいずれかのものであり得ることは明らかである。

【0136】

当業者に公知の方法（例えば、Smith, T. F. および Waterman M. S. (1981) Ad. Appl. Math., 2: 482 - 489 または Needleman, S. B. および Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol., 48: 443 - 453 によって記載された方法）によって測定される場合、本発明のポリペプチドと少なくとも50%一致するタンパク質が、本発明のタンパク質と、少なくとも70%または80%、より好ましくは少なくとも90%一致するタンパク質と同様に、発明に含まれる。これは、一般的には、少なくとも5、好ましくは、少なくとも20連続アミノ酸領域にわたるであろう。

20

【0137】

アミノ酸配列変異体は、DNAに適切なヌクレオチド変化を導入する、または、所望するポリペプチドのin vitro合成によって調製することができる。そのような変異体は、例えば、アミノ酸配列内残基の欠失、挿入、または置換を含む。最終タンパク質産物が、所望された特性を有するならば、最終構築物に達するように、欠失、挿入、および置換の組み合わせをなすことができる。また、アミノ酸変化により、グリコシル化部位の数または位置を変える、膜アンカー特性を変える、挿入、欠失、もしくは、天然タンパク質の膜貫通配列に影響を及ぼすことにより、細胞内局在を変える、または、タンパク質分解開裂に対する感受性を変更するなど、翻訳後のプロセスを変えることもできる。

30

【0138】

タンパク質精製

本発明の幾つかの局面は、ポリペプチドの、精製、および、特定の実施態様において、実質的な精製に関係する。ここで用いられる用語「精製されたポリペプチド」は、他の成分から単離可能な組成物であって、ポリペプチドが、天然で得られる状態に対して（すなわち、この場合、前立腺細胞抽出物中の純度に対して）、任意の程度まで精製されている組成物を指すと意図される。それゆえ、精製されたポリペプチドは、それが天然に生じるかもしれない環境にないポリペプチドも指す。

40

【0139】

一般的に、「精製された」は、様々な他の成分を除去するために分別され、かつ、組成物が実質的にその発現された生物活性を保持する、ポリペプチド組成物を指すであろう。用語「実質的に精製された」が用いられる場合、これは、組成物中、約50%以上のポリペプチドを構成するなど、組成物の主な成分を、ポリペプチドが、形成している組成物を指すであろう。

50

【0140】

ポリペプチドの精製における使用に適した様々な技術が、当業者によく知られているであろう。これらは、例えば、遠心分離を次いで行なう、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いた沈降、または、熱変性；イオン交換、ゲル濾過（すなわち、サイズ除外クロマトグラフィー）、逆相、ヒドロキシアパタイトおよびアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー工程；等電点電気泳動法；ゲル電気泳動法；および、そのような、および、他の技術の組み合わせを、含む。これらの技術は、単独、または、組み合わせて用いることができる。当該分野において一般的に知られているように、様々な精製工程を行なう順序は、変更することができ、または、幾つかの工程は、省略することができ、そしてさらに、実質的に精製されたポリペプチドの調整に適している方法になると考えられる。

10

【0141】

硫酸アンモニウム沈降によりタンパク質を精製する性能は、タンパク質の溶解性が、高い塩濃度で低下するという事実に基づく。しかしながら、タンパク質の溶解性は、それらの特性に応じて、異なった様式で、影響を受ける。

【0142】

サイズ除外クロマトグラフィーまたはゲル濾過は、分子をそれらのサイズに基づいて分ける。ゲル（すなわち、マトリックス、樹脂）媒体は、特定の分布の孔を含むビーズからなることができる。異なるサイズの分子が、マトリックス中の孔に含まれる、または、孔から排出される時に、分離を生じるであろう。小さな分子は、孔中に拡散し、カラムからのそれらの流出が妨げられ、一方、大きな分子は、孔に入らず、カラムの空隙容積に溶出される。従って、分子は、カラムを通る時にそれらのサイズに基づいて分離し、分子量が減少していく順に溶出される。

20

【0143】

タンパク質は、イオン交換クロマトグラフィーにより、それらの実効電荷に基づいて分離することができる。例えば、タンパク質が、pH7で、実効陽電荷を有する場合、それは、通常、陰性に荷電されている基を含むビーズ（例えば、マトリックス）に結合（吸着）するであろう。例えば、陽性に荷電されているタンパク質を、陰性に荷電されているカルボキシメチルセルロース、もしくは、カルボキシメチルアガロースマトリックス上で分離させることができる。溶出後、低密度の実効陽電荷を有するタンパク質が、最初に、カラムから出てきて、より高い電荷密度を有するものがそれに続く傾向にあるであろう。陰性に荷電されたタンパク質は、陽性に荷電されたジエチルアミノエチルセルロース（DEAE-セルロース）またはDEAE-アガロースマトリックス上のクロマトグラフィーにより分離させることができる。イオン交換マトリックスに結合した荷電タンパク質は、塩化ナトリウムまたは溶出緩衝剤としての他の塩溶液の濃度を増やすことによって、溶出（放出、分離）させることができる。イオンは、マトリックスに結合するために、タンパク質上の荷電された基と競合するであろう。

30

【0144】

塩溶液は、マトリックスに、連続的に（すなわち、特定のモル濃度の溶液（例えば、100mMの塩化ナトリウム）を加え、次いで、異なるモル濃度の一つ以上の溶液（例えば、200mM、次いで300mMの溶液、次いで400mMの溶液、次いで500mMの溶液、次いで1000mMの溶液）を、発明の特定のポリペプチド（すなわち、PSP94結合タンパク質（配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9）が溶出されるまで、加えることによって）加えることができる。更に、塩溶液は、連続的に勾配するように加えることができる。例えば、イオン交換クロマトグラフィーカラムに入れる前に、高いモル濃度（例えば、1000mM）の塩溶液を、より低いモル濃度（例えば、100mM）の第二溶液に、徐々に加えることができる。カラムに入る溶液は、100mMから1000mMまで、緩やかに増加するモル濃度を有するであろう。

40

【0145】

アフィニティークロマトグラフィーは、化合物に対するポリペプチドの特異性（親和性

50

）が知られている、もしくは、推測される時に用いることができる。例えば、第一段階として、そのような化合物（例えば、P S P 9 4）を、カラム（例えば、臭化シアン活性化セファロースマトリックス）に共有的に結合させ、所望するポリペプチド（例えば、P S P 9 4 結合タンパク質）を含む混合物（溶液）を、マトリックスに加えることができる。未結合タンパク質を除去するために、マトリックスを洗浄した後、所望するポリペプチドは、高濃度の可溶性の化合物（例えば、P S P 9 4）を加えることによって、マトリックスから溶出させることができる。抗体が、化合物の一例であり、それが結合するタンパク質を精製するために、しばしば用いられる。

【0146】

当該分野において、不要な（すなわち、非特異的な）タンパク質の結合（非特異結合）を最小限度にするために、クロマトグラフィーマトリックス（すなわち、樹脂）（例えば、イオン交換マトリックス、サイズ除外マトリックス、アフィニティマトリックス）の平衡化および十分な洗浄が好まれることが知られている。

【0147】

抗体およびハイブリドーマ

本発明の別の局面は、抗体およびハイブリドーマ細胞系に関する。抗体の調製および特徴付けは、当該分野において、よく知られており（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照；ここに参照によって組み込まれる）、米国特許第6,156,515号で論じられており、その全ての内容が参照によってここに組み込まれる。

【0148】

例えば、ポリクローナル抗体の調製品は、免疫原（免疫性を与える）組成物を用いて、動物に免疫性を与え、そして、免疫性を与えた動物から抗血清を回収することによって、得ることが出来る。抗血清を生成するために、広範囲の動物種を用いることができる。典型的には、抗血清の生成のために用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、ギニーピッグ、またはヤギである。

【0149】

例えば、免疫原を、担体（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびウシ血清アルブミン（BSA））に結合させる、または、アジュバントを、ここに記載されたように、免疫化組成物にアジュバントを組み込ませることによって、宿主の免疫システムを高めることが、しばしば必要である。

【0150】

抗体の生成は、免疫性を与えた後、様々な時点で、免疫性を与えた動物の血液をサンプリングすることによって、観測することができる。時々、抗体の十分な力価を得るために、追加抗原投与（ブースト）が必要とされることがある。

【0151】

所望された抗体は、例えば、他の抗体または固形マトリックスに結合させたペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーなど公知の方法によって、精製することができる。

【0152】

モノクローナル抗体（mAbs）は、全内容が参照によって組み込まれる米国特許第4,196,265号に例示された技術など、公知の技術の使用により、容易に調製することができる。マウス（例えば、BALB/cマウス）およびラットが、免疫化に通常用いられる動物である。免疫化後、Bリンパ球（B細胞）が、mAb生成プロトコルにおける使用のために、選択される。しばしば、動物のパネルが、免疫性を与えられていなければならず、最も高い抗体力価を有する動物が選択されるであろう。免疫化動物由来の抗体生成Bリンパ球を、次いで、不死化骨髄腫細胞の細胞と、（例えば、ポリエチレングリコールを用いて）融合させる。当業者に公知のように、多くの骨髄腫細胞のうちのいずれか一つを、用いることができる（Goding, 第65-66ページ, 1986; Campb

10

20

30

40

50

e 1 1、第 7 5 - 8 3 ページ、1 9 8 4)。例えば、免疫化動物がマウスの場合、P 3 - X 6 3 / A g 8、X 6 3 - A g 8 . 6 5 3、N S 1 / 1 . A g 4 1、S p 2 1 0 - A g 1 4、F O、N S O / J U、M P C - 1 1、M P C 1 1 - X 4 5 - G T G 1 . 7、および、S 1 9 4 / 5 X X O B l u を用いることができ；ラットの場合、R 2 1 0 . R C Y 3、Y 3 - A g 1 . 2 . 3、I R 9 8 3 F、および、4 B 2 1 0 を用いることができ；および、U - 2 6 6、G M 1 5 0 0 - G R G 2、L I C R - L O N - H M y 2、および、U C 7 2 9 - 6 は、全て、ヒト細胞融合に関して有用である。

【 0 1 5 3 】

融合されたハイブリッドは、融合細胞と親細胞（すなわち、骨髄腫細胞および B 細胞）の間の区別化を可能にする選択培地中で培養される。選択培地は、通常、ヌクレオチドのデノボ合成を阻害する薬品（例えば、アミノプテリン、メトトレキサート、アザセリン）を含む。アミノプテリンまたはメトトレキサートが用いられる場合、培地は、ヌクレオチド源として、ヒポキサンチンとチミジンで補充されている（H A T 培地）。アザセリンが用いられる場合、培地は、ヒポキサンチンで補充されている。ヌクレオチドサルベージ経路を使うことができる細胞のみが、H A T 培地中で生き抜くことができる。骨髄腫細胞は、サルベージ経路の主要な酵素、例えば、ヒポキサンチン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（H P R T）が欠けており、それらは生き抜くことができない。B 細胞は、この経路を使うことができるが、培養時の寿命が限られており、通常約二週間以内に死ぬ。それゆえ、選択培地で生き抜くことができる唯一の細胞は、骨髄腫と B 細胞から形成されるそれらのハイブリッドである。

【 0 1 5 4 】

ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートで、単一クローン希釈によって細胞を培養し、次いで、所望する反応性に関して各クローンの上清を試験することによって、行なわれる。選択されるハイブリドーマは、次いで、順次に希釈し、各抗体生成細胞系にクローン化し、次いで、m A b を供するために、クローンを、無期限に増殖させる。

【 0 1 5 5 】

モノクローナル抗体の断片が、本発明によって包含される。これらは、ペプシンまたはパインなどの酵素による消化、および/または、化学的還元による二硫化結合の開裂を含む方法によって得ることができる。あるいは、本発明によって含まれるモノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成装置を用いて合成する、または、適切な細胞（細胞系）において、そのような断片（例えば、単一鎖抗体）を生成するように設計されたクローン化遺伝子セグメントから生産させることができる。

【 0 1 5 6 】

抗体接合物も、本発明によって包含される。これらは、抗体を、フルオロホア、クロモホア、もしくは染料（例えば、ローダミン、フルオロセイン、および緑色蛍光タンパク質）、または、単一で作用することにより、もしくは、生物反応に続いて、検出可能なシグナルを生じる任意の他の薬品もしくは標識（例えば、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、アルカリ・ホスファターゼ、および、 α -ガラクトシダーゼなどの酵素）と結合させることにより生成させることができる。ジエチレントリアミン 5 酢酸（D T P A）などの分子も、抗体に連結させることができる。D T P A は、放射性同位元素（例えば、インジウムの同位元素 1 1 1 (^{111}In)) を含む重金属イオンと結合することができるキレート剤として、作用させることができる。これらの接合物は、免疫学的分析または画像化における検出手段として用いることができる。あるいは、毒素などの治療剤を有する接合物を、本発明のモノクローナル抗体から生成することができ、これらは、癌細胞を標的にし、それらの破壊を促進するために用いることができる。

【 0 1 5 7 】

当業者によって、前立腺癌に関連しているタンパク質に特異的なモノクローナル、または、ポリクローナル抗体が、いくつかの種類適用に有用性を有するであろうことが、認識されているであろう。これらは、前立腺癌を有する個体の予後を検出し、診断し、または、評価する際に、用いられるための診断キットの生成を含むであろう。

【0158】

抗原検出

抗原検出の用語において、分析される生物試料は、興味のある抗原を含むと推測される任意の試料、組織、細胞溶解物、尿、血液、血清、血漿などであることができる。

【0159】

生物試料を、抗原検出試薬（タンパク質、ペプチド、または抗体）と接触させることは、通常、単に、組成物を試料に加え、そして、抗体が、抗原と、免疫複合体を形成するために十分な長さの時間、混合物を、インキュベーションする事である。試料（すなわち、組織断片、ELISAプレート、ドットプロット、またはウエスタンプロット）の洗浄は、通常、あらゆる非特異的結合抗体種を除去するために、必要とされる。抗原-抗体複合体（免疫複合体）は、次いで、特定の試薬を用いて検出される。

10

【0160】

例えば、抗原検出試薬が抗体（特異抗体）の場合、抗体は、複合体の検出を可能にするためのマーカー（フルオロホア、クロモホア、染料、酵素、放射性同位元素など）で、（直接的に）標識することができる。他の例において、第二抗体などの第二の結合リガンド、または、当該分野に公知のように、ビオチン/アビジン（ストレプトアビジン）（結合/リガンド複合体）の配合を用いることが有益であるかもしれない。また、第二抗体は、前記マーカー、もしくは、ビオチン/アビジン（すなわち、アビジンペルオキシダーゼ）の配合で標識することができ、これにより、免疫複合体を検出することができる。そのような標識の使用に関する米国特許は、各自参照によってここに組み込まれる、米国特許第3,817,837号、米国特許第3,850,752号、米国特許第3,939,350号、米国特許第3,996,345号、米国特許第4,277,437号、米国特許第4,275,149号、および、米国特許第4,366,241号を含む。通常、第二抗体は、例えば、抗マウスIgGなど、所定のアイソタイプおよび種の特異抗体（一次抗体）に導かれる抗体であるであろう。

20

【0161】

他方、抗原検出試薬は、複合体（すなわち、ポリペプチド-ポリペプチド複合体、または、抗体-ポリペプチド複合体）を形成する、抗体または他のポリペプチドに対する親和性を有するポリペプチドであることもできる。その場合、ポリペプチド自体を、直接的な検出を可能にする、前記マーカーを用いて、標識することができる。また、複合体は、第二の（標識化）抗体またはポリペプチドを加えることによって、間接的に検出することができる。

30

【0162】

酵素免疫吸着分析（ELISA）、ウエスタンプロットなどの免疫検出法は、前立腺癌などの状態の診断において有用性を有する。しかしながら、これらの方法は、抗原または抗体試料の力価の測定、ハイブリドーマの選択においてなど、非臨床試料への適応性も有する。

【0163】

ELISA

前記のように、本発明のコードされたポリペプチド（配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号9）は、免疫組織化学およびELISA分析において有用性を見出すであろうが、ワクチン開発に関連した免疫原（すなわち、抗原）としても有用性を見出すであろう。コードされたポリペプチドおよび対応する抗体の一つの明白な有用性は、前立腺癌の診断/予後のための免疫分析にある。

40

【0164】

本発明の試薬（配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号8、または、配列番号9に規定されるポリペプチド、および抗体）を用いて行なうことが出来る免疫分析は、例えば、当該分野に知られている、酵素免疫吸着分析（ELISA）および放射免疫分析（RIA）を含む。組織断片を用いた免疫組織化学的検出も、特に有用である。しかしながら、検出が、そのような技術に限定されず、ウエスタンブロッティング、ドットプロット

50

イング、FACS分析なども用いてよいことが、容易に認識されるであろう。

【0165】

ELISA分析の例は、以下を含む：ポリペプチドに結合する抗体（例えば、PSP94に対する抗体、または、PSP94結合タンパク質（配列番号2、配列番号3など）に対する抗体）を、ポリスチレンマイクロタイタープレート（ELISAプレート）におけるウェルなど、タンパク質親和性を示す選択される表面（すなわち、適切な物質）上に固定させる。次いで、ポリペプチドを含むと推測される試料を、プレートのウェルに加える。結合、および、非特異結合免疫複合体を除去するための洗浄後、結合した抗原を検出することができる。検出は、検出可能な標識に結合させた、標的ポリペプチドに対して特異的な第二の抗体を、加えることにより、行なうことができる。この種のELISAは、単

10

【0166】

ELISA分析の別の例は、以下のとおりである：興味のあるポリペプチドを含むと推測される試料を、適切な物質の表面上に固定させ、次いで、発明の抗体と接触させる。結合、および、非特異結合免疫複合体を除去するための洗浄後、結合した抗原を検出する。免疫複合体は、ここに記載されたように、直接的または間接的に、検出することができる。

【0167】

ELISA分析の更なる例は、以下である：再び、ポリペプチドを、物質に固定させるが、その場合、分析は、競合工程を含む。このELISAでは、興味のあるポリペプチドの既知量を、プレートに吸着させる。次いで、固定化ポリペプチドを含むウェルとのインキュベーション前、もしくはインキュベーション時に、試料を、特異抗体と混合することにより、未知試料中のポリペプチドの量を、測定する。固定化ポリペプチドと結合することができる抗体を定量するために、検出試薬を加える（例えば、抗体）。試料中におけるポリペプチドの存在は、ウェルに含まれるポリペプチドに結合するために用いられることができる抗体の量を減らし、それに伴って、シグナルを減らす。

20

【0168】

シグナルと、未知試料中のポリペプチドの量（濃度）との間の相関関係を得るために、対照試料を、分析時に含ませることができる。例えば、ポリペプチド（通常、実質的に純粋な型）の既知量を、未知試料と同時に、測定（検出）することができる。次いで、未知試料に関して得られたシグナルを、対照に関して得られたシグナルと比較する。シグナルの強度（レベル）は、通常、試料中のポリペプチド（ポリペプチドに結合した抗体）の量に比例する。しかしながら、定量分析を行なうために必要とされる対照ポリペプチドおよび抗体の量は、最初に評価する必要がある。

30

【0169】

抗原（ポリペプチド）または抗体のいずれかでプレートを被覆する時、通常、プレートのウェルを、抗原または抗体の溶液と共に、一晚、または、特定の時間、インキュベーションするであろう。次いで、プレートのウェルを、不完全に吸着された物質を除去するために、洗浄するであろう。次いで、ウェルのあらゆる残存している利用可能な表面を、試験抗血清に関して抗原的に中性である非特異的タンパク質で「被覆」する。これらは、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、および、粉ミルク溶液を含む。被覆は、固定表面上の非特異吸着部位のブロックキングを許容し、それに従って、表面上への抗血清の非特異的結合によって生じるバックグラウンドを減らす。

40

【0170】

免疫複合体（抗原/抗体）形成を許容することができる状態は、抗原および抗体を、BSA、ウシガンマグロブリン（BGG）、および、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）/ツイーン（Tween）などの溶液で、希釈することを含む。これらの加えられた物質も、非特異的バックグラウンドの低減を助ける傾向にある。

50

【0171】

適切な状態は、インキュベーションが、有効な結合を許容するのに十分な温度と時間であることを含む。インキュベーション工程は、典型的には、約1から2から4時間まで、好ましくは、およそ20 から27 の温度であり、あるいは、一晚、約4 くらいであることができる。

【0172】

しばしば、免疫複合体の検出は、酵素に連結させた試薬を用いて行なわれる。次いで、検出は、酵素基質の添加を必要とする。例えば、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼなどの酵素は、適切な基質が与えられた場合、生じた色の強度（程度）を測定することによって、定量することができる反応を生じるであろう。反応は、通常、広範囲の濃度にわたって、直線状であり、可視スペクトル分光光度計を用いて、定量することができる。

10

【0173】

キット

本発明は、前記免疫検出方法で用いるための免疫検出キットおよび試薬にも関する。本発明のポリペプチドは、抗体を検出するために用いられることができ、そして、対応する抗体が、ポリペプチドを検出するために用いられることができるので、そのような成分の一方、もしくは両方を、キット中で提供することができる。このように、免疫検出キットは、適切な容器手段中、ポリペプチド（PSP94、または、PSP94結合タンパク質）、または、ポリペプチドに結合する第一の抗体、および/または、免疫検出試薬を含むことができる。キットは、選択される抗体またはポリペプチドが既に結合していることができる適切なマトリックスも含むことができる。適切なマトリックスは、ELISAプレートを含む。キットで提供されるプレートは、既に、選択された抗体またはポリペプチドで被覆されていることができる。被覆されたELISAプレートは、非特異結合を防ぐために、ここで記載された試薬を用いて、ブロッキングされていることもできる。検出試薬も、提供されることができ、そして、例えば、標識またはマーカ、および/または、酵素基質を担持することができる、二次抗体もしくはリガンドを、含むことができる。キットは、さらに、対照として用いられることができる（通常、既知の力価または濃度の）抗体またはポリペプチドを含むことができる。例えば、試薬は、（明確な濃度の）凍結乾燥させた形態、または、液体の形態で提供されることができ、かつ、（試薬の安定性、安全性などを保証する）適切な容器中で提供されることができ。

20

30

【0174】

ここで、「範囲」、「物質の群」、または特定の特性（例えば、温度、濃度、時間など）が述べられる場合、本発明は、何であれ、その、各々の、および、全ての、特定メンバー、および、部分的な範囲または部分的な群の組み合わせに関し、ここに明白に組み込むと、理解されるべきである。このように、任意の明記された範囲もしくは群は、各々、範囲もしくは群の各および全メンバー、ならびに、ここに包含される、各々の、および、全ての可能な部分的な範囲もしくは部分的な群を指す略記様式として；そして、同様に、その任意の部分的な範囲もしくは部分的な群に関する理解されるべきである。このように、例えば、

40

- 反応時間に関し、1分以上の時間は、各および全単一時間、ならびに、例えば、1分、3から15分、1分から20時間、1から3時間、16時間、3から20時間など、1分を超える部分的な範囲を、ここに、特に組み込んでいるとして、理解されるべきであり；

- そして、同様に、濃度、温度などの他のパラメーターに関して、・・・。

【0175】

また、ここで、非PSP94結合タンパク質（または、ポリペプチドなどをコードするDNA）は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを除くと理解されるべきである。

【0176】

50

【表 2】
略語の表

略語	意味
M	モル
mM	ミリモル
g	グラム
mg	ミリグラム
μg	マイクログラム
ng	ナノグラム
℃. または°C	摂氏温度
%	パーセント
cm	センチメートル
cpm (CPM)	一分当りのカウント
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
NaCl	塩化ナトリウム
MES	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MOPS	3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸
UV	紫外線
Da	ダルトン
kDa	キロダルトン
Kd	解離定数
nm	ナノメートル
OD	光学密度
CAPS	3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸
HMW	高分子量
LMW	低分子量
FSH	卵胞刺激ホルモン
PSP94	94アミノ酸の前立腺分泌タンパク質
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
DMSO	ジメチルスルホキシド
PVDF	ポリニフッ化ビニリデン

10

20

30

40

【0177】

本出願において記載された各出版物、特許、および特許出願の内容は、参照によって、ここに組み込まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0178】

PSP94は、PSP94結合タンパク質の単離および同定時のおとりとして用いた。その目的のため、標識したPSP94を、様々な精製工程を施す血清画分におけるPSP94結合タンパク質の存在を検出するために、用いた。さらに、PSP94は、PSP94結合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製のために用いた。以下に記載

50

した例は、P S P 9 4 結合タンパク質の精製、同定および有用性を示す。

【実施例】

【0179】

(実施例1)

P S P 9 4 の放射性標識およびP S P 9 4 結合タンパク質反応速度分析

^{1 2 5}I - P S P 9 4 標識を最適化するための実験、ヒト男性血清タンパク質に対する^{1 2 5}I - P S P 9 4 結合分析、および遊離(すなわち、未結合の)および複合化(すなわち、結合、会合した)^{1 2 5}I - P S P 9 4 を分離するための手段の開発を行なった。P S P 9 4 (この場合は、^{1 2 5}I - P S P 9 4)に結合するであろうヒト男性血清タンパク質は、遊離P S P 9 4 (または、遊離^{1 2 5}I - P S P 9 4)よりも高い分子量の複合体の形成を生じるであろう。

【0180】

P S P 9 4 のヨウ素化は、以下のように行なった。15マイクロリットルの100mM重炭酸ナトリウム(pH8.0)中、前記(Baijal Gupta等、Prot. Exp. and Purification 8:483-488, 1996)のように調製した20マイクログラムの天然ヒトP S P 9 4を、1ミリキュリーのモノヨウ素化ボルトン-ハンター(Bolton-Hunter)試薬を、製品の使用説明書(NEN Radiochemicals)に従って、0 で用いて、標識した。2時間後に、100マイクロリットルの100mMグリシンを加えることによって、反応を終結させた。遊離ヨウ素を、PD10使い捨てゲル濾過カラムにより、製品の使用説明書(BIORAD)に従って、P S P 9 4 に組み込まれたヨウ素から分離した。典型的には、P S P 9 4 タンパク質に組み込まれるようになったヨウ素の割合は、約60%であり、1マイクログラムのP S P 9 4 につき、約30マイクロキュリーの特異活性を生じた。

【0181】

ヒト男性血清タンパク質の^{1 2 5}I - P S P 9 4 に対する結合分析の最適化を、最適なインキュベーション時間、温度、および分離条件を明らかにするために、行なった。37でのかなりのインキュベーション時間後に、平衡(例えば、インキュベーション時間を延ばしても、結合が更に有意に増加しない)に近づいたため、16時間のインキュベーション時間を選択した。より高い分子量を有する複合型(すなわち、結合型)P S P 9 4 (または、複合化^{1 2 5}I - P S P 9 4)と低分子量を有する遊離P S P 9 4 (または、遊離^{1 2 5}I - P S P 9 4)の分離は、1x20cmカラムに詰められたセファデックス(Sephadex)G100樹脂(Amersham Pharmacia Biotech Ltd)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによって行なった。分子ふるいクロマトグラフィーは、より高い温度では、処置時の複合体の解離が著しいことが示されたため、4で行なった。

【0182】

前記最適化の結果に基づいて、P S P 9 4 結合血清成分(すなわち、P S P 9 4 結合タンパク質)の放射性リガンド結合分析を行なった。この分析は、総量500マイクロリットルで行なった。試験試料は、P S P 9 4 結合タンパク質(ウシ血清、または、精製試験からの画分)50ngの放射性標識したP S P 9 4を、リン酸緩衝生理食塩水-ゼラチン(PBS-ゼラチン:10mMのリン酸ナトリウム、140mMのNaCl、0.1%のゼラチン(Fisher Scientific、A型)、pH7.5、抗菌剤として8mMのアジ化ナトリウムを含む)中、過剰の遊離競合体(10マイクログラムの遊離P S P 9 4(未標識))と共に、または、伴わずに、含んだ。それらを、37で16時間インキュベーションした。この時、平衡化した混合物を、氷上に置き、PBS-ゼラチンで平衡化した1x20cmのセファデックスG100カラムを用いた、4での分子ふるいクロマトグラフィーにより、成分を、それらの分子量に従って、分離した。試料をカラム中に流した後、3mlを捨て、0.5mlの20画分を、回収した。30mlの単一画分も流動の終わりに回収した。

【0183】

10

20

30

40

50

回収した画分における放射能（一分当たりのカウント（c p m）で表した）を、L K B ラックガンマカウンターを用いて測定し、高分子量のピーク（一般的には、画分4～14に含まれる）および低分子量のピーク（0.5 mlの画分の残りおよび単一の30 mlの画分）における全放射能を算出した。典型的な溶出の概要を図1に示す。

【0184】

図1は、ヨウ素の同位元素 ^{125}I （ ^{125}I ）で放射性標識したP S P 9 4（すなわち、 ^{125}I -P S P 9 4）に結合（特異結合）したヒト男性血清由来のタンパク質のサイズ除外クロマトグラフィーの結果を示す。 ^{125}I -P S P 9 4のヒト男性血清タンパク質への結合は、各画分における放射能により測定され、一分当たりのカウント（c p m）で表される。非特異結合は、インキュベーション混合物中に、10 μg の遊離P S P 9 4を、250 μl のヒト男性結血清および50 ngの ^{125}I -P S P 9 4と共に含ませることにより測定した。遊離（すなわち、未結合）および複合（すなわち、結合）-P S P 9 4を含む画分の位置を、グラフに示す。遊離P S P 9 4（ ^{125}I -P S P 9 4）のほとんどが、画分20より遅くに溶出した。典型的には、250マイクロリットルのヒト血清に加えられた全放射性P S P 9 4の約33%が、P S P 9 4結合タンパク質複合体の一部として、より早い画分に溶出し、そして、放射性P S P 9 4の約67%が、未結合のまま、より遅い画分中に溶出した。インキュベーション混合物中に、10マイクログラムの未標識P S P 9 4を含有させた競合対照において、約3%の放射性P S P 9 4だけが、高分子量複合体の一部として、より速い画分に溶出し、P S P 9 4結合タンパク質に対するP S P 9 4の特異性を確認した。

10

20

【0185】

この方法を用い、そして、放射性標識した競合P S P 9 4の濃度を変え、かつ、ヒト男性血清の量を一定（250 μl ）に維持することにより、平衡結合データの反応速度分析を行なうことができた。P S P 9 4が、P S P 9 4結合タンパク質の分子量の約5分の1であると推定すると、これは、血清1ミリリットルが、約1マイクログラムのP S P 9 4結合タンパク質を有することを示唆する。血清の全タンパク質含有量は、1ミリリットル当たり80ミリグラムであり、P S P 9 4結合タンパク質：血清中の全タンパク質の割合は、およそ、1：80,000である。

【0186】

放射性リガンド結合分析からの更なる情報により、P S P 9 4結合タンパク質が、ヒト女性血清、未婚女性のヒト血清、ウシ胎仔血清、および貯留させたマウス血清中に存在することが示された。

30

【0187】

（実施例2）

硫酸アンモニウム沈降

実施例1で得られた反応速度の結果から、P S P 9 4結合タンパク質は、ヒト血清中に不十分であることが示された。

【0188】

更なる特徴づけと同定のためにP S P 9 4結合タンパク質を単離するために、第一の精製工程を硫酸アンモニウム沈降により行なった。P S P 9 4結合タンパク質を沈降させるために必要である硫酸アンモニウムの適切な濃度を確立するために、小規模の硫酸アンモニウム沈降試験を行なった。沈降物中のP S P 9 4結合タンパク質の存在は、溶解および透析後、実施例1に記載したように放射性リガンド結合分析によって、P S P 9 4に対して測定した。これらの試験により、32～47%の硫酸アンモニウム画分が、図2に示されたように、P S P 9 4結合物質の大部分を含むことが確認された。

40

【0189】

硫酸アンモニウム沈降は、より大規模に、慣例的に行なった。簡単には、1リットルの男性凍結血清（Bio reclamation Inc, New York）を、解凍させ、10 mMの冷リン酸ナトリウム、140 mMのNaCl、pH 7.5（リン酸緩衝生理食塩水；PBS）1リットルに加え、これに、370 gの硫酸アンモニウム（BDH

50

A C S 試薬グレード)を、持続的に攪拌しながら、硫酸アンモニウム濃度が32%に至るまで、ゆっくりと加えた。塩の溶解後、5,000×gで15分間の遠心分離前に、混合物(すなわち、硫酸アンモニウムを含む男性血清)を、20分間攪拌した。ペレットを捨て、P S P 9 4 結合タンパク質を含むタンパク質の上清画分を回収した。さらに、硫酸アンモニウム(188g)を、持続的に攪拌しながら、上清画分にゆっくりと加え、全硫酸アンモニウム濃度を47%にした。20分後、この混合物も、5,000×gで回転させ、上清を捨て、そして、ペレットを、10mMのMES((2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸)水和物)、100mMのNaCl、pH6.5の全500ml中に溶解した。このペレットは、6-8,000分子量でカットオフ(分離)する透析管(Spectra/Por、Fisher Scientific Canada)を用い、10mMのMES、100mMのNaCl、pH6.5、16リットルで、16時間、4にて透析後、さらに16リットルの同一緩衝液をさらに7時間用いた別の透析工程を行なった。生成物中のタンパク質濃度は、280nmの紫外線(UV)吸光度を用いて測定し、調製品を、-20にて、4gのタンパク質アリコート(通常、約150ml)で保存した。典型的な硫酸アンモニウム沈降分析は、図2に示す。

10

【0190】

(実施例3)

イオン交換クロマトグラフィー分析

イオン交換クロマトグラフィー(IEX)は、分子を、それらの実効電荷に基づいて、分離する。陰性または陽性に荷電した官能基は、陽イオンまたは陰イオン交換体を生じる固形支持マトリックスに共有結合する。荷電分子を、逆に荷電された交換体に接触させると、それが、吸着され、一方で、中性イオンまたは同一電荷のイオンが、カラムの空隙容量に溶出される。荷電分子の結合は、可逆的であり、吸着された分子は、一般に、塩またはpH勾配で溶出される。

20

【0191】

P S P 9 4 結合タンパク質の特徴について何も事前に知らずに、様々なpH値でのP S P 9 4 結合タンパク質を吸着する陰イオンおよび陽イオン交換マトリックスの性能を、一連のイオン交換分析で測定した。硫酸アンモニウムで沈降させた血清のアリコートは、製品の使用説明書に従って、適切な緩衝液で平衡化したバイオラッド(Biorad)DG 10カラムを用いて、表3に示した緩衝液中で交換した。700マイクロリットルのアリコートを、500マイクロリットルのイオン交換マトリックス(製造元の勧めに従って調製された)と共に、インキュベーションした。ゆるやかに振とうしながら、室温で90分間インキュベーションした後、混合物を、1000×gで5分間、回転させ、マトリックスを上清から分離した。P S P 9 4 結合タンパク質が、マトリックスに結合(吸着)している場合、遠心分離後もそれに結合したままであり、上清には存在しないであろう。上清は、0.3容量の250mMのTris、pH7.5、で、すぐに中和し、この溶液250マイクロリットルを、ここ(実施例1)に記載した^{1 2 5}I-P S P 9 4 結合分析で評価した。試験した条件およびこれらの分析結果は、表3に示されている。

30

【0192】

【表 3】

陽イオン基質： Macro Prep High S (BIORAD)	緩衝液	基質とのインキュベ ーション前の ¹²⁵ I -PSP94結合	基質とのインキュベ ーション後の ¹²⁵ I -PSP94結合
pH 4.7	10mMクエン酸塩	9.5%	0.08%
pH 5.7	10mM MES	11.9%	7.7%
pH 6.7	10mM MES	20.6%	18.6%
pH 7.9	10mM MOPS	20.5%	11.9%
陰イオン基質： Macro Prep High Q (BIORAD)	緩衝液	基質とのインキュベ ーション前の ¹²⁵ I -PSP94結合	基質とのインキュベ ーション後の ¹²⁵ I -PSP94結合
pH 5.7	10mM MES	11.9%	0.73%
pH 6.7	10mM MES	20.6%	0.66%
pH 8.0	10mM Bicine	14.1%	0.81%
pH 9.0	10mM Bicine	12.5%	0.65%

10

20

【0193】

これらのイオン交換クロマトグラフィー分析の主な結果は、極端なpH(8以上、および6以下)にPSP94結合タンパク質を一時的にさらすことにより、PSP94結合タンパク質のPSP94への結合能が低減する結果となり、PSP94結合タンパク質がpH感受性であることを示唆することを示す。陽イオンマトリックスへのPSP94結合たんぱく質の吸着が、pH4.7では見られなかった。陽イオンマトリックスへの多少の吸着が、pH5.7で見られ、最大の吸着がpH6.7で見られた。これらの結果は、約pH5の等電点を示唆しているのであろう。

30

【0194】

陰イオン交換クロマトグラフィー分析は、等電点5に一致した、pH5.7と9.0の間で、マトリックスへのPSP94結合タンパク質の良好な吸着を示した。中性(非変性)pH値で、良好な吸着が達成され得たため、好ましい精製方法が、陰イオンマトリックスを用いなければならないであろうことが明らかであった。それゆえ、陰イオン交換マトリックス、および、pH6.5の10mMのMES緩衝液が、pH溶出ではなく、塩濃縮溶出を用いた更なる作業のために選択された。

【0195】

陰イオン交換マトリックスからのPSP94結合タンパク質溶出条件の最適化を、様々な塩化ナトリウム濃度を用いて行なった。

40

【0196】

マクロ・プレップ・ハイ(Macro Prep High)Qを含むカラム(1×15cm)を、10mMのMES、100mMのNaCl、pH6.5を含む緩衝液で平衡化し、1分当たり0.5mlで流した。同一緩衝液で平衡化した7ミリリットルの32~47%の硫酸アンモニウムカット(すなわち、表4の出発物質)を、カラムに投入し、様々な緩衝液を、PSP94結合タンパク質を溶出するために投入した。溶出物は、UV記録装置で観測した。画分を回収し、分子量のカットオフが10kDaであるセントリプレップ(CentriPrep)濃縮器(Amicon)を用いて、緩衝液を、PBSに交換した。これらの試料は、実施例1に記載した¹²⁵I-PSP94結合分析で試験した。表4は、この実験で、用いられた異なる条件と、得られた結果を、要約する。星印(*)

50

)は、緩衝液交換時に多少の損失が生じたことを示す。タンパク質の濃縮は、1 mgのタンパク質に相当する1 OD単位で、280 nmでの吸光度(A280)から評価した。

【0197】

【表4】

塩化ナトリウム濃度	溶出された全タンパク質 (mg)	結合分析における全タンパク質	¹²⁵ I-PSP94 結合%
出発物質 (硫酸アンモニウムカット)	179 mg*	7.2 mg	12.7%
100 mM (貫流)	50 mg	0.67 mg	0.89%
200 mM	37 mg	0.80 mg	1.4%
300 mM	12 mg	0.63 mg	24.4%
400 mM	5 mg	0.30 mg	1.5%
500 mM	8 mg	0.62 mg	0.9%
1000 mM	7 mg	—	—

10

【0198】

これらのデータから、300 mMのNaClを含む緩衝液が効果的であり、陰イオン交換マトリックスからのPSP94結合タンパク質の溶出に好ましく用いられるであろうことが、明らかである。これらの結果を用いて、以下に記載する5 cm x 12 cmの陰イオン交換マトリックスへの、4 gの硫酸アンモニウム沈降血清抽出物の適用を許容する、拡大したイオン交換プロトコルを開発した。

20

【0199】

(実施例4)

PSP94結合タンパク質の大規模陰イオン交換クロマトグラフィー精製

陰イオン交換カラム(直径5 cm x 長さ12 cm、マクロプレップ・ハイQ、Bio-rad)を、製品の指針に従って、10 mMのMES、100 mMのNaCl、pH 6.5中で、調製および平衡化し、一分当たり約3 mlの流速で、室温にて流した。硫酸アンモニウム沈降した血清のアリコート(実施例2から:約150 mlの溶液中、全タンパク質4 g)をカラムに投入し、次いで、それを、10 mMのMES、100 mMのNaCl、pH 6.5、約250 mlで洗浄した(図3)。溶出は、約400 mlの10 mMのMES、200 mMのNaCl、pH 6.5緩衝液で、行なった後、10 mMのMES、300 mMのNaClで溶出した。300 mMの溶出画分を回収した(図3)。溶出タンパク質の概要を、チャート式記録計上で、280 nmでのUV吸光度によって、観測した。典型的な概要を図3に示す。図3は、マクロプレップ・ハイ・Q陰イオンカラムを用い、硫酸アンモニウム(約4グラム)により精製したタンパク質を負荷した、陰イオン交換クロマトグラフィーの結果を示すグラフである。タンパク質は、塩化ナトリウム濃度を段階的に増やして、溶出させる。点AとBの間に位置するピークは、PSP94結合タンパク質を含むタンパク質画分を表す。タンパク質は、280 nmで測定された吸光度によって検出される。

30

40

【0200】

カラムは、10 mMのMES、1 MのNaCl、pH 6.5(300 ml)で再生させた後、10 mMのMES、100 mMのNaCl、pH 6.5、500 mlで平衡化させることができた。24時間以上カラムを保存するために、アジ化ナトリウムを、この緩衝液に、0.05%(w/v)で、加えた。

【0201】

300 mMの画分(約90 ml)を、回収し(マーカーAとBの間、図3)、これが、PSP94結合活性の大部分を含むことが、予め示された。「部分的に純粋なPSP94

50

結合タンパク質」(PSP94)として同定されたこの調製物を、製品の使用説明書に従って、遠心分離濃縮器(セントリプレップ10、Amicon)で、20mlまで濃縮し、PBSで60mlに希釈し、20mlまで濃縮し、さらにPBSで60mlに希釈し、20mlまで濃縮し、そして最後に、PBSで、A280が2.0の溶液(通常、最終容量が約150ml)となるように希釈した。この溶液を-20℃で保存した。20gのタンパク質の全適用(5サイクル)後、カラムを、1MのNaOHを用いて消毒し、BIORADにより記載されたプロトコルを用い、10mMのMES、100mMのNaCl、pH6.5で再度平衡化した。

【0202】

硫酸アンモニウム分別(すなわち、沈降)および陰イオン交換クロマトグラフィーは、各々、PSP94結合タンパク質のおよそ4倍、および10倍の精製の結果となる。ウシ血清において、評価は、PSP94結合タンパク質：全タンパク質の割合が1：80,000であることを示した。実施例2および実施例4に記載した2つのタンパク質の精製工程の効率を、実施例1に記載したPSP94放射性リガンド結合分析を用いて観測した。両工程において、PSP94結合物質の大部分は、単一画分内にとどまっていた。この情報から、これらの2つの工程は、組み合わせると、PSP94結合物質の損失が(質的に)ほとんどない、能率的な精製方法になると思われる。しかしながら、損失が小さいとすれば、実施例2および4に記載された2つのタンパク質生成工程の組み合わせにより生じた部分的に精製された結合タンパク質(PSP94)は、約1質量部の結合タンパク質：2000質量部の他のタンパク質を含むべきである。

【0203】

(実施例5)

アフィニティークロマトグラフィー分析

PSP94結合タンパク質精製のためのアフィニーマトリックスの調製を、以下のように行なった。およそ0.5gの臭化シアン活性化セファロースCL4B(Sigma Chemical Company)を、1mMのHClで膨潤させ、製造元の勧めに従って調製した。この混合物1mlに、100mMのNaHCO₃、pH8.0中、Prot. Exp. and Purification 8:483-488、1996に記載されたように精製された5mgのPSP94を含む溶液5mlを加え、反応物を、断続的に振とうしながら、4℃でインキュベーションした。マトリックスへのPSP94の結合の割合を測定するために、時間間隔で、反応物を、200×gで2分間回転させ、上清のアリコート、光学密度(OD)単位で表した280nmでの吸光度(A280)を測定した。PSP94の活性化セファロース(すなわち、マトリックス)への接合(すなわち、結合)の時間経過を示す結果を、表5に要約する。

【0204】

【表5】

反応持続時間(分)	基質に結合していないA280(OD)単位	基質に結合したA280(OD)単位	PSP94取り込み%
0(開始)	5.1	0	0
5	4.7	0.48	9.6
15	3.0	2.1	41
30	2.0	3.1	61
60	1.6	3.5	69

【0205】

接合反応は、70~80%のPSP94が、マトリックスに結合するまで(表5に示す調製では約60分後)、続けた。この時、あらゆる更なる反応基をふさぐために、1ml

の200mMグリシンを、加え、スラリーを、一晚、ゆるやかに振とうしながら、4でインキュベーションした。製造元の勧めに従って、マトリックスを洗浄し、PSP94に関して、1マイクロリットル当たり1マイクログラムの濃度のスラリーとなるようにPBSで希釈した。アジ化ナトリウム(NaN_3)を、抗菌剤として、0.05%まで加えた。

【0206】

前記最適化分析の結果に基づいて、PSP94を、臭化シアン活性化セファロースに接合させることにより、PSP94アフィニティマトリックスを調製した。典型的には、マトリックスは、充填されたマトリックス1マイクロリットル当たり4マイクログラムのPSP94を有し、1マイクロリットル当たり1マイクログラムのPSP94を含む作用スラリーを、0.05%の NaN_3 を含むPBSで希釈することにより、調製した。PSP94アフィニティマトリックス(PSP94に関して、1ミリリットル当たり5マイクログラムの濃度で)を、部分的に純粋なPSP94結合タンパク質に加えた。0.1%(v/v)濃度のツイーン20および0.05%(w/v)の NaN_3 も、混合物に含ませ、次いで、それを、34で18時間、揺り机でインキュベーションした。平行する対照実験において、遊離PSP94も、1ミリリットル当たり50マイクログラムの濃度で加えた。この対照実験における遊離PSP94の添加は、PSP94結合タンパク質の結合のためにマトリックスに接合させたPSP94と競合するであろう。これは、アフィニティカラムへのPSP94結合タンパク質の結合を逆転させ、それにより、PSP94に特異的に結合しているタンパク質の同定を可能にするであろう。アフィニティマトリックスは、急速濾過により、上清から分離し、マトリックスを、4にて、PBSで十分に洗浄した。マトリックスを回収し、結合タンパク質を解離させるために、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)還元試料緩衝液(試料中の最終濃度:5mMのTris、pH6.8、2%(w/v)のSDS、10%のグリセロール(v/v)、8mMのジチオスレイトール、0.001%のプロモフェノール・ブルー)中で煮沸し、これらを、7.5%のSDS-PAGEにより分離した。この実験の結果を、図4に示す。

10

20

【0207】

図4は、以下のPSP94アフィニティークロマトグラフィー後に得られた試料を負荷したドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)の結果を示す。ゲルは、電界中で流し、クマシー・ブリリアント・ブルーで染色した。レーン1は、分子量マーカー(カレイドスコープ・プレステインド・スタンダード(Kalaidoscope prestained standards)、Bio-Rad)を表す。レーン2は、PSP94接合アフィニティマトリックスに結合させたタンパク質を表す。レーン3は、PSP94接合アフィニティマトリックスに結合させ、過剰のPSP94とインキュベーションしたタンパク質を表す。少なくとも2つのタンパク質、AおよびCが、2つのレーン(レーン2および3)に存在したままであることに留意すべきである。2つのバンド、BおよびDは、レーン3に存在するが、対照実験(レーン2)には存在しない。これらのバンド(BおよびD)は、特異的PSP結合タンパク質であると思われる。

30

40

【0208】

(実施例6)

PSP94アフィニティマトリックスからのPSP94結合タンパク質の溶出の最適化SDS-PAGE試料緩衝液(非還元条件である、または非還元条件でない)中での煮沸よりも変性しない条件を用いて、アフィニティマトリックスからPSP94結合タンパク質を解離するために、条件の範囲を評価した。試験した条件を表6に要約する。非変性活性PSP94結合タンパク質は、抗体生成、および、さらなる実験と開発に必要とされる。部分的に純粋なPSP94結合タンパク質と共に、予めインキュベーションし、洗浄したPSP94アフィニティマトリックス(すなわち、結合タンパク質が付着している)のアリコート、表6に列挙した溶出(解離)条件で、1時間、インキュベーション

50

した。インキュベーション後、アフィニティーマトリックスを、遠心分離により、溶出緩衝液から除去した。マトリックスは、PBS中で洗浄し、非還元SDS試料緩衝液（試料中の最終濃度：5 mMのTris、pH 6.8、2% (v/v)のSDS、10%のグリセロール (v/v)、0.001%のプロモフェノール・ブルー）中で煮沸し、タンパク質を、7.5%のSDS-PAGEで分離した。タンパク質が、溶出後に、マトリックスと付着したままである場合、条件は、適切な解離に適していない。このように、PSP94結合タンパク質が、図5に示されたSDS-PAGEに存在しな場合、溶出（解離）条件は、適している。大部分の汚染バンドが、2つのPSP94結合タンパク質のバンドの間ではなく、ゲルの上端に残っていたため、非還元条件が、優れた分離条件を提供することが見出された。試験された条件およびこの実験の結果は、図5に示され、表6に要約される。

10

【0209】

【表6】

レーン	解離条件	PSP94結合タンパク質の効果
A	分子量マーカー	—
B	無処置	なし
C	PBS中、34℃で、1時間	観察されない
D	水中、34℃で、1時間	観察されない
E	34℃で、1mlのPBS中300μgのPSP94	基質からほとんど全て溶出
F	(競合対照)	(ほとんど十分な競合)
G	2Mの尿素	観察されない
H	8Mの尿素	多少の結合損失
I	100mMの酢酸ナトリウム、pH2.7	多少の結合損失
J	100mMのCAPS、pH11.0	多少の結合損失

20

【0210】

図5は、異なる溶出（解離）条件を用いた、PSP94接合アフィニティーマトリックスからのPSP94結合タンパク質の溶出に続いて、得られた試料を負荷したSDS-PAGEを示す。異なる溶出緩衝液中でのインキュベーション後、アフィニティーマトリックスを、遠心分離により溶出緩衝液から除去した。マトリックスをPBS中で洗浄し、非還元SDS-PAGE試料緩衝液中で煮沸した。SDS-PAGEは電界中で流し、ゲルコード (Gelcode) (登録商標) ブルー・コード試薬 (Blue Code Reagent) (Pierce) で染色した。矢印は、高分子量結合タンパク質 (HMW) および低分子量結合タンパク質 (LMW) の位置を表す。レーンAは、分子量マーカー (カレイドスコープ・プレステインド・スタンダード、Bio-Rad) を表す。レーンBは、未処置試料を表す。レーンCは、PBS中、34℃で1時間インキュベーションした試料を表す。レーンDは、水中、34℃で1時間インキュベーションした試料を表す。レーンEは、34℃にて、1mlのPBS中、300μgのPSP94と共にインキュベーションした試料を表す。レーンFは、レーンBの試料と同様に、マトリックスをPPBPと共にインキュベーションしたが、このインキュベーション中に、飽和状態の過剰の遊離PSP94が含まれていた、競合対照を表す。レーンGは、2Mの尿素中でインキュベーションした試料を表す。レーンHは、8Mの尿素中でインキュベーションした試料を表す。レーンIは、100mMの酢酸ナトリウム中、pH2.7で、インキュベーションした試料を表す。レーンJは、100mMの3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸 (CAPS) 中、pH11.0で、インキュベーションした試料を表す。

30

40

【0211】

50

前記実験から、P S P 9 4 結合タンパク質およびP S P 9 4 アフィニティーマトリックスの相互作用が、様々な条件下で、とても安定していたことが、明らかである。多少の解離が、8 Mの尿素および極端なp Hで見られたが、これらの変性条件は、過剰の遊離リガンド（すなわち、P S P 9 4）を用いた非変性の競合的な解離よりも、好ましくない。それゆえ、このアプローチは、活性P S P 9 4 結合タンパク質を精製するために選択された。

【0212】

データは、図5のH M WおよびL M Wのバンドが、図4のバンドBおよびDと、各々、同じであることを示す。

【0213】

（実施例7）

P S P 9 4 アフィニティークロマトグラフィーによるP S P 9 4 結合タンパク質の精製
0.1% (v/v) ツイン20および0.05% (w/v) NaN_3 を含む、部分的に純粋なP S P 9 4 結合タンパク質（実施例4に記載したように生成した調製品）100ミリリットルを、（P S P 9 4 に関して）250マイクログラムのアフィニティーマトリックスと共に、16時間、34 でインキュベーションした。マトリックスを、使い捨てのポリプレップ（Poly-Prep）カラム（Bio Rad）を用いた急速濾過により、可溶性画分から分離した。カラムのエンドキャップに取り付けられた10mlの注射器から空気圧を加えることにより、液体を、カラムに押し込んだ。マトリックスを10mlの氷冷PBSで、同様に、3回洗浄し、マトリックスを、マイクロピペットでカラムのポリマー基盤支持体から回収した。2mgの遊離P S P 9 4 を含む、1ミリリットルの10mMリン酸ナトリウム、500mMのNaCl、pH7.5、中に、マトリックスを再度懸濁し、ゆるやかに振とうしながら、34 で5時間、インキュベーションした。次いで、マトリックスを、遠心分離（1000xg、30秒間）により、溶液から分離し、（溶出されたP S P 9 4 結合タンパク質および遊離P S P 9 4 を含む）上清を、室温で、10mMリン酸ナトリウム、500mMのNaCl、pH7.5で平衡化した1x20cmセファデックス（sephadex）G100カラムを用い、一分当たりおよそ0.7mlの流速で流した、分子ふるいクロマトグラフィーにより、分離した。溶出液の280nmでの吸光度は、チャート式記録形上で記録した（図6）。P S P 9 4 結合タンパク質の捕捉、溶出、および精製産物の定性的な評価を、非還元7.5% SDS-PAGEによつて、行なった（図7）。

【0214】

図6は、硫酸アンモニウム沈降および陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した試料の（P S P 9 4 接合アフィニティーマトリックス（セファデックスG100）を用いた）アフィニティークロマトグラフィーの結果を示す。

【0215】

P S P 9 4 結合タンパク質は、過剰のP S P 9 4（遊離P S P 9 4）を加えることによって、カラムから溶出させた。高分子量タンパク質は、総量4ml（点AとBの間）で回収した。この溶液は、遠心分離濃縮器（Amiconからのセントリコン10）を用いて、PBS（150mMのNaCl）に交換され、1マイクロリットル当たりおよそ100ngに濃縮された緩衝液であった。典型的には、100mlのPPBP出発物質から40マイクログラムを生産する。点AとBの間に位置するピークは、P S P 9 4 結合タンパク質画分を表す。タンパク質は、280nmで測定した吸光度によって、検出し、定量化する。得られた結果は、遊離P S P 9 4 およびP S P 9 4 結合タンパク質の間で適切な分離を示す。

【0216】

図7は、非還元条件で行なったSDS-PAGE（7.5%）の写真である。レーンAは、分子量マーカー（カレイドスコウブ・プレステインド・スタンダード、Bio-Rad）である。レーンBは、硫酸アンモニウム沈降および陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製したP S P 9 4 結合タンパク質とのインキュベーション後、かつ、競合（すな

10

20

30

40

50

わち、過剰の) P S P 9 4 (すなわち、遊離 P S P 9 4)での溶出前の P S P 9 4 アフィニティマトリックスを表す。レーン C は、競合対照を表す。レーン D は、過剰の P S P 9 4 での溶出後のアフィニティマトリックスを表す。レーン E は、最終的に溶出され、かつ、濃縮された、(実質的に)純粋な P S P 9 4 結合タンパク質を表す。得られた結果は、アフィニティークロマトグラフィーにより、有意に、P S P 9 4 結合タンパク質の純度が増すことを示す。

【0217】

P S P 9 4 結合タンパク質の精製方法を、図 8 に要約している。

【0218】

(実施例 8)

10

P S P 9 4 結合タンパク質アミノ末端アミノ酸配列決定

S D S - P A G E ゲルは、実施例 5 に記載されたように調製した。しかしながら、タンパク質は、配列決定の準備のために、ミニ・トランス・ブロット・トランスファー・セル (Mini Trans-Blot transfer cell) (Bio-Rad) を、製造元の勧めに従って使い、配列決定等級 P V D F 膜 (プロブロット (ProBlott) 膜、Applied Biosystem) に転写した。この膜は、クマシー・ブリリアント・ブルーで染色し、アミノ末端 (すなわち、N-末端) アミノ酸配列決定により分析した。アミノ末端アミノ酸配列決定は、図 4 に示されたバンド B、C、および D に関して行なった。

【0219】

20

【表 7】

バンド	アミノ酸配列
B	(L) TDE (E) KRLMVELHN
C	遍在する免疫グロブリン配列
D	LTDEEKRLMVELHNLRYRAQVSPTASDMLHM

【0220】

表 7 に見られるように、バンド B および D は、同じ N 末端アミノ酸配列を有し、そのため、これらは、B がおそらくある型の集合体 (多重結合体) を表し、あるいは、B および D が代替的にスプライシングまたはプロセシングされた、同じタンパク質の異なる型であると思われる。

30

【0221】

(実施例 9)

P S P 9 4 結合タンパク質遺伝子配列のクローニング

全 RNA を、Tri-試薬 (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH) を使い、 2×10^6 ジャーカット (Jurkat) クローン E 6 - 1 細胞 (TIB 152, American Type Culture Collection, Manassas, VA) から、または、健康な献血者の末梢血単核細胞から単離した。RNA は、エタノール沈降し、水中に懸濁した。RNA は、サーモスクリプト RT-PCR システム (Life Technologies, Rockville, MD) を使い、cDNA に逆転写させた。cDNA は、プラチナ・Taq・DNA ポリメラーゼ・ハイ・フィデリティ (Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity) (Life Technologies) を使い、5' - プライマー (5' - ATGCACGGCTCCTGCAGTTTCCTGATGCTT - 3') および 3' - プライマー (5' - GCCCACGCGTCACTAGTAC (T)₁₇ - 3') (ライフ・テクノロジー・3' レース (Life Technologies 3' Race) アダプタープライマー、Life Technologies) を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、実質的に増幅させた。5' プライマー DNA 配列は、P S P 9 4 結合タンパク質アミノ酸配列、および

40

50

、遺伝子銀行データベース（国立衛生研究所、米国）G. B. 受入番号AA311654（EST182514 Jurkat T細胞VIホモ・サピエンスcDNA5' mRNA配列）に公表された、部分cDNA配列に基づいた。増幅させたDNAは、アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから切り出し、キアゲン（Qiagen）II DNA抽出キット（Qiagen, Mississauga, ON, Canada）を用いて濃縮した。精製したDNAは、pCR2.1プラスミド（Invitrogen, Carlsbad, CA）に結紮し、大腸菌株TOP10（Invitrogen）を形質転換するために用いた。アンピシリン耐性コロニーを、制限酵素分析およびDNA配列分析により、cDNA陽性挿入物を選別した。

【0222】

遺伝子銀行に、PSP94結合タンパク質のDNA配列をブラスト検索することにより、例えば、遺伝子銀行受入番号XM094933（PRI、2002年2月6日）、BC022399（PRI、2002年2月4日）、NM153370（PRI、2003年4月7日）、BC035634（PRI、2002年9月23日）など、有用性が未知の幾つかのDNA配列が同定された。

【0223】

（実施例10）

PSP94結合タンパク質メッセンジャーRNAの組織発現

PSP94結合タンパク質メッセンジャーRNA（mRNA）を、単離し、サイズとヒト組織における相対的な発現レベルを、ノーザンブロットにより測定した。1レーンにつき1または2マイクログラムのヒト組織ポリA RNAを含む市販のノーザンブロット（Multiple Tissue Northern（MTNTM）Blot, Clontech, Palo Alto, CA）を、製造元の勧めにしたがって、PSP94結合タンパク質cDNA配列346から745に及ぶ^[32P]標識化PSP94結合タンパク質cDNAプローブと、ハイブリダイズさせた。バンドの強度を、アルファ・イメージャー（alpha imager）2000、22595型を用いて、定量化した。バンドの相対的な強度を測定し、+から+++まで変動する任意のスコアを与えた。このスコア付けは、見られる最低の検出可能な2.0 kbのシグナルバンドに基づいた。

【0224】

図9aおよび9bに示された結果の定量化は、各々、表8と9に要約する。簡単には、脳、心臓、骨格筋、結腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、前立腺、精巣、卵巣、および、末梢血リンパ球（PBL）からのRNAを、PSP94結合タンパク質RNA発現について分析した。

【0225】

10

20

30

【表 8】

組織	RNAシグナル (+) サイズ k b	相対強度
脳	0	
心臓	+ 2. 0	+++
骨格筋	+ 2. 0	++
結腸	+ 2. 0	+
胸腺	+ 2. 0	+
脾臓		
腎臓		
肝臓		
小腸	+ 2. 0	+
胎盤		
肺		
肝臓		

10

【 0 2 2 6 】

20

【表 9】

組織	RNAシグナル (+) およびサイズ k b	相対強度
脾臓		
胸腺		
前立腺	+ 2. 0	+++
精巣	+ 2. 0 および 2. 5	++
卵巣	+ 2. 0	++
小腸	+ 2. 0	+++
結腸	+ 2. 0	+
P B L		

30

【 0 2 2 7 】

(実施例 1 1)

遊離 P S P 9 4、結合 P S P 9 4、および P S P 9 4 結合タンパク質に対するモノクローナル抗体の生成

抗体生成

ここに記載した免疫化の概要は、P S P 9 4 結合タンパク質に結合した時に、露呈される P S P 9 4 のエピトープに対する抗体の生成を促進するために開発された。

40

【 0 2 2 8 】

(a、b、c および d として識別された) 4 匹の B a l b / c マウスを、T i t e r M a X^{T M} アジュバント中の (実質的に) 純粋な P S P 9 4 結合タンパク質 (すなわち、この調製物は P S P 9 4 も含む) 調製物、各 1 5 マイクログラムで、皮下的に免疫性を与えた。2 1 日後、全てのマウスに二回目の追加免疫 (ブースト) を行い、さらに 8 日後、マウス血清を、前記 E L I S A スクリーニング分析で P S P 9 4 と P S P 9 4 結合タンパク質の両方に対する反応について試験した。P S P 9 4 結合タンパク質の精製は、全ての結合部位を P S P 9 4 で飽和させることを含むので、実質的に純粋な P S P 9 4 結合タンパク質の調製物で免疫化した動物の血清を、両方の抗原に対する陽性を試験した。

50

【0229】

マウス a および b は、更にアジュバントを含まない P S P 9 4 結合タンパク質 1 5 μ g を腹膜内に追加投与した。残りの 2 匹のマウス (c および d) は、P S P 9 4 の露呈されたエプトープに対する抗体を得る可能性を増やすために、T i t e r M a x ^{T M} アジュバント中、1 5 μ g の天然 P S P 9 4 と共に、更に 1 5 μ g の P S P 9 4 結合タンパク質を皮下に追加投与した。

【0230】

さらに 4 日後、マウス A および B の脾臓を採取し、B リンパ球を回収し、ハイブリドーマを生成するために、N S O 骨髄腫細胞と融合させた (G a l f r e e G . および M i l s t e i n C , M e t h . E n z y m o l . 7 3 : 3 - 4 6 , 1 9 8 1) 。 I s c o v e ' s M D M 選択培地 (2 0 % F B S , H A T , 1 0 n g / m l インターロイキン 6 、および抗生物質で補充した) 中の 1 0 万脾臓細胞を、9 6 ウェルプレートの各ウェルに播種した。抗体は、細胞から分泌されるので、細胞培養培地 (すなわち、上清) を、生成された抗体の特徴付けのために採取することができる。3 7 °C でのインキュベーション 1 0 日後、クローンを含むウェルの上清を、E L I S A スクリーニング分析 (以下を参照) により、評価した。P S P 9 4 または P S P 9 4 結合タンパク質プレートに陽性の認識 (結合) を示し、P B S 被覆プレートに対する非特異的結合を示さない抗体を生成するクローンを、更なる調査と特徴付けのために選択した。

【0231】

所望する (陽性) クローンを、6 ウェルプレートに播種した。上清を、特異抗体の存在について再度試験し、陽性のままであるクローンの上清を、限界希釈法により、クローニングの連続サイクルに通した。そのような方法のクローニングは、生成されたハイブリドーマ細胞系が安定し、純粋であることを、保証する。典型的には、この目的を達成するために、2 サイクルのクローニングが必要であった。凍結保存の複数のガラス瓶を調製し、各群から、1 つのガラス瓶を、生存可能性と抗原生成について試験した。クローンの特徴付けの結果を、表 1 0 に示す。

【0232】

(実施例 1 2)

抗体の特徴づけ

E L I S A に基づいたハイブリドーマスクリーニング分析

マウス、または、マウス B 細胞から生成されたハイブリドーマから生産される抗体の力価および特異性を評価するために、E L I S A スクリーニング分析を開発した。

【0233】

簡単には、マイクロタイタープレート (N u n c , M a x i S o r p) を、天然 P S P 9 4 (ヒト精漿から単離 ; 0 . 1 M 炭酸ナトリウム p H 9 . 6 中、5 μ g / m l) 、または、P S P 9 4 結合タンパク質 (0 . 1 M , N a H C O ₃ 中、0 . 1 μ g / m l) 、または、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S ; 1 4 0 m M , N a C l , 1 0 m M , リン酸ナトリウム、p H 7 . 5) のいずれかのアリコート 1 0 0 μ l で、一晚、4 °C で被覆した。プレートを、リン酸緩衝生理食塩水中の 1 % ウシ血清アルブミン (B S A) 溶液で、1 時間、3 4 °C にて、ブロックした (B S A は、結合部位を飽和させ、プレートへの非特異結合を制限する) 。次いで、マウス血清試料もしくは 0 . 5 % B S A で希釈したハイブリドーマ上清を加える前に、プレート (ウェル) を、0 . 1 % ポリオキシエチレン - ソルピタンモノラウラートを含む P B S (P B S - T w e e n) で洗浄した。P B S - 0 . 5 % B S A 中、マウス免疫グロブリンを認識するペルオキシダーゼ接合ポリクローナルウサギ免疫グロブリン (ウサギ抗マウス I g G ペルオキシダーゼ) の 1 : 1 0 0 0 希釈液を加える前に、プレートを、1 時間、3 4 °C でインキュベーションした。3 4 °C での更なる 1 時間のインキュベーション後、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (T M B) 中でのペルオキシダーゼシグナルの顕色前に、プレートを、P B S - T w e e n で十分に洗浄した。3 0 分後、6 3 0 n m での光学密度を、マイクロプレートリーダーで読んだ。

【0234】

10

20

30

40

50

抗体精製

マウスIgG1モノクローナル抗体を、Antibodies: A Laboratory Manual eds HarlowおよびLane, Cold Spring Harbor Laboratory

で詳述された高塩タンパク質A方法を用いて精製した(前記を参照)。

【0235】

抗体アイソタイピング

アイソタイピングを、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(Roche Diagnostics Corporation Indianapolis USA)を用いて行なった。このキットは、種類(IgG、IgA、またはIgM)、軽鎖の型(または)、およびIgGサブタイプ(IgG1、IgG2a、IgG2b、またはIgG3)に関する情報を提供する。試験した抗体は、主にIgG1サブタイプのものであった。しかしながら、一つの抗体については、IgMサブタイプのものであることが示された(B26B10)。

10

【0236】

相対エピトープ分析

ELISAプレートは、PSP94結合タンパク質、または、PSP94のどちらかで被覆し、前記したように、ブロッキングした。前記したように調製した、適切な濃度のピオチン化抗体を、50倍過剰量の未標識抗体のパネルの存在もしくは不在下で、被覆されたプレートと共にインキュベーションした。未標識抗体との競合は、2つの抗体間で共有されるエピトープを示す。競合の欠如は、独立したエピトープを示す。エピトープの結果は、表10に示す。

20

【0237】

【表10】

クローン	特異性	クラス及びサブクラス	エピトープを共有するもの	ATCC特許寄託番号
2B10	結合タンパク質	IgG ₁ κ	9B6、3F4	—
1B11	結合タンパク質	IgG ₁ κ	唯一	—
9B6	結合タンパク質	IgG ₁ κ	2B10、3F4	—
17G9	結合タンパク質	IgG ₁ κ	唯一	PTA-4243
3F4	結合タンパク質	IgG ₁ κ	2B10、9B6	PTA-4242
P8C2	結合タンパク質	IgG ₁ κ	唯一	—
B3D1	結合タンパク質	IgG ₁ κ	—	—
26B10	結合タンパク質	IgMκ	—	—
2D3	遊離PSP94	IgG ₁ κ	唯一	PTA-4240
P1E8	遊離および結合(全)PSP94	IgG ₁ κ	唯一	PTA-4241
12C3	遊離PSP94	IgG ₁ κ	唯一	—

30

40

【0238】

抗体ピオチン化

精製した抗体の希釈剤(緩衝液)を、0.1MのNaHCO₃緩衝液、pH8.0に変え、タンパク質濃度を1mg/mlに調節した。2mg/mlのピオチンアミドカプロアートN-ヒドロキシスクシニミドエステル溶液を、DMSO中で調製し、この溶液の適切な容量を、抗体に、5、10、または20倍過剰のピオチン化剤を生じるように加えた。これを、0.1M、NaHCO₃中の0.2Mグリシン等容積を、最終濃度が0.1M

50

リシンになるように加える前に、氷上で、時折振とうしながら、2時間インキュベーションした。

【0239】

氷上でさらに一時間インキュベーション後、抗体を、PD10ゲル濾過カラム(Biorad)を用いたゲル濾過により、遊離ビオチン化剤から分離した。ビオチン化抗体は、防腐剤として加えられた0.05%アジ化ナトリウムと共に4℃で保存した。ビオチン化の最適範囲およびビオチン化抗体の最適使用濃度を、抗原被覆プレート上で測定した。

【0240】

ウエスタンブロット

抗体は、ウエスタンブロットで評価した。簡単には、0.2マイクログラムの(実質的に)精製したPSP94結合タンパク質、または、25マイクロリットルの部分的に純粋なPSP94結合タンパク質を、非還元条件下で、7.5%SDS PAGEゲル上で流した。タンパク質を、PVDF膜に写し、膜を、1%BSAでブロッキングし、1:5の希釈(PBS/0.5%BSA中)でハイブリドーマの上清を用いて調べ、そして、結合した抗体を、ウサギで高めた抗マウス免疫グロブリンペルオキシダーゼ接合物で検出した。シグナルは、0.05%ジアミノベンジジン、0.01%過酸化水素で顕色させた。

10

【0241】

遊離または全PSP94に対するPSP94抗体の特異性

ここで生成された抗体の特異性を更に特徴付けるために、モノクローナル抗体が、遊離型の、および/または、PSP94結合タンパク質に結合している時の、PSP94を、

20

【0242】

PSP94/PSP94結合タンパク質複合体の形成を促進するために、2つの(実質的に、または、部分的に)精製されたタンパク質を、共に、予めインキュベーションした。簡単には、0.5%BSAを含むPBS中、1mg/mlの濃度(全タンパク質濃度)の、部分的に純粋なPSP94結合タンパク質調製物(実施例4参照)を、34℃で1時間、5μg/mlの天然のPSP94と共に、または、5μg/mlの天然のPSP94を伴わずに、予めインキュベーションした。

【0243】

ELISAプレート(96ウェルプレート)は、2μg/ml(0.1MのNaHCO₃、pH8.0、中)の濃度で、17G9モノクローナル抗体を用い、一晚、4℃でのインキュベーションにより被覆した。ここに記載するように、この抗体は、PSP94結合タンパク質を認識する。プレートのウェルを、続けて、1%BSAで、1時間、34℃にてブロッキングした。前記で生成したPSP94/PSP94結合タンパク質複合体は、あらゆる未結合物質を洗浄除去する前に、17G9被覆プレートで、1時間、34℃にてインキュベーションした。次いで、プレートを、ビオチン化PSP94特異抗体(PBS-0.5%BSA中、2μg/ml)と共にインキュベーションした。これらの抗体のどの陽性結合も、認識されたPSP94エピトープが、PSP94結合タンパク質に結合している時でさえ、露呈されている(利用できる)ことを示すであろう。これらの結果を、表10に示す。結合PSP94へのビオチン化PSP94特異抗体の結合は、ストレプト

30

40

【0244】

図11に示す結果は、試験した抗体のいずれもが、捕捉されたPSP94結合タンパク質と、結合部位がPSP94で飽和されていない場合、反応しないことを示す。結合部位が、PSP94で飽和されている場合、P1E8は、複合体に対して、強い反応性を示す。しかしながら、2D3と12C3は、示さない。このように、P1E8は、結合および遊離PSP94を認識し、他の2つの抗体(2D3および12C3)は、タンパク質の遊離型だけを認識する。抗体2D3と12C3は、おそらく、PSP94結合タンパク質と結合する際に、マスクされるPSP94エピトープを認識するのであろう。これらの各抗

50

体は、E L I S A プレートに被覆されると、天然および組換え P S P 9 4 を検出する。全ての3つの抗体が、P S P 9 4 の濃度の有用な範囲にわたって、直線状の標準曲線を生じるための、サンドウィッチ E L I S A 形式における、捕捉または検出抗体として機能する。しかしながら、1 2 C 3 は、2 D 3 または P 1 E 8 よりも、P S P 9 4 に対して、親和性が低いようである。

【0245】

P S P 9 4 を検出するためのこれらの抗体の有用性は、以下の分析で示された：E L I S A プレートを、p H 9 . 6 の炭酸緩衝液中、5 μ g / m l の P S P 9 4 で被覆し、4 で一晩インキュベーションした。プレートを、1 % B S A で、一晩、3 4 にて、ブロッキングした。試料を、次いで、プレート中で、一晩、4 にて、インキュベーションした。ビオチン化 P 1 E 8 を、1 マイクログラム / m l で、2 時間、3 4 にて加え、ペルオキシダーゼストレプトアビジンを、3 4 で1時間、加え、T M B で顕色した。定量化の下限值 (L L Q) は、1 n g / m l の範囲であることが示された。分析 (例えば、標準曲線) が、天然 P S P 9 4 (すなわち、ヒト血清から単離された P S P 9 4) または組換え P S P 9 4 で行なえることが、特に注目される。

【0246】

(実施例 1 3)

遊離 P S P 9 4 免疫検出分析

前記3つの P S P 9 4 モノクローナル抗体 (2 D 3 (P T A - 4 2 4 0) 、 P 1 E 8 (P T A - 4 2 4 1) 、 1 2 C 3) は、競合 E L I S A 分析 (すなわち、プレートを P S P 9 4 (または、試料) で被覆し、P S P 9 4 被覆プレートへのモノクローナル抗体の結合を阻害するために、試料中に P S P 9 4 を用いること) に用いられる。2 D 3 の競合 E L I S A 形式における使用を調べた。

【0247】

遊離 P S P 9 4 を測定するための E L I S A 分析の例は、E L I S A プレートを 2 D 3 抗体で被覆することを含む。被覆したプレートを、次いで、試料と共にインキュベーションし、そして、2 D 3 と P 1 E 8 は異なる P S P 9 4 エピトープを認識するため、P S P 9 4 を、ビオチン化 P 1 E 8 により検出させることができる。図 1 2 b は、図 1 2 a に示す方法を用いた E L I S A 分析の結果を表す。

【0248】

E L I S A 分析時に起こり得る P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質複合体の解離 (例えば、2 D 3 によって促進される) を抑えるために、改良点を導入した。簡単には、改良した分析は、分析を行なう前に、P S P 9 4 結合タンパク質抗体を用い、P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質複合体を予め吸着すること (除去すること) を含む。P S P 9 4 結合タンパク質抗体は、選択的に、P S P 9 4 - 結合タンパク質および P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質複合体 (すなわち、結合 P S P 9 4) を除去する。これは、P S P 9 4 結合タンパク質と P S P 9 4 との間の平衡反応の反応速度を乱すことなく、行なうことができる。例えば、セファロースマトリックスに結合させた 1 7 G 9 を用いて予め吸着させることができ、その結果、複合体を含まない (未結合 P S P 9 4 は残存している) 試料を生じる。次いで、試料を前記のように処理する (すなわち、複合体不含試料を、2 D 3 で被覆したプレートとインキュベーションし、ビオチン化 P 1 E 8 で検出する) 。

【0249】

(実施例 1 4)

全 P S P 9 4 免疫検出分析

P 1 E 8 抗体は、遊離および結合型の両方の P S P 9 4 を認識することができるので、全 P S P 9 4 を測定するための分析が開発された。例えば、P 1 E 8 を、プレートに固定化し、そして、遊離 P S P 9 4 および P S P 9 4 結合タンパク質と複合化した P S P 9 4 を含む試料を加えた。P S P 9 4 および複合体は、抗体に結合したままであり、P 1 E 8 とは異なる親和性 (P S P 9 4 における異なる結合部位) を有する抗体を加えることができる。そのような抗体の例は、2 D 3、または、任意の他の適切な P S P 9 4 抗体である

。検出は、2 D 3 に接合させることができる標識を用いることによって、または、直接的もしくは間接的（例えば、ビオチン/アビジン、もしくは、ストレプトアビジンシステム）に、2 D 3 抗体を認識する第二の分子（抗体もしくはタンパク質）によって、行なうことができる。

【0250】

しかしながら、2 D 3 が、P S P 9 4 と P S P 9 4 結合タンパク質との間の結合平衡を乱すかもしれないという観察に基づいて、全 P S P 9 4（結合および未結合）を測定するための分析を改良した。

【0251】

特に、分析を、図 1 3 に示すように、行なった。図 1 3 において、全 P S P 9 4 を、P 1 E 8 抗体で捕らえ、高濃度（過剰）のビオチン化 2 D 3 を、P S P 9 4 結合タンパク質の解離（置換）を促進するために用いる。前記した分析において、プラスチックが 5 0 n g 以下の受容力を有するため、プレートを被覆するための 2 D 3 の実際の濃度は低い。

【0252】

複合体（P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質）を、測定前に、血清から吸着除去する場合、この分析は、遊離（未結合）P S P 9 4 を測定することもできることに留意すべきである。

【0253】

（実施例 1 5）

P S P 9 4 結合タンパク質免疫検出分析

全ての P S P 9 4 結合タンパク質抗体についての特異性を、前記 E L I S A 分析およびウェスタンブロットにより確認した。それらの各々は、ウェスタンブロットにより、結合タンパク質の高および低分子量型の両方を認識する。

【0254】

表 1 0 に示すように、抗体 1 7 G 9 は、3 F 4 とは異なるエピトープを認識する。このように、図 1 4 a に示すように、サンドウィッチ E L I S A 分析は、これらの 2 つの抗体を用いて顕色させる。図 1 4 b は、血清試料中の P S P 9 4 結合タンパク質を測定するために用いられた分析の標準曲線を示す。これら 2 つの抗体は、交換できることに留意すべきである。例えば、捕獲抗体は、検出試薬（標識された場合）として用いられるように変更されることができる。

【0255】

男性ドナー由来の 4 0 血清試料を、前記（図 1 4 a に示した）P S P 9 4 結合タンパク質 E L I S A 分析で評価した。P S P 9 4 結合タンパク質血清濃度を、連続的に測定した。これらの男性ドナーにおける P S P 9 4 結合タンパク質値は、約 1 μ g / m l から約 1 0 μ g / m l まで変動し、2 例で 2 0 μ g / m l を超えた。女性ドナー由来の 2 例を評価した；一つは約 3 μ g / m l であり、他方は、約 7 . 8 μ g / m l である。

【0256】

（実施例 1 6）

免疫検出分析の適用

既知の全 P S A 値のヒト男性血清の試料を、参照標準実験から得た。4 0 例は、低い全 P S A 血清レベル（< 4 n g / m l）を有し、および、6 9 例は、高い全 P S A 血清レベル（> 4 n g / m l）を有した。分析は、これらの低および高カテゴリーで行なった。これらの患者までさかのぼることができる関連がなく、従って、全 P S A 値以外、標本と結びついた臨床的な情報がない。この分析の目的は、P S P 9 4 測定の臨床的な関連性を決定するのではなく、傾向とパターンを探ることである。全 P S P 9 4、P S P 9 4 結合タンパク質、遊離 P S P 9 4、および補正遊離 P S P 9 4 の血清濃度の分布を、ここに記載する更なる図に示す。

【0257】

更なる図について；

図 1 5 A は、P S A 値が、カットオフ値 4 n g / m l よりも低い、もしくは、高いこと

10

20

30

40

50

が知られている、個体の血清中の全 P S P 9 4 の測定に次いで、そして、図 1 3 に示され、かつ、実施例 1 4 に記載された分析を用いて、得られた結果を示すグラフである。結果は、各個体について測定された全 P S P 9 4 濃度 (n g / m l) の対数として表す。各点は、特定の個体について得られた結果を表す。この図に関して、1 から 2 2 5 0 n g / m l の全 P S P 9 4 濃度は、個体の血清中で測定した。

【 0 2 5 8 】

図 1 5 B に関し、この図は、P S A 値が、カットオフ値 4 n g / m l よりも低い、もしくは、高いことが知られている、個体の血清中の遊離 P S P 9 4 の測定後に得られた結果を示すグラフである。結果は、サンドウィッチ E L I S A 分析における 2 D 3 と P 1 E 8 モノクローナル抗体を用いた遊離 P S P 9 4 の測定の前の、ここに記載した抗 P S P 9 4 結合タンパク質抗体を用いた、P S P 9 4 結合タンパク質および P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質複合体の血清からの除去 (枯濁) に基づいた分析を用いて得られた。結果は、各個体について測定した遊離 P S P 9 4 濃度 (n g / m l) の対数として表す。各点は、特定の個体について得られた結果を表す。

10

【 0 2 5 9 】

図 1 5 C に関し、この図は、P S A 値が、カットオフ値 4 n g / m l よりも低い、もしくは、高いことが知られている、個体の血清中の全 P S P 9 4 結合タンパク質の測定後に得られた結果を示すグラフである。結果は、図 1 4 a に示され、実施例 1 5 に記載された分析を用いて得られた。結果は、各個体について測定した全 P S P 9 4 結合タンパク質濃度 (n g / m l) の対数として表す。各点は、特定の個体について得られた結果を表す。この図に関し、0 . 7 から 1 2 5 マイクログラム / m l まで変動する P S P 9 4 結合タンパク質濃度を、個体の血清中で測定した。

20

【 0 2 6 0 】

図 1 5 D に関し、この図は、P S A 値が、カットオフ値 4 n g / m l よりも低い、もしくは、高いことが知られている、個体の血清中で得られた遊離 P S P 9 4 濃度の補正後に得られた結果を示すグラフである。結果の取得に影響を及ぼすであろう枯濁後でも、1 から 5 % の残存 P S P 9 4 / P S P 9 4 結合タンパク質複合体が、血清中に残っていること、すなわち、2 D 3 抗体が加えられた後、複合体から P S P 9 4 が解離し、疑似的に「遊離 P S P 9 4 」値が増加することがあることを考慮して、結果を補正した。結果は、再度、各個体について測定した補正遊離 P S P 9 4 濃度 (n g / m l) の対数として表す。各点は、特定の個体について得られた結果を表す。この図に関し、補正された遊離 P S P 9 4 レベルは、高 P S A カテゴリー (> 4 n g / m l) で、有意に上昇した。

30

【 0 2 6 1 】

図 1 6 は、個体の血清中で測定した、全 P S P 9 4 結合タンパク質濃度 (n g / m l) 対全 P S P 9 4 濃度 (n g / m l) を示すグラフであり、各点は、特定の個体について得られた結果を表す。この図に関し、これら 2 つのパラメーター間に、有意な正の関係が観察されるであろう。

【 0 2 6 2 】

この明細書中に引用された全ての文献および特許出願は、各個々の文献および特許出願が、明確かつ個別的に、参照によって組み込まれるように示されたかのように、ここに参照によって組み込まれる。任意の文献の引用は、出願日前の開示のためであり、本発明が、先行発明によるそのような文献に先行する権利がないことを認めることとして解釈されるべきではない。

40

【 0 2 6 3 】

前述の発明は、理解を明確にするための図面および実施例として、多少詳細に記載しているが、当業者にとって、本発明の教示に鑑みて、添付のクレームの精神または範囲から逸脱することなく、それに、特定の変更と改変をなすことができることは非常に明確である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 6 4 】

50

【図1】図1は、ヨウ素の同位元素 ^{125}I で放射標識されたPSP94に結合した(特異的に結合している)ヒト男性血清由来のタンパク質のサイズ除外クロマトグラフィーの結果を示すグラフである。ヒト男性血清タンパク質への ^{125}I -PSP94の結合は、各画分における、一分当りのカウント(cpm)で表わされる放射能により測定する。非特異結合は、インキュベーション混合物中に、ヒト男性血清および ^{125}I -PSP94と共に、遊離PSP94を含ませることによって、測定した。遊離-および複合-PSP94(担体と会合したPSP94)を含む画分の位置をグラフに示す。

【図2】図2は、硫酸アンモニウム沈降により部分的に精製された、ヒト男性血清由来のタンパク質の画分中の ^{125}I -PSP94結合の結果を表すグラフである。全ヒト男性血清を、様々な濃度の硫酸アンモニウム(0から32%、32から47%、47から62%、および、62から77%の硫酸アンモニウム(%は、W/Vで計算した))で沈降し、画分内のPSP94結合活性の存在を、放射性標識したPSP94の、各血清画分(高分子量成分)中に含まれるタンパク質との会合能を測定することによって、評価した。結果は、結合分析に用いられた放射能の総量に対する、各画分中のヒト男性血清タンパク質に結合した放射能の量として(百分率で)表す。

【図3】図3は、硫酸アンモニウムにより精製したタンパク質で充填した、マクロプレップ・ハイ・キュー(MacroPrep High Q)陰イオン交換カラムを用いた、陰イオン交換クロマトグラフィーの結果を示すグラフである。タンパク質は、塩化ナトリウムで溶出する。点AとBの間に位置するピークは、PSP94結合タンパク質を含むタンパク質画分を表す。タンパク質は、280nmで測定した吸光度によって検出し、定量した。

【図4】図4は、PSP94-アフィニティークロマトグラフィー後、得られた試料を充填した還元ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)ゲルの写真である。ゲルは、電界中で泳動し、ゲルコード(Gelcode)(登録商標)ブルーコード(Blue Code)試薬(Pierce)で染色した。レーン1は、分子量マーカを表す。レーン2は、PSP94接合アフィニーマトリックスに結合したタンパク質を表す。レーン3は、インキュベーション混合物中に過剰の遊離PSP94を含ませた時のPSP94接合アフィニーマトリックスに結合したタンパク質を表す。

【図5】図5は、異なる溶出(解離)条件を用いたPSP94接合アフィニーマトリックスからのPSP94結合タンパク質の溶出後に得られた試料で充填した非還元SDS-PAGEゲルの写真である。インキュベーション後、異なる溶出緩衝剤中、アフィニーマトリックスを、遠心分離により溶出緩衝剤から除去した。マトリックスを、PBSで洗浄し、非還元SDS-PAGE試料緩衝剤中で煮沸させた。SDS-PAGEは、電界中で泳動し、ゲルコード(登録商標)ブルーコード試薬(Pierce)で染色した。矢印は、高分子量結合タンパク質(HMW)および低分子量結合タンパク質(LMW)の位置を表す。レーンAは、分子量マーカを表す。レーンBは、未処置試料を表す。レーンCは、PBS中、34で1時間インキュベーションした試料を表す。レーンDは、水中、34で1時間、インキュベーションした試料を表す。レーンEは、34で、1mlのPBS中、300 μg のPSP94と共にインキュベーションした試料を表す。レーンFは、競合対照を表す。レーンGは、2Mの尿素中でインキュベーションした試料を表す。レーンHは、8M尿素中で、インキュベーションした試料を表す。レーンIは、100mMの酢酸ナトリウム、pH2.7で、インキュベーションした試料を表す。レーンJは、100mMの3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸(CAPS)、pH11.0でインキュベーションした試料を表す。

【図6】図6は、硫酸アンモニウム沈降後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した試料の(PSP94-接合アフィニーマトリックスを用いた)アフィニティークロマトグラフィーの結果を示すグラフである。点AとBの間に位置するピークは、PSP94結合タンパク質画分を表す。タンパク質は、280nmでの吸光度によって、検出され、定量される。

10

20

30

40

50

【図 7】図 7 は、非還元条件で行なった SDS - PAGE の写真である。レーン A は、分子量マーカーである。レーン B は、硫酸アンモニウム沈降および陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製された P S P 9 4 結合タンパク質とのインキュベーション後、かつ、競合する P S P 9 4 での溶出前の P S P 9 4 アフィニティマトリックスを表す。レーン C は、競合対照を表す。レーン D は、過剰の P S P 9 4 での溶出後のアフィニティマトリックスを表す。レーン E は、最終的に溶出および濃縮された、(実質的に)純粋な P S P 9 4 結合タンパク質を表す。

【図 8】P S P 9 4 結合タンパク質のために提案される精製方法の概略図である。

【図 9 A】図 9 A は、ヒト組織ポリ A の RNA 試料で行なったノーザンブロットの写真である。レーン 1 は、脳の RNA を表し、レーン 2 は、心臓の RNA を表し、レーン 3 は、骨格筋の RNA を表し、レーン 4 は、結腸の RNA を表し、レーン 5 は、胸腺の RNA を表し、レーン 6 は、脾臓の RNA を表し、レーン 7 は、腎臓の RNA を表し、レーン 8 は、肝臓の RNA を表し、レーン 9 は、小腸の RNA を表し、レーン 10 は、胎盤の RNA を表し、レーン 11 は、肺の RNA を表し、そして、レーン 12 は、末梢血リンパ球 (P B L) の RNA を表す。

10

【図 9 B】図 9 B は、ヒト組織ポリ A の RNA 試料で行なったノーザンブロットの写真である。レーン 1 は、脾臓の RNA を表し、レーン 2 は、胸腺の RNA を表し、レーン 3 は、前立腺の RNA を表し、レーン 4 は、精巣の RNA を表し、レーン 5 は、卵巣の RNA を表し、レーン 6 は、小腸の RNA を表し、レーン 7 は、結腸の RNA を表し、そして、レーン 8 は、抹消血リンパ球 (P B L) の RNA を表す。

20

【図 10】図 10 は、特異的モノクローナル抗体 (1 B 1 1) を用いた P S P 9 4 結合タンパク質の認識 (結合) を示すウエスタンブロットの写真である。レーン 1 は、分子量マーカー (上から下まで、2 1 2、1 3 2、8 6、4 4 k D a) である。レーン 2 は、0 . 2 μ g の (実質的に) 精製された P S P 9 4 結合タンパク質であり、レーン 3 は、2 5 μ g の部分的に純粋な P S P 9 4 結合タンパク質である。

【図 11】図 11 は、結合および遊離型の P S P 9 4 に対するモノクローナル抗体の特異性が評価される E L I S A プレートの写真である。着色したウェルは、陽性の結果を表す。

【図 12 A】図 12 A は、遊離 P S P 9 4 の量を測定するために用いられる方法の概略図である。

30

【図 12 B】図 12 B は、図 12 A に示された方法を用いた E L I S A 分析の結果である。

【図 13】図 13 は、試料中の全 P S P 9 4 の量を測定するために用いられる提案された方法 (P S P 9 4 サンドウィッチ E L I S A) の概略図である。

【図 14 A】図 14 A は、試料中の全 P S P 9 4 結合タンパク質の量を測定するために用いられる (P S P 9 4 結合タンパク質サンドウィッチ E L I S A を用いた) 方法の概略図である。

【図 14 B】図 14 B は、図 14 A に示された方法を用いて、試料中の P S P 9 4 結合タンパク質を測定するために用いられた E L I S A 分析の結果である。

【図 15 A】図 15 A は、低 (< 4 n g / m l) および高 (> 4 n g / m l) P S A カテ

40

ゴリーにおける個体の血清からの全 P S P 9 4 レベルの濃度を表す。

【図 15 B】図 15 B は、低 (< 4 n g / m l) および高 (> 4 n g / m l) P S A カテ

ゴリーにおける個体の血清からの遊離 P S P 9 4 レベルの濃度を表す。

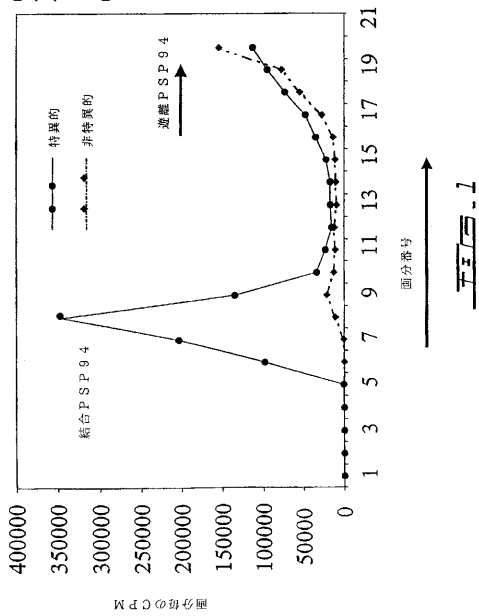
【図 15 C】図 15 C は、低 (< 4 n g / m l) および高 (> 4 n g / m l) P S A カテ

ゴリーにおける個体の血清からの補正された遊離 P S P 9 4 レベルの濃度を表す。吸着プロトコル後に、1 ~ 5 % の P S P 9 4 結合タンパク質 (および複合化 P S P 9 4) が残存していたので、遊離 P S P 9 4 値を、補正した。補正により、結合 P S P 9 4 x 吸着されていない P S P 9 4 結合タンパク質の割合を、未補正の遊離 P S P 9 4 値から差し引く。

50

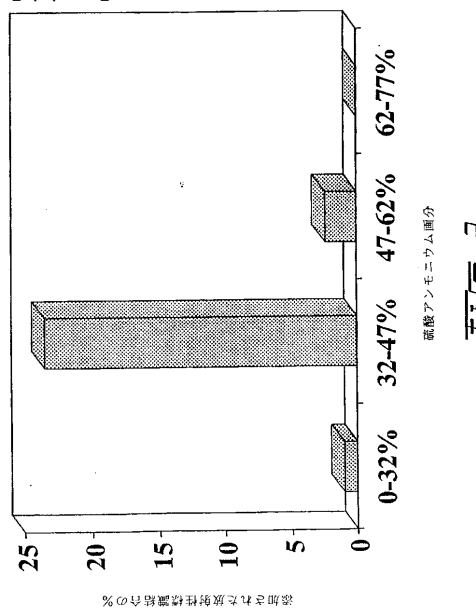
【図16】 図16は、全PSP94と比較した全PSP94結合タンパク質濃度を表す。

【図1】



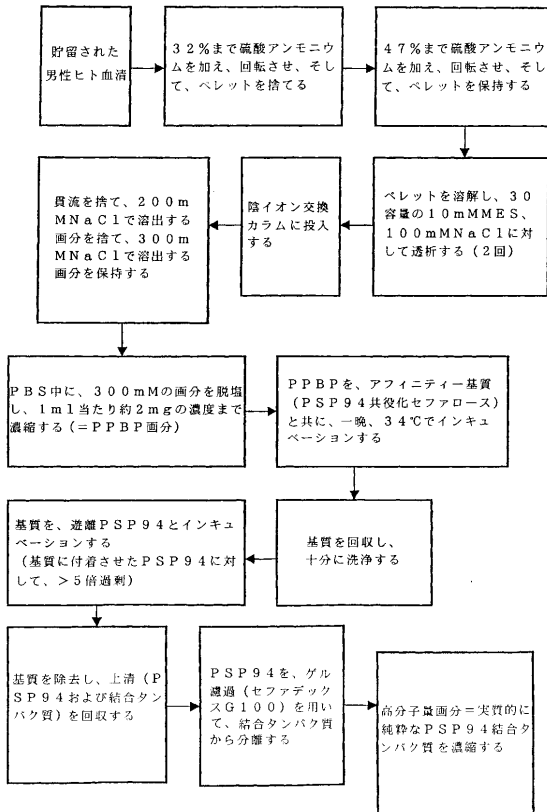
FEES-1

【図2】



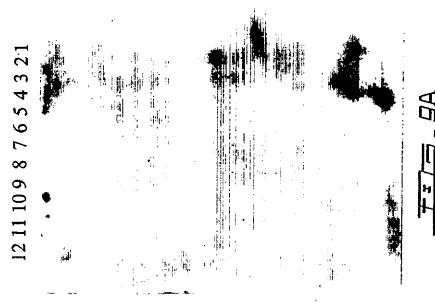
FEES-2

【図 8】



FIS-8

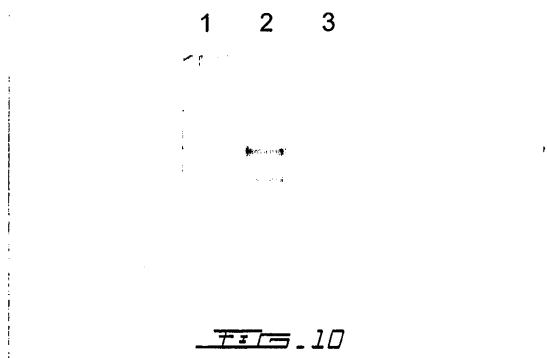
【図 9 A】



【図 9 B】

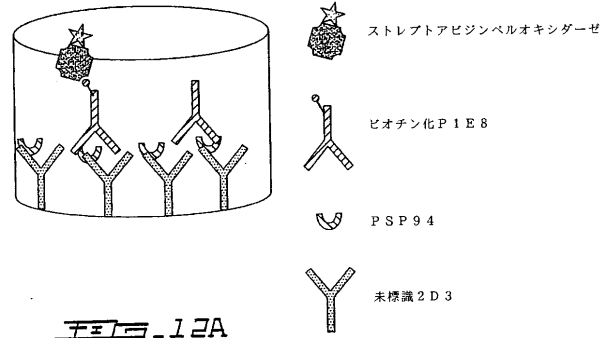


【図 10】



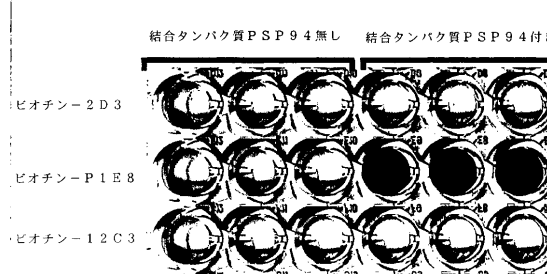
FIS-10

【図 12 A】



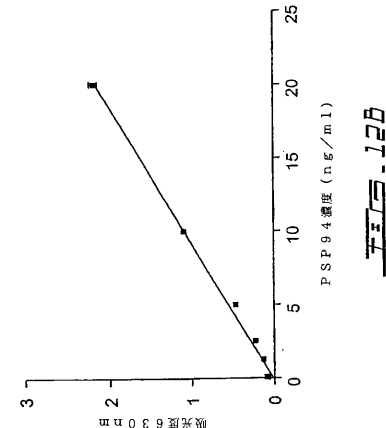
FIS-12A

【図 11】



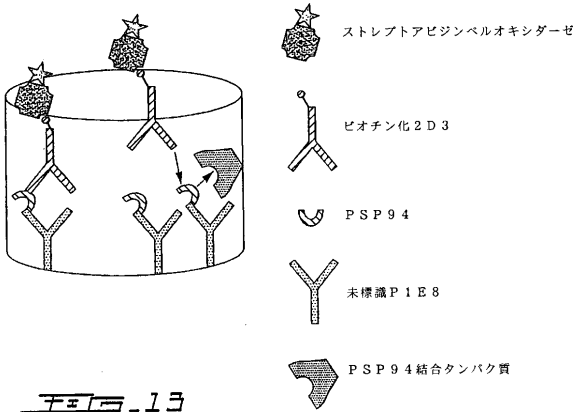
FIS-11

【図 12 B】

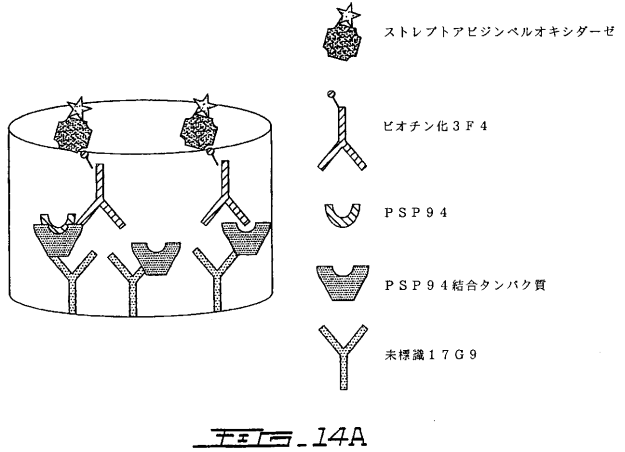


FIS-12B

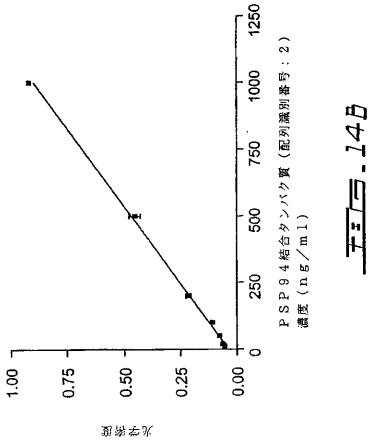
【図13】



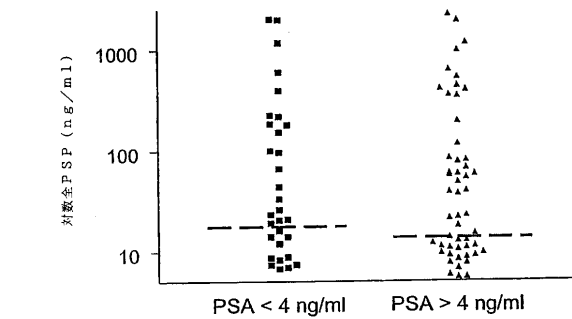
【図14A】



【図14B】



【図15A】

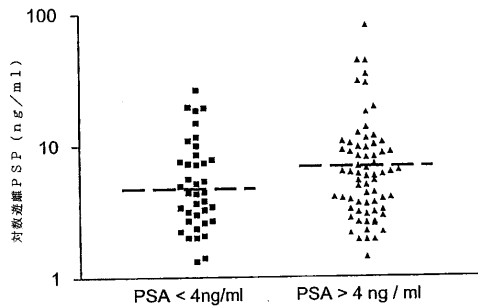


範囲	1.0 - 2007	1.8 - 2250
中央値	17.5	12.4
p値	0.58 (マンホイットニーU検定)	

全PSP94

FIG. 15A

【図 15 B】

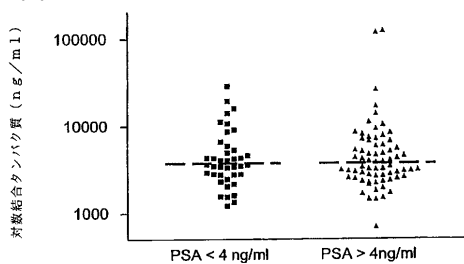


範囲	0.0 - 27.0	1.4 - 81.0
中央値	4.35	5.89
p 値	0.124 (マンホイットニーU検定)	

全PSP 94

FIG. 15 B

【図 15 C】

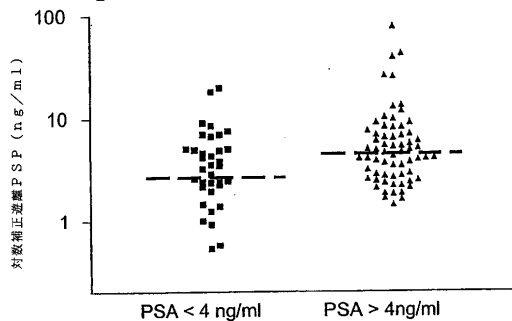


範囲	698 - 28,975	1437 - 125,000
中央値	3,614	3,464
p 値	0.94 (マンホイットニーU検定)	

全結合タンパク質

FIG. 15 C

【図 15 D】

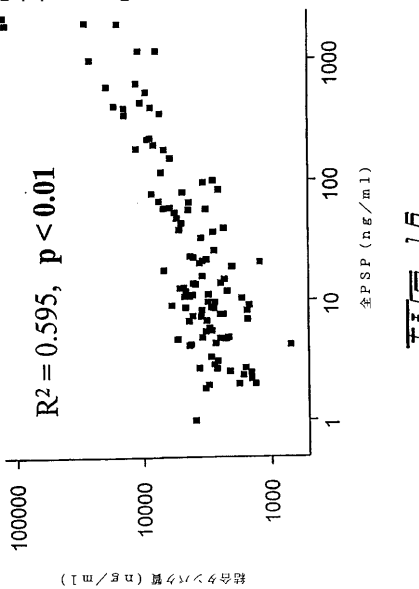


範囲	0 - 19.8	0 - 77.2
中央値	2.76	4.22
p 値	0.012 (マンホイットニーU検定)	

補正遊離PSP 94

FIG. 15 D

【図 16】



(結合タンパク質 (ng/ml))

FIG. 16

【配列表】

2005523724000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/CA 03/00639
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/17 C12N5/24 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 37638 A (GENENTECH INC ;NAPIER MARY A (US); ASHKENAZI AVI J (US); GODDARD A) 29 June 2000 (2000-06-29) SEQ ID NO: 29 and 30 ---	1-20,51
X	US 6 107 103 A (CHIN JOSEPH L ET AL) 22 August 2000 (2000-08-22) A the whole document ---	90 1-104
X	US 4 863 851 A (MCEWAN ROBERT N ET AL) 5 September 1989 (1989-09-05) A the whole document ---	90 1-104
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 8 August 2003		Date of mailing of the international search report 28/08/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bitang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/CA 03/00639

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WU DONGMEI ET AL: "Serum bound forms of PSP94 (prostate secretory protein of 94 amino acids) in prostate cancer patients." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 76, no. 1, November 1999 (1999-11), pages 71-83, XP002250627 ISSN: 0730-2312	90
A	the whole document	1-104
A	XUAN J W ET AL: "RECOMBINANT PSP94 (PROSTATE SECRETORY PROTEIN OF 94 AMINO ACIDS) DEMONSTRATES SIMILAR LINEAR EPITOPE STRUCTURE AS NATURAL PSP94 PROTEIN" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, WILEY-LISS INC, US, vol. 63, 1996, pages 61-73, XP002914839 ISSN: 0730-2312 the whole document	1-104
A	YANG J-P ET AL: "DETECTION OF PSP94 AND ITS SPECIFIC BINDING SITES IN THE PROSTATE ADENOCARCINOMA CELL LINE LNCAP" JOURNAL OF UROLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 160, no. 6, PART 1, December 1998 (1998-12), pages 2240-2244, XP009005158 ISSN: 0022-5347 the whole document	1-104

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 03/00639

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0037638	A	29-06-2000	AU 1749900 A	12-07-2000
			AU 2192800 A	12-07-2000
			AU 2474700 A	19-06-2000
			AU 3107000 A	19-06-2000
			AU 741133 B2	22-11-2001
			AU 3757099 A	08-11-1999
			CA 2324297 A1	28-10-1999
			CA 2347677 A1	08-06-2000
			CA 2348157 A1	08-06-2000
			CA 2353775 A1	29-06-2000
			CA 2353799 A1	29-06-2000
			EP 1071773 A1	31-01-2001
			EP 1141284 A2	10-10-2001
			EP 1135491 A2	26-09-2001
			EP 1141289 A2	10-10-2001
			EP 1135495 A2	26-09-2001
			JP 2002512032 T	23-04-2002
			JP 2002531092 T	24-09-2002
			US 2002192209 A1	19-12-2002
			US 2002192752 A1	19-12-2002
			WO 9954467 A1	28-10-1999
			WO 0032776 A2	08-06-2000
			WO 0032778 A2	08-06-2000
			WO 0037638 A2	29-06-2000
			WO 0037640 A2	29-06-2000
			US 2003082199 A1	01-05-2003
			US 6472585 B1	29-10-2002
			US 2002058309 A1	16-05-2002
			US 2002146707 A1	10-10-2002
			US 2002102622 A1	01-08-2002
			US 2003108983 A1	12-06-2003
			US 2003092002 A1	15-05-2003
			US 2003082540 A1	01-05-2003
			US 2003054400 A1	20-03-2003
			US 2003082541 A1	01-05-2003
			US 2003049676 A1	13-03-2003
			US 2003077654 A1	24-04-2003
			US 2003044839 A1	06-03-2003
			US 2003113718 A1	19-06-2003
			US 2003054401 A1	20-03-2003
			US 2003017463 A1	23-01-2003
			US 2003045693 A1	06-03-2003
			US 2003044793 A1	06-03-2003
			US 2003130489 A1	10-07-2003
			US 2003104381 A1	05-06-2003
			US 2003096233 A1	22-05-2003
US 6107103	A	22-08-2000	NONE	
US 4863851	A	05-09-1989	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/00	C
C 1 2 N 15/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/00	G 0 1 N 30/02	B
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 30/48	N
G 0 1 N 30/02	G 0 1 N 30/48	R
G 0 1 N 30/48	G 0 1 N 30/84	Z
G 0 1 N 30/84	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 15/00	C

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

(72) 発明者 ジョナサン・リーブス

カナダ・オンタリオ・K 6 G ・ 2 R 2 ・ ハークスバリュ・グリーンレーン・ロード・ 8 5 5

(72) 発明者 エドワード・ジェローム・タナー

カナダ・ケベック・H 9 G ・ 3 C 2 ・ ドラルド・デ・オルメオ・デ・アルプレ・ 1 1

(72) 発明者 ジェイ・シャンドラ・パンチャル

カナダ・オンタリオ・N 6 P ・ 1 E 3 ・ ロンドン・アウター・ドライブ・ 5 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12
EA04 GA11 HA12 HA15
4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24 CE04
CE10 CE11 CE12 DA05 DA14
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 AB05 BA02 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA42 DA75 EA28 EA51 FA72
FA74 GA06 GA21 GA23 GA26

专利名称(译)	PSP 94结合蛋白和PSP 94诊断分析		
公开(公告)号	JP2005523724A	公开(公告)日	2005-08-11
申请号	JP2004501610	申请日	2003-05-01
[标]申请(专利权)人(译)	专业西昂生物制药墨		
申请(专利权)人(译)	普施安生物制药油墨.		
[标]发明人	ジョナサンリーブス エドワードジェロームタナー ジェイシャンドラパンチャル		
发明人	ジョナサン・リーブス エドワード・ジェローム・タナー ジェイ・シャンドラ・パンチャル		
IPC分类号	G01N33/53 B01J20/281 C07K1/16 C07K1/30 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/24 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/00 C12P21/08 G01N30/02 G01N30/84 G01N30/88 G01N33/574 G01N33/577 G01N30/48		
CPC分类号	C07K16/3069 C07K14/47 C07K16/18 C07K2317/32 G01N33/57434		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K1/16 C07K1/30 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/00.C C12P21/08 G01N30/02.B G01N30/48.N G01N30/48.R G01N30/84.Z G01N30/88.J G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/577.B C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE04 4B064/CE10 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA06 4H045/GA21 4H045/GA23 4H045/GA26		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	2380662 2002-05-01 CA 2391438 2002-06-25 CA		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在血清中，PSP 94以游离形式存在或与载体蛋白结合。结合的PSP 94在前列腺癌患者的血液中定量，并且这些测量显示在预后评估时的效用。本发明（以下称为PSP94结合蛋白）载体蛋白PSP94结合，其纯化方法，并确定了它们的核酸和氨基酸序列，使用在PSP94相关疾病的诊断和预后这些序列。更具体地，本发明中，如前列腺癌和良性前列腺增生，以及用于治疗与异常或升高的PSP94水平相关条件的评估是有用的试剂，公开了一种改进的诊断和预后分析。

好ましいアミノ酸置換

元の残基	典型的な置換	保存的な置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu