

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 501025

(P2003 - 501025A)

(43)公表日 平成15年1月14日(2003.1.14)

| (51) Int. Cl <sup>7</sup> | 識別記号 | F I           | テマコード* (参考) |
|---------------------------|------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09             | ZNA  | A 6 1 K 39/00 | H 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 K 39/00             |      | 39/395        | T 4 B 0 2 4 |
| 39/395                    |      | A 6 1 P 35/00 | 4 B 0 6 4   |
| A 6 1 P 35/00             |      | 37/00         | 4 C 0 8 5   |
| 37/00                     |      | C 0 7 K 14/47 | 4 H 0 4 5   |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 77数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 500751(P2001 - 500751)

- (86) (22)出願日 平成12年5月19日(2000.5.19)
- (85)翻訳文提出日 平成13年11月27日(2001.11.27)
- (86)国際出願番号 PCT/EP00/04533
- (87)国際公開番号 W000/073438
- (87)国際公開日 平成12年12月7日(2000.12.7)
- (31)優先権主張番号 199 24 199.6
- (32)優先日 平成11年5月27日(1999.5.27)
- (33)優先権主張国 ドイツ(DE)

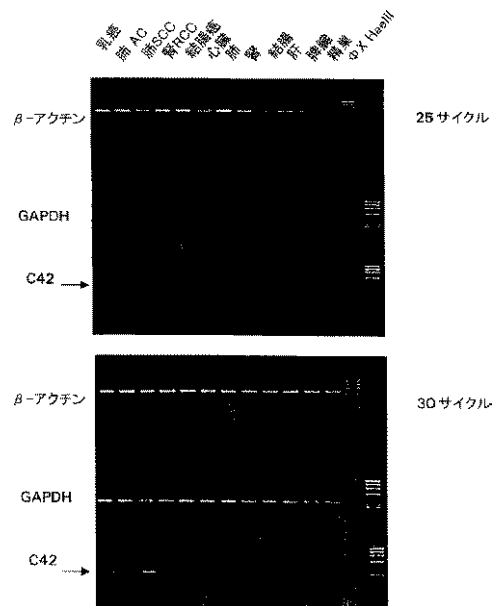
- (71)出願人 ベーリンガー インゲルハイム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング  
ドイツ連邦共和国 デー-55216 インゲルハイム アム ライン ポストファッハ 20 0
- (72)発明者 アドルフ ギュンター  
オーストリア アー1070 ウィーン シュティフトガッセ 15 - 17 - 10
- (74)代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍関連抗原 ( C 4 2 )

(57)【要約】

腫瘍関連抗原、それに由来する免疫原性ペプチド及びそれをコードしているDNA分子、並びに癌の免疫療法におけるそれらの使用である。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号：2で定義されたアミノ酸配列を含むことを特徴とするC42と称される腫瘍関連抗原。

【請求項2】 請求項1記載の腫瘍関連抗原に由来することを特徴とする免疫原性タンパク質断片又はペプチド。

【請求項3】 体液性免疫応答を惹起する、請求項1又は2記載の免疫原性(ポリ)ペプチド。

【請求項4】 MHC分子により提示されかつ細胞性免疫応答を惹起するもの又はその分解産物である請求項1又は2記載の免疫原性(ポリ)ペプチド。

【請求項5】 配列番号：40から89のペプチドの群より選択される請求項4記載の免疫原性ペプチド。

【請求項6】 (ポリ)ペプチドが、C42を発現している患者の腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導する、in vivo又はex vivoにおける癌の免疫療法のための請求項1～5のいずれか1項記載の免疫原性(ポリ)ペプチド。

【請求項7】 1種以上の腫瘍特異的突然変異を示す、腫瘍に発現された腫瘍関連抗原C42の一部に由来した免疫原性(ポリ)ペプチド。

【請求項8】 有効成分として1種以上の請求項1～7のいずれか1項記載の免疫原性(ポリ)ペプチドを含有することを特徴とする、非経口的、外用、経口的又は局所的投与のための医薬組成物。

【請求項9】 C42由来の様々な免疫原性ペプチドを含有することを特徴とする請求項8記載の医薬組成物。

【請求項10】 1種以上のC42由来のペプチドを、他の腫瘍関連抗原由来のペプチドと混合して含有することを特徴とする請求項9記載の医薬組成物。

【請求項11】 ペプチドが、少なくとも2種の異なるHLA型に結合することを特徴とする請求項8～10記載の医薬組成物。

【請求項12】 請求項1記載の腫瘍関連抗原の免疫原性を有するタンパク質又はその断片をコードしている単離されたDNA分子。

【請求項13】 配列番号：2のアミノ酸配列を有するC42と称される免疫原性ポリペプチド、又はそれに由来するタンパク質断片もしくはペプチドをコード

している請求項12記載のDNA分子。

【請求項14】 配列番号：1に示された配列を有するポリヌクレオチドであるか、もしくはこのようなポリヌクレオチドを含むか、又は、ストリンジェントな条件下で配列番号：1に示された配列を含むポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドであるか、もしくはこのようなポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項13記載のDNA分子。

【請求項15】 請求項12～14のいずれか1記載のDNA分子を含む組換えDNA分子。

【請求項16】 DNA分子により発現されたC42(ポリ)ペプチドが、C42を発現する患者の腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導する、癌の免疫療法のための請求項12～15のいずれか1記載のDNA分子。

【請求項17】 癌ワクチン調製のための請求項1記載の抗原を発現する細胞の使用。

【請求項18】 請求項1～5のいずれか1項記載の(ポリ)ペプチドに対する抗体。

【請求項19】 モノクローナル性であることを特徴とする請求項18記載の抗体。

【請求項20】 C42発現に関連した癌を治療及び診断するための請求項18又は19記載の抗体。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、腫瘍疾患の免疫療法に関する。

免疫系は、多くの様々な微生物から生体を防御しかつこれらの微生物と積極的に戦うという課題を有する。無傷の免疫系の重要性は、特に先天性又は後天性免疫不全症症例において明らかである。予防のためのワクチンプログラムの採用は、多くの症例において、ウイルス又は細菌感染症の撃退において、極めて効果がありかつ結果が良好な免疫介入であることが証明されている。更に免疫系が腫瘍細胞の排除にかなり関与していることも分かってきている。腫瘍関連抗原(TAA)の免疫系成分による認識は、重要な役割を果たしている。最も広範な意味において、免疫系のエレメントにより認識され、かつ免疫応答の刺激につながるような腫瘍細胞のあらゆる(ペプチド性又は非-ペプチド性)成分は、免疫原性の腫瘍抗原として作用し得る。免疫反応を惹起するのみではなく腫瘍の拒絶も引き起こす、このような腫瘍抗原は、特に重要である。この種の免疫反応を惹起することができる特異抗原の同定は、分子的に定義された腫瘍ワクチンの開発の主要な段階を成している。免疫系のどのエレメントが腫瘍の拒絶に寄与するかはまだ明らかではないが、それにもかかわらずCD8を発現している細胞傷害性T-リンパ球(CTL)が主要な役割を果たしている(Coulie, 1997)ことは了承されている。特に比較的高い自然寛解率を有するような腫瘍の型の場合(例えば、悪性黒色腫及び腎臓癌)、臨床的進行とCD8<sup>+</sup>-及びCD4<sup>+</sup>-T-細胞出現の増大の間に相関関係が認められた(Schendelら、1993; Mackensenら、1993; Hallidayら、1995; Kawakamiら、1995; Kawakamiら、1996; Wang、1997; Celluzzi及びFalo、1998)。特異的CTLクローンは、一般に腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)又は末梢血単核細胞(PBMC)のいずれかから、in vitroにおける自己の腫瘍細胞及びサイトカイン刺激との同時培養後に得られる。動物モデル及びin vitroで培養されたヒト細胞培養システムの両方において、腫瘍細胞に対するT-細胞の応答は、腫瘍細胞のサイトカインによるトランスフェクションにより増大した(van Elsasら、1997; Gansbacherら、1990; Tepperら、1989; Fearonら、1990; Dranoffら、1993)。

**【0002】**

寛解(remission)とCD8<sup>+</sup>-T細胞関与の間の相関関係の観点から、CD8-陽性CTLにより認識される腫瘍関連抗原(TAA)の同定は、腫瘍ワクチンの開発にとって特に重要な目的である(Pardoll、1998 ; Robbins及びKwakami、1996)。例えばCD4<sup>+</sup>-T-ヘルパー細胞のような免疫系の他の細胞種が重要な役割を果たすかどうかは未だ明らかではないが ; 悪性黒色腫患者におけるMAGE-3/HLA-A1ペプチドに関する多くの研究がこのことを示している(Marchandら、1995 ; Boonら、1998)。ここ数年間に、CTLにより認識されるTAAが数多く同定されている(Boonら、1994 ; van den Eynde及びvan der Bruggen、1997)。

#### 【0003】

T-細胞は、抗原を、MHC分子の細胞表面に存在するペプチド断片として認識する。(主要組織適合遺伝子複合体、ヒトにおいては「HLA」=「ヒト白血球抗原」)。MHC分子には2種類ある : MHC-I分子は、ほとんどの有核細胞において出現し、かつ内在性タンパク質のタンパク質分解酵素による分解により生じるペプチドを提示する(通常8~10-員)(いわゆる抗原プロセッシング)。ペプチド : MHC-I複合体は、CD8-陽性CTLにより認識される。MHC-II分子は、いわゆる「プロフェッショナル抗原提示細胞」(APC)上でのみ出現し、かつAPCによる食作用の過程において吸収されかつプロセッシングされた外来性タンパク質のペプチドを提示する。ペプチド : MHC-II複合体は、CD4-ヘルパー-T細胞により認識される。T-細胞受容体とペプチド : MHC複合体の間の相互作用により、CTLの場合標的細胞のアポトーシスへとつながる様々なエフェクター機構の引き金となり得る。これは、MHC(例えば、移植拒絶の場合)又はペプチド(例えば、細胞内病原体の場合)のいずれかが異物として認識された場合に生じる。いずれの場合においても、提示されたペプチドの全てが、T-細胞との効果的相互作用に関する構造的及び機能的要件に合致するわけではない(Rammenseeら、1995及び以下に記載)。

#### 【0004】

原則的には、腫瘍ワクチン中のTAAを使用する多くの投与方法が可能であり : この抗原は、適当なアジュバント又は担体システムと共に組換えタンパク質として投与するか、もしくはプラスミド(DNAワクチン ; Tigheら、1998)又はウイルスベクター(Restifo、1997)の中の該抗原をコードしているcDNAとして投与され得る

かのいずれかであることができる。別の可能性は、ヒト抗原を組換えにより発現しかつその追加成分の結果としてアジュバント作用を有するような組換え細菌(例えば、リステリア、サルモネラ)の使用である(Paterson、1996 ; Pardoll、1998)。これら全ての場合において、この抗原は、いわゆる「プロフェッショナル抗原提示細胞」(APC)によりプロセッシングされかつ提示される。別の可能性は、該抗原と同等のT-細胞エピトープに相当し、かつ外部からAPCへ負荷されるか(Buschleら、1997 ; Schmidtら、1997)、もしくはAPCにより吸収されるかのいずれかであり、かつMHC I分子へ細胞内で転移されるような合成ペプチドの使用(Meliefら、1996)である。特定化された抗原の投与の最も治療効果のある方法は、一般に臨床試験により決定される。

#### 【0005】

腫瘍特異性CTLにより認識されるそれらの抗原又はエピトープは、いずれかのタンパク質クラス(例えば、転写因子、受容体、酵素 ; 概観については、Rammenseeら、1995 ; Robbins及びKawakami、1996を参照のこと)に由来することができる分子を含む。これらのタンパク質は、抗体による認識に必要なように、細胞表面に必ずしも局在化されなければならないものではない。CTLによる認識のための腫瘍特異抗原として作用するため、もしくは治療に使用するためには、これらのタンパク質は、特定の条件に合致しなければならない : 第一に、該抗原は、専ら腫瘍細胞により発現されるか、もしくは、単に腫瘍よりも濃度が低いようないわゆる「発症臨界(critical)」正常組織に発生しなければならない。発症臨界正常組織は、必須の組織であり ; それらに対する免疫反応は重篤であり、一部の症例においては致命的結果を招く。第二に、該抗原は、原発性腫瘍のみではなく、転移部においても存在しなければならない。更に、該抗原の広範な臨床用途の観点から、いくつかの種類腫瘍において、これが高濃度で存在することが望ましい。ワクチンの有効成分としてのTAAの適性に関するひとつの更なる前提条件は、抗原のアミノ酸配列にT-細胞エピトープが存在することであり ; TAA由来のペプチドは、in vitro/in vivoでのT-細胞応答に繋がらなければならない(「免疫原性」ペプチド)。臨床的に広範に適用可能な免疫原性ペプチド選択の別の基準は、所定の患者集団において該抗原に遭遇する頻度である。

## 【0006】

既にT-細胞エピトープを有することが多く示されている免疫原性腫瘍関連抗原(TAA)は多くの範疇に分けることができ、これはウイルスタンパク質、変異タンパク質、過剰発現されたタンパク質、染色体転座により作出された融合タンパク質、分化抗原、胎児性癌抗原を含む(Van den Eynde及びBrichard、1995 ; van den Eynde及びvan der Bruggen、1997)。

## 【0007】

腫瘍ワクチン開発の出発点を形作っているTAAを同定しかつ特徴決定する方法は、患者(細胞性免疫応答)又は抗体(体液性免疫応答)において既に誘導されているCTLの使用を一方で基にするか、もしくは腫瘍組織と正常組織の間のディファレンシャル転写プロファイルの作成を基にしている。免疫学的方法である前者の場合、患者CTLは、MHC-I分子を介しCTL-エピトープを提示する真核細胞の腫瘍-cDNA発現ライブラリーのスクリーニングに使用される(Boonら、1994)のに対し、高親和性患者抗血清原核細胞cDNA発現ライブラリーを用いると、TAAの存在を、個々のプラーク(plaque)の免疫プロット分析により直接調べることができる(Sahinら、1995)。CTL反応性とタンパク質-化学的プロセシングの組合せは、患者CTLとの反応性により予め選択されている腫瘍細胞由来のMHC-Iから単離されたペプチドの単離を生じる。これらのペプチドは、MHC-I複合体が洗浄除去され、かつ質量分析法により同定される(Falkら、1991 ; Woelfelら、1994 ; Coxら、1994)。抗原を特徴付けるためにCTLを使用する方法は、CTLの培養及び活性化が必要なために、相当な経費を要し、かつ常に成功を収めるとは限らない。

## 【0008】

正常及び腫瘍組織の転写プロファイルを比較することを基にしたTAAの同定法は、多種多様であり ; これらは、ディファレンシャルハイブリダイゼーション、サブトラクションcDNAバンクの確立(「RDA法 : representational difference analysis」 ; Hubank及びSchatz、1994 ; Diatchenkoら、1996)、及びDNAチップ法又はSAGE法の使用(Velculescuら、1995)を含む。前述の患者CTLを使用する免疫学的方法とは対照的に、分子生物学的方法を使用する場合、この方法で発見された可能性のある抗原候補が、腫瘍-特異性(腫瘍-関連)でありかつ実際に細胞傷害性

T-細胞反応を誘導することが可能であるT-細胞エピトープを有することを示す必要がある。少なくとも一つの場合(NY-ESO/LAGE-1)、抗原は、患者血清の使用及びRDA法(Chenら、1997 ; Letheら、1998)の両方により同定され、かつ更にはこの抗原のCTL-エピトープ及び同時の自然発生的体液性応答及びT-細胞応答が、患者1名において説明されている(Jagerら、1998)。

#### 【0009】

本発明の目的は、新規腫瘍関連抗原(TAA)を提供することである。

この目的は、最初に様々な肺の平板上皮腫瘍(plate epithelial carcinoma)のプールと11種の異なる正常組織のプールの間でのRDA法によりcDNAサブトラクションライブラリーを確立することにより実現された。サブストラクションハイブリダイゼーションに必要な「テスト」及び「ドライバー(driver)」のcDNA断片を作出するために、原法(Diatchenkoら、1996)から外れる、6種の異なる制限酵素の混合物が使用された。認識配列として6塩基対を必要とするような様々な制限酵素の混合物の使用は、原法(Diatchenkoら、1996)に勝る下記の利点がある：  
a)2種の制限酵素で6種の塩基の組合せA/T(例えば、Ssp I : AATATT)又はC/G(例えば、Nae I : GCCGGC)又はA/C/G/T(例えば、EcoR V : GATATC)の組合せで示されるような認識配列を選択することにより、遺伝子のGC-及びAT-豊富な両領域を同じ方法で切断し、その結果制限断片としての全遺伝子領域の均一な提示を可能にする；b)加えてこれは、統計学的平均(約800bp)で、候補遺伝子の比較的大きいcDNA断片を得ることを可能にし、このことは次に「完全長」cDNAの引き続きの分析(配列決定及び注解(annotation))及びクローニングにおいて大きい利点となる。原法(Diatchenkoら、1996)においては、わずかに4塩基のみを認識する制限酵素(Rsa I)が使用され、これは平均断片長256bpをもたらし、かつCG-又はAT-豊富領域を特異的プロセッシングすることはできない。より長いcDNA導入断片により変更されるハイブリダイゼーション速度論の正当化のために、PCR法が、実施例1に説明されたように改変される。

#### 【0010】

腫瘍において過剰発現した抗原を選択するために、得られたcDNAクローンを最初に分離しかつ塩基性グリセロール培養し、プラスミド調製及びPCR断片の挿入-

提示コレクション(insert-representing collection)を、そこから96-ウェル皿方式で確立した。特異的腫瘍抗原又は腫瘍/精巢型の抗原を選択するために、肺のサブラクティブ平板上皮腫瘍cDNAライブラリーのクローン4748種のcDNA断片を、3つ組でフィルター上に置き、かつ精巢-特異性cDNAライブラリー、15種の正常組織由来のcDNA又は腫瘍患者(肺の平板上皮腫瘍)のプールした試料由来のcDNAの混合物でハイブリダイズした。精巢-特異性又は腫瘍特異性ハイブリダイゼーションプローブの一方とのみ又はその両方とシグナルを形成するが、正常組織ハイブリダイゼーションプローブとはシグナルを形成しないような234種のクローンを選び、更に分析した。配列決定及びデータバンクから入手できる配列との注解の後、データバンクにいくつかのESTエントリー(発現配列タグ)があるような36種の未知の遺伝子を手に入れた。これらの遺伝子の中で、そのESTが発症臨界正常組織に由来しないような10種を更に研究した。ひとつのクローン(C42)が、腫瘍及び精巢において明らかな過剰発現を示したが、その他の調べた正常組織においては示さなかったことが、半-定量的RT-PCRにより確認された。それに続く様々な正常組織及び腫瘍組織のノーザンプロット分析から、C42が、調べた正常組織においては転写を示さなかった - 食道の弱いバンドを例外として - が、肺及び食道の平板上皮腫瘍においては強力なシグナルが検出されたことが確認された。更にノーザンプロット実験により得られたデータは、C42転写物が長さ約4.4kbであるという結論を導いた。

#### 【0011】

ヒトC42 cDNAを、クローニングし；得られた配列を、配列番号：1に示した。C42の配列は、ヌクレオチド及びタンパク質の両レベルで、様々な種において発現される(一部の場合は高度に組織特異的に)  $\text{Ca}^{2+}$ -依存性 $\text{Cl}^-$ チャネルタンパク質遺伝子ファミリーと、明らかな相同性を示している。現在までに、このファミリーの代表的5種が既にクローニングされかつ一部特徴決定されている：2種のウシ遺伝子bCLCA1(ウシ $\text{Ca}^{2+}$ -依存性 $\text{Cl}^-$ チャネル-1；Cunninghamら、1995)及びLu-ECAM-1(ウシ肺-上皮細胞接着分子-1；Elbleら、1997)、マウス遺伝子mCLCA1(マウス $\text{Ca}^{2+}$ -依存性 $\text{Cl}^-$ チャネル-1；Gandhiら、1998)及び2種のヒト遺伝子hCLCA1(ヒト $\text{Ca}^{2+}$ -依存性 $\text{Cl}^-$ チャネル-1；Gruberら、1998)及びhCLCA3(ヒト $\text{Ca}^{2+}$ -依存性 $\text{Cl}^-$

「チャンネル-3 ; Gruberら、1999)である。このタンパク質ファミリーのメンバーは全て、典型的膜貫通領域を有し、かつ現時点の知識によると、翻訳後切断され、ヘテロ二量体を形成し、そのC-末端はグリコシル化されている(Elbleら、1997)が、但し、より短い形であるhCLCA3は除く(Gruberら、1999)。bCLCA1遺伝子は、ウシ(cattle)の気管上皮細胞においてのみ検出される。同じくウシから単離される、密接に関連したLu-ECAM-1は、肺静脈の血管上皮細胞において組織-特異的な形で発現される。Zhuら(1992)は、Lu-ECAM-1が、マウス悪性黒色腫のB16F10肺転移部を上皮細胞に結合させることを示した。C42は、このタンパク質ファミリーの新たなヒトに関係するメンバーである。

#### 【0012】

本発明の範囲において得られたcDNAは、C42のC-末端部分を表している943個のアミノ酸をコードしている連続するオープンリーディングフレームを有する。このC-42配列は、このタンパク質ファミリーの典型である5個の疎水性膜貫通領域を有する(位置は、配列番号：2の222-252、416-445、553-574、746-766及び900-926)が、他のメンバーとは異なり、強力に帯電されたアミノ酸で形成されるC末端を有する。

#### 【0013】

本発明の範囲内であるクローニングされたC42-cDNAは、4077bpを有する一方で、この配列の3'末端のポリA尾部の存在は、この領域のcDNAの完全性の指標である。

本発明の範囲の単離されたcDNAは、配列番号：1で示されたヌクレオチド配列を有し、C42と称される腫瘍関連抗原(TAA)をコードしている。

5'-末端に向かう連続するオープンリーディングフレームを持つ単離されたcDNAにより発現されたタンパク質は、配列番号：2に示したアミノ酸配列を有する。

従って、第一の態様に従い、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を含む、C42と称される腫瘍関連抗原に関する。

#### 【0014】

配列番号：2に示されたアミノ酸配列は、サイズ約4.4kbの転写物により翻訳されるか、又はこの遺伝子相同体の転写物からの4.4kb転写物のスプライシング変

種に由来している、サイズ約3.5kbの転写物により翻訳されるタンパク質を表している。

配列番号：2に示されたアミノ酸配列は、いくつかの差異を有し、これは例えばC42誘導体が腫瘍ワクチンにおける使用にとって望ましい免疫原性を有する場合に、アミノ酸の交換により生じたものである。

#### 【0015】

C42の天然のアミノ酸配列は、任意に、C42ペプチドのMHC-I分子への親和性を天然のC42 CTL-エピトープと比べて増大するために、C42 CTL-エピトープの個々のアミノ酸の置換により修飾することができ、かつその結果、腫瘍に対する増大された免疫原性及び最終的により大きい反応性を引き起こす。C42エピトープ領域の修飾は、全C42タンパク質において(これはAPCによりプロセッシングされ、対応するペプチドを形成する)又は比較的大きいC42タンパク質断片もしくはC42ペプチドにおいて(下記で比較)行うことができる。

#### 【0016】

別の態様において、本発明は、C42に由来した免疫原性の断片及びペプチドに関する。以後後者をC42ペプチドと称する。最初のグループは、体液性免疫応答を惹起するC42ペプチドである(抗体の誘導)。このようなペプチドは、例えば表面可能性プロット(surface probability blot)(Eminiら、1985)、疎水性プロット(Kyte及びDoolittle、1982)並びに抗原性インデックス(antigen index)(Jameson及びWolf、1988)のような、いわゆる予測アルゴリズムで決定することができるような、C42の選択された一部(少なくとも12~15個のアミノ酸)である。更に、腫瘍組織と正常組織の間の免疫学的識別に寄与する全てのペプチドが含まれる。

#### 【0017】

腫瘍関連抗原が、腫瘍-特異性突然変異を有し得ることは公知であり、これは腫瘍組織と正常組織の間の免疫学的識別に寄与している(Mandrizzatoら、1997、Hoganら、1998、Gaudiら、1999、Wolfelら、1995)。腫瘍-特異性C42突然変異の存在を決定するために、C42 cDNAを、1種以上の様々な腫瘍から、好ましくは本発明の単離されたC42 cDNAのプロープによりクローニングし、かつ得られた配列

を、正常組織のC42 cDNAと比較する。正常組織と比べて変異された配列セクション由来の腫瘍C42ペプチドは、正常組織由来の対応する配列セクションからのC42ペプチドと比べ、増大した免疫原性を有するであろうということが予想される。

【0018】

従って本発明は更なる態様において、腫瘍-特異性突然変異を有する、腫瘍で発現されたC42由来のC42ペプチドに関する。

突然変異のいずれかが腫瘍特異性であることを確認するために、これらの領域に対する抗体を作出し、かつ腫瘍細胞を可能性のある変異の発現について調べることができる。

C42ペプチドは、直接又は修飾された形状(例えば、KLH =キーホールリムペットヘモシアニンと組合せて)で投与され、かつこの抗体の形成は例えばELISAのような通常の免疫学的アッセイにより決定される。

【0019】

本発明の範囲内であることが好ましいその他のC42ペプチドは、MHC-分子により提示され、かつ細胞性免疫応答を生じるようなものである。2種類のMHC-分子があり、すなわちCD8-陽性CTLにより認識されるMHC-I分子及びCD4-陽性T-ヘルパー細胞により認識されるMHC-II分子である。

ペプチドが細胞性免疫応答を引き起こすためには、これはMHC-分子に結合しなければならない一方で、治療される患者は自身のレパトアにMHC分子を有さなければならない。従って患者のMHC-サブタイプを決定することは、細胞性免疫応答を惹起するという観点から、この患者におけるペプチドの有効使用に関する必須の前提条件である。

治療で使用されるC42ペプチドの配列は、アンカーアミノ酸及び長さに関し、問題のMHC-分子により決定される。規定されたアンカーの位置及び長さは、ペプチドが、問題の患者のMHC-分子のペプチド結合溝(peptide binding groove)に合致することを保証するものである。その結果、腫瘍抗原由来のペプチドが使用されるならば、免疫系が刺激され、かつ患者の腫瘍細胞に対して示される細胞性免疫反応が生じる。

【0020】

免疫原性C42ペプチドは、公知の方法で同定することができ；基本的条件のひとつは、MHC-結合及びCTL-誘導の間の相関である。

従って、免疫原性ペプチドの配列は、そのペプチド結合モチーフを基に予測することができるので、CTL-エピトープを構成するC42ペプチドは、C42タンパク質配列を基に同定及び合成することができる。これを行うために、公知のタンパク質抗原のCTL-エピトープを同定するために使用される様々な方法を利用することができ；例えば、ヒトパピローマウイルスにおけるT-細胞エピトープを同定するために、Staussら(1992)により説明された方法がある。

#### 【0021】

MHC-分子に結合しかつこれにより提示されるペプチドに関する各々のMHC-I対立遺伝子産物の対立遺伝子-特異的要件は、モチーフとして集成されている(例えば、Falkら、1991)。現時点まで、多数のMHC-ペプチドモチーフ及びMHC-リガンドの両方が分かっている。特異的MHC-I分子に合致する公知のタンパク質のエピトープを調べるための本発明の範囲内の適当な方法は、Rammenseeら(1995)の研究に説明されている。これは下記の工程を含む：最初に、タンパク質配列が、アンカーモチーフに相当する断片について調べられる一方で、ペプチド長さ及びアンカー占領に関する特定の変異が可能である。例えばモチーフがその末端にIle又はLeuを伴う9-員(mer)を指定するならば、対応するC-末端を伴う10-員は、C-末端にVal又はMetのような別の脂肪族基を伴うペプチドであるものとしてみなすこともできる。この方法で多くのペプチド候補を得ることができる。これらを公知のリガンドと共通のできる限り多くのアンカー基の存在について検索し、及び/又はこれらが様々なMHC-分子に「好ましい」基を有することができるかどうかを調べることができる(Rammenseeら、1995の表に従う)。弱く結合したペプチドを排除するために、結合アッセイが実施されることが好ましい。特異的MHC-分子についてのペプチド結合の要件がわかっているならば、ペプチド候補を、結合に対して陰性又は陽性の作用を有する、もしくは実際には全くその可能性のないような非-アンカー基についても検索することもできる(Ruppertら、1993)。しかしこの方法において、天然リガンドを検索する場合には、ペプチド結合モチーフは、単独の決定因子ではないことに注意しておかなければならない；MHC-結合の特

異性に加え、他の態様、例えば抗原プロセッシング時の酵素特異性も、このリガンドの同定に寄与する。これらの態様を考慮しかつ本発明の範囲内において免疫原性C42ペプチドの同定に適しているようなひとつの方法は、特に公知のHLA-A\*0201モチーフを基にしたgp100エピトープを同定するためのKawakamiら(1995)の方法を使用した。

#### 【0022】

これらのペプチドは、それらのMHC-II分子への結合能について選択することもできる。

9個のアミノ酸にわたって広がるMHC-II結合モチーフは、MHC-I結合モチーフよりもアンカー位置により高度の縮重を有する。最近、MHC-II分子のX-線構造解析を基にした方法が開発され、これは、MHC-II結合モチーフの正確な分析及びそれを基にしたペプチド配列の変更を分析することが可能である(Rammenseeら、1995、及びこの文献に引用されたオリジナル文献)。MHC-II分子に結合するペプチドは、典型的には、樹状細胞、マクロファージ又はB-細胞によりCD4-T細胞に提示される。次にCD4-T-細胞は、例えばサイトカインの放出により、配列中のCTLを直接活性化し、かつAPC(樹状細胞、マクロファージ及びB-細胞)による抗原提示効率を増加する。

#### 【0023】

最近、特異的MHC分子に結合するペプチドエピトープのより信頼できる予測を可能にするデータベース及び予測アルゴリズムが利用できるようになってきた。

本発明の範囲において、Parkerら(1994)及びRammenseeら(1995)が説明したアルゴリズムを用いて、対応するHLA分子に結合しその結果免疫原性CTL-エピトープに寄与すると考えられる、C42の候補ペプチドが、最も重要なHLA-型、特にHLA-A1、-A\*0201、-A3、-B7、-B14及び-B\*4403について同定されている；発見されたペプチドを表1に列記している。同様に、恐らくペプチドの様々な特徴(疎水性、電荷、サイズ)又はHLA-分子の3D構造のようなペプチドによる要件を考慮する他のアルゴリズムの使用は、潜在的ペプチドエピトープを見つけることを可能にし；これは更に、他のHLA型のペプチドエピトープにも適用される。

#### 【0024】

前述の方法を使用しC42-ペプチド候補を選択した後、それらのMHC-結合が、ペプチド結合アッセイにより試験される。第一に、良好な結合特性を伴うペプチドの免疫原性が決定される(ペプチド-MHC相互作用の安定性は、殆どの場合免疫原性と相関している; van der Burgら、1996)。選択されたペプチド又はペプチド等価物の免疫原性を決定するために、例えばSetteら(1994)に記された方法を、定量的MHC-結合アッセイと併用することができる。あるいは、選択されたペプチドの免疫原性は、公知の方法を用いるin vitro CTL-誘導(以後、ex vivo CTL-誘導と記す)により試験することができる。細胞性免疫応答を惹起することが可能であるペプチドの選択のための方法の原理が、いくつかの工程により実行され、これは、その内容が本願明細書に参照として組入れられている国際公開公報第97/30721号に開示されている。同じく本発明の範囲内で適した有効な免疫原性ペプチドを得る一般戦略は、Schweighoffer(1997)により説明されている。

#### 【0025】

MHC-I又はMHC-II分子の結合溝に合致する当初のペプチド、すなわち、未変更のC42に由来したペプチドを使用する代わりに、当初のペプチド配列を基に特定化されたアンカーの位置及び長さに関する最小要件を固守しながら、変種を行うことができるが、但しこれらの変種は、MHC-分子へのその結合親和性及びそのT-細胞受容体刺激能に起因したペプチドの効果的免疫原性を損なわないのみならず、好ましくは、それを増強しさえもする。この場合、MHC-分子への結合能に関する必要要件に相当するようにデザインされた人工ペプチド又はペプチド等価物が使用される。

#### 【0026】

この方法で修飾されたペプチドは、以後「不規則変化(heteroclitic)ペプチド」と称する。これらは下記の方法により得ることができる：

まず最初に、MHC-I又はMHC-IIリガンドもしくはそれらの変種のエピトープが、例えば、Rammenseeら(1995)の論文に説明された原理を用いて採取される。このペプチドの長さは、該ペプチドがMHC-I分子に対応しているならば、必要なアンカーアミノ酸を伴う8~10個のアミノ酸の最小配列に相当していることが好ましい。

## 【0027】

望ましいならば、該ペプチドはC-及び/又はN-末端で延長することもできるが、但しこの延長がMHC-分子に結合する能力に影響せずかつ延長されたペプチドが最小配列へと細胞上においてプロセッシングされ得るという条件下である。

その後修飾されたペプチドが、TIL(腫瘍浸潤性リンパ球)によるそれらの認識、CTL-誘導、並びに増大したMHC-結合性及び免疫原性について、Parkhurstら(1996)及びBeckerら(1997)の論文に記されたように調べられる。

## 【0028】

本発明の目的に適している、天然のC42ペプチドの免疫原性よりも大きい免疫原性を有するペプチドを見つける別の方法は、Blakeら(1996)の論文に記されたような、腫瘍上に天然に生じるC42ペプチドを認識するCTLによるペプチドライブラリーのスクリーニングからなり；これに関連して、MHC-I-制限された(restricted)CTLにより認識される腫瘍エピトープを模倣した分子をデザインするための、コンビナトリアルペプチドライブラリーの使用が提唱されている。

## 【0029】

本発明のC42ポリペプチド又はそれに由来した免疫原性断片もしくはペプチドを、その内容が本明細書に参照として組入れられている、国際公開公報第96/10413号に開示されたように、組換え又はペプチド合成により作出することができる。組換えによる作出について、対応するDNA分子は、標準の技法により発現ベクターに挿入され、適当な宿主細胞にトランスフェクションされ、該宿主は適当な発現条件下で培養され、かつタンパク質が精製される。例えば市販されている自動ペプチド合成装置のような従来の方法を、C42ペプチドの化学合成のために使用することができる。

## 【0030】

天然のC42ペプチド又は不規則変化ペプチドの代わりに、このようなペプチドを模倣している物質、例えば「ペプチド擬態」又は「レトロインバースペプチド(retro inverse peptide)」を使用することも可能である。これらの分子を腫瘍ワクチンにおけるそれらの治療的用途に関して試験するために、前述のものと同じ方法を、天然のC42ペプチド又はC42ペプチド等価物について使用することがで

きる。

【0031】

本発明のTAAと指定されたC42及びタンパク質断片、ペプチド又はペプチド等価物もしくはそれに由来したペプチド擬態は、例えば、対応する抗原決定基を発現する腫瘍細胞への免疫応答を惹起するために、癌治療において使用することができる。好ましくはこれらは、C42-陽性腫瘍、特に肺、乳房及び食道の癌の治療に使用される。

【0032】

CTL誘導の形の免疫応答は、in vivo又はex vivoにおいて実現することができる。

CTLをin vivo誘導するために、有効成分としてTAA C42又は断片もしくはペプチド又はそれに由来するペプチドを含有する医薬組成物が、TAAに関連した腫瘍疾患に罹患した患者に投与されるが、同時にTAA (ペプチド)の量は、抗原を生じる腫瘍に効果的に反応するCTLを得るのに十分でなければならない。

【0033】

従って別の態様において、本発明は、非経口的、外用、経口的又は局所的投与のための医薬組成物に関する。好ましくは、この組成物は非経口的に、例えば皮下、皮内又は筋肉内に適用される。C42-TAA/ペプチドは、医薬として許容できる担体、好ましくは水性担体中に溶解又は懸濁される。この組成物は、更に緩衝液のような従来の佐剤を含有することもできる。C42-TAA/ペプチドは、それ自身で、又はフロイント不完全アジュバント、サポニン、アルミニウム塩、又は好ましい実施態様においては、ポリアルギニンもしくはポリリシンのようなポリカチオンなどの、アジュバントと複合して使用することができる。これらのペプチドは、CTL誘導又はCTL活性化を補助するような成分、例えばT-ヘルパーペプチド、脂質又はリポソームなどに結合することも、もしくはペプチドを、これらの物質及び/又はサイトカイン(IL-2、IFN- )などの免疫刺激性物質と同時投与することもできる。本発明の医薬組成物の調製及び投与に適した方法及び製剤は、国際公開公報第95/04542号及び国際公開公報第97/30721号に開示されており、これらの内容は本願明細書に参照として組入れられている。

## 【0034】

C42断片又はC42ペプチドは、ex vivoにおけるCTL反応の引き金としても使用することができる。C42を発現する腫瘍に対するex vivoにおけるCTLの反応は、CTL-前駆細胞を、APC及びC42ペプチド又はC42タンパク質と一緒にインキュベーションすることにより誘導される。その後活性化されたCTLは、患者にこれらが再投与された場合は常に、増殖することが可能である。あるいは、APCは、C42ペプチドを負荷されることができ、これは、C42陽性腫瘍に対する細胞性免疫反応の効果的な活性化につながる(Mayordomoら、1995 ; Zitvogelら、1996)。ペプチドを細胞、例えば樹状細胞に負荷するひとつの適法は、国際公開公報第97/19169号に開示されている。

## 【0035】

ある本発明の実施態様において、いくつかの異なるC42ペプチド又はC42ペプチド等価物の組合せが使用される。別の実施態様において、C42ペプチドは、他のTAAに由来するペプチドと組合せられる。このような組合せのためのペプチドの選択は、最も広範な可能性のある患者集団を対象とするために様々なMHC-型の検出の観点から行われ、及び/又はこれは、いくつかの異なる腫瘍抗原由来のペプチドを組合せることにより、最も広範な可能性のある適応症スペクトルを目指している。医薬組成物中のペプチドの数は、広範に変動することができるが、典型的には臨床的に有用なワクチンは、1~15種、好ましくは3~10種の異なるペプチドを含有する。

## 【0036】

本発明のペプチドは、更に診断薬として使用することもできる。例えば、これらのペプチドは、免疫原性ペプチドにより惹起された体液性又は細胞性の免疫応答に対する患者の反応を試験するために使用することができる。これは、治療法改善の可能性を提供する。例えば、TAAの投与形態に応じて(ペプチド、総タンパク質又はDNAワクチン)、定義されたペプチドエピトープに対する反応性を示すPBLL中のT-細胞前駆体の増加を調べることができる(Robbins及びKawakami、1996及びその中に引用された文献)。更に、TAAに対して示されたペプチド又は総タンパク質又は抗体は、C42-関連腫瘍を患う患者リスクを予測しかつC42-陽性腫瘍の進

行を特徴付けるために使用することができる(例えば、原発性腫瘍及び転移部の免疫組織化学的分析)。この種の戦略は、既に多くの症例において成功することが証明されており、例えば乳癌における内分泌療法の決定の基となるエストロゲン受容体の検出；乳癌の予後及び治療経過における関連マーカーとしてのc-erbB-2(Ravaioliら、1998；Revillionら、1998)；血清中の前立腺癌の上皮細胞マーカーとしての、及び前立腺癌の免疫シンチグラフィにおけるPSMAに対する<sup>111</sup>In-標識したモノクローナル抗体を使用することによるマーカーとしての、PSMA(前立腺特異性膜抗原)(Murphyら、1998、及びその中に引用された文献)；直腸結腸癌に罹患した患者の予後及び進行の血清学的マーカーとしてのCEA(癌胎児性抗原)(Jessup及びLoda、1998)がある。

#### 【0037】

別の態様において、本発明は、C42又はその断片の免疫原性を伴うタンパク質をコードしている単離されたDNA分子に関する。

別の態様において、本発明は、配列番号：1に示された配列を有するポリヌクレオチドを含む、もしくはストリンジェントな条件下で、配列番号：1に示された配列のポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、単離されたDNA分子に関する。

#### 【0038】

本願明細書において使用される「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、50%ホルムアミド、5x SSC (1x SSC = 150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5x Denhardt溶液、10%硫酸デキストラン、及び20 µg/ml変性し切断したサケ精液DNAを含有する溶液中での、42℃、一晩のインキュベーション、それに続く、0.1 x SSC中での約65℃でのフィルター洗浄、又はこれと同等の条件を意味する。

#### 【0039】

本発明のDNA分子又はそれらの断片は、配列番号：2に示されたアミノ酸配列を有するC42と称される(ポリ)ペプチドもしくはそれに由来するタンパク質断片又はペプチドをコードしている；これは、遺伝暗号の縮重の結果として配列番号：1に示された配列からの誘導体を示すDNA分子を含む。

本発明は、これらが、腫瘍ワクチンとしてのそれらの使用にとって望ましい免疫原性を伴うC42誘導体又は断片又はペプチドをコードしているならば、突然変異による配列番号：2に示されたタンパク質配列中のアミノ酸の交換につながるようなDNA分子にも関する。

本発明のC42 DNA分子又は同じく本発明の対象である対応するRNAは、それらでコードされた(ポリ)ペプチド同様に、癌疾患の免疫療法に使用することができる。

#### 【0040】

本発明のある実施態様において、天然のC42ポリペプチドをコードするDNA分子が使用される。天然のC42 cDNA又はそれらの断片の代わりに、修飾された誘導体の使用が可能である。これらは、より大きい免疫原性を伴うタンパク質(断片)又はペプチドをコードしている修飾を有する配列を含む一方で、前述のペプチドに適用されるものと同じ考察を、DNAレベルでの修飾に適用することができる。別の種類の修飾は、ビーズ紐のように免疫学的に関連のあるペプチドをコードしている多くの配列を一行に並べることである(Toesら、1997)。この配列は同じく、補助的要素、例えば免疫原のより効果的な放出及びプロセッシングを確実にする機能の追加により修飾される(Wuら、1995)。例えば、小胞体中の局在化配列( locating sequence) (「ER標的化配列」)を追加することにより、この抗原のプロセッシング及びその結果としての抗原提示及び最終的には免疫原性を増加することができる。

#### 【0041】

別の態様において、本発明は、C42-DNAを含む組換えDNA分子に関する。

本発明のC42 DNA分子は、好ましくはプラスミドとしての組換え形で直接、又は、組換えウイルス又は細菌の一部として、投与することができる。理論的には、in vivo及びex vivoの両方におけるC42-DNAに対するDNAを基にした癌の免疫療法(「DNAワクチン」)に関する遺伝子治療のあらゆる方法を用いることができる。

#### 【0042】

In vivo投与の例は、筋肉内経路又は遺伝子銃の使用のいずれかによる、「裸

の「DNAの直接注射であり、これは腫瘍抗原に対するCTLの形成につながることを示されている。組換え生物の例は、ワクシニアウイルス、アデノウイルス又はリステリア・モノサイトゲネスである(概要はCoulie、1997が提供)。更にカチオン性脂質、ミクロスフェア、マイクロペレット又はリポソームのような核酸のための合成担体を、C42ペプチドをコードしている核酸分子のin vivo投与のために使用することができる。ペプチドのように、免疫応答を増強する様々なアジュバント、例えばサイトカイン類も、これらをコードしているタンパク質又はプラスミドのいずれかの形状で、投与することができる。この適用は任意に、物理的方法、例えば電気穿孔と組合せることができる。

#### 【0043】

Ex vivo投与の例は、Tuting(1997)の論文に記されたような樹状細胞のトランスフェクション、又は細胞性癌ワクチンとして使用されるような他のAPCのトランスフェクションである。従って、別の態様において、本発明は、それ自身、又は任意に修飾された形で、対応するコード配列のトランスフェクション後に、C42を発現する細胞を使用し、癌ワクチンを作成することに関する。

#### 【0044】

別の態様において、本発明は、C42又はそれらの断片に対する抗体に関する。通常ポリクローナル抗体が、動物、特にウサギの免疫処置、抗原又はその断片の注射、及びそれに続く免疫グロブリンの精製により得られる。

モノクローナル抗-C42-抗体は、Kohler及びMilstein(1975)が説明した原理に従う標準の操作、動物、特にマウスの免疫処置、その後の免疫処置した動物からの抗体産生細胞の、例えば骨髄腫細胞との融合による、不死化、及びモノクローナル抗-C42抗体についての免疫学的標準アッセイによる得られたハイブリドーマ上清のスクリーニングにより得られる。ヒトにおける治療又は診断のための用途は、これらの動物の抗体を、常法により任意にキメラ化するか(Neubergerら、1984、Boulianneら、1984)、又はヒト化する(Riechmannら、1988、Grazianoら、1995)。

#### 【0045】

ヒトモノクローナル抗-C42-抗体(又はそれらの断片)は、いわゆるタンパク質

展示ファージライブラリーから(Winterら、1994、Griffithsら、1994、Kruifら、1995、Mc Guinnessら、1996)、及びトランスジェニック動物を用いて(Bruggemannら、1996、Jakobovitsら、1995)得ることもできる。

本発明の抗-C42-抗体は、診断目的の免疫組織化学的分析においても使用することができる。

#### 【0046】

別の態様において、本発明は、C42を発現する腫瘍に対する又は腫瘍への、いずれか所望の物質の選択的作出のための、C42-特異抗体の使用に関連している。このような物質の例は、その活性が腫瘍にin situで損傷を与えるような、細胞傷害性物質又は放射性核種である。C42の腫瘍特異的発現のために、副作用は予想されないかもしくは極わずかである。別の態様において、C42を発現する腫瘍を明らかにする物質を、C42抗体の助けを借りて、使用することができる。これは、診断及び治療の評価において有用である。抗-C42抗体に適用される抗体の治療的及び診断的用途は、国際公開公報第95/33771号に開示されている。

#### 【0047】

本発明でTAAと示されたC42、及びそれに由来したタンパク質断片、ペプチドもしくはペプチド等価物又はペプチド擬態を、例えば、対応する抗原決定基を発現している腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するためなどの、癌治療に使用することができる。これらは好ましくは、C42-陽性腫瘍、特に肺、乳房及び食道の癌の治療のために使用される。

#### 【0048】

##### 実施例1:

##### 様々な肺平板上皮腫瘍プールの11種の正常組織プールと比較したRDA法

SCC型(鱗状細胞腫瘍(Squamous Cell Carcinoma)、平板上皮腫瘍)の様々なヒト肺癌の生検標本を、外科的に採取した後直ちに、液体窒素でフラッシュ凍結し、 $-80^{\circ}$ で貯蔵した。RNAを単離するために、一連の $20\mu\text{m}$ 切片を、 $-20^{\circ}$ のクリオミクロトーム(Jung CM1800、Leica社)で調製し、かつ4Mグアニジンチオシアネート/1%  $\beta$ -メルカプトエタノール中に直接溶解し、RNAを単離した。これらの試料を、CsCl勾配上で超遠心した(Sambrook、1989)。

## 【0049】

数種類の代表的組織断片(5 m)を、組織学的検査のために、スライド上に固定し、かつHarrisヘマトキシリン(Sigma社)及びエオシンにより染色した。これを利用し、RNAを得るための出発材料として可能な限り最も均質な腫瘍組織を提供した。SCCと分類された試料のみを更にプロセッシングした。

## 【0050】

5種の異なる肺の平板上皮腫瘍に由来する全RNA 110 µgから、PolyAtract Kit (Promega社)を製造業者の指示に従い用いて、ポリ-A(+)RNAを単離した(SCCプール)。このSCCプール並びに11種の正常組織 - 骨髄、心臓、腎、肝、肺、膵、骨格筋、脾臓、胸腺、小腸及び胃 - 由来のポリ-A(-4-) RNA(Clontech社)の2.5 µgのプールから出発し、PCR-select(登録商標)キット(Clontech社、パロアルト)を製造業者の指示に従い用い、RDA法を行い(Diatchenkoら ; Hubank及びSchatz) : SCCプール由来のRNA(テスター)及び正常組織由来のRNA(ドライバー)を製造業者の指示に従い用いた。当初の方法と異なり、オリゴ-dTを使用し二本鎖cDNAを合成した後、このcDNAを6種の制限酵素で切断した : ECoRV、NaeI、NruI、ScaI(Promega社)、SspI、StuI(TaKaRa社)を用い、Promega社の緩衝液A中で37 °Cで2時間で切断し、かつNaCl濃度を150mMまで上昇した後、更に2時間37 °Cで切断した。この6種の異なる制限酵素の混合液の使用は、約800bp長のcDNA断片の作出を可能にし、この断片をRDA法に使用した。

## 【0051】

テスターcDNA の等量部を、アダプターA又はBのいずれかと連結し、その後個別に過剰量のドライバー-cDNAと、68 °Cでハイブリダイズした。その後、2種の混合液を一緒にし、新たな変性したドライバー-cDNAと第二のハイブリダイゼーションを施した。濃縮されたテスター-cDNAを、次に、アダプターA又はBに特異的なキットのプライマーを用い、伸長時間72 2分、27サイクル以上(94 °Cで10秒、66 °Cで30秒、72 °Cで2分)のPCRにより指数関数的に増幅した。更に濃縮するために、この反応液の1アリコートに、該キットの特異的な入れ子式プライマーを用い、伸長時間72 2分で、27サイクル以上(94 °Cで10秒、66 °Cで30秒、72 °Cで2分)の第二のPCRを施した。この反応から得られる産物を、pCR2.1ベクター(Invitrogen社

)に連結し、かつその後コンピテントE. coli(OneShot(登録商標)、Invitrogen社)にトランスフェクションした。4748個の形質転換体を得、LB-Amp培地中の96-ウェルブロック中で37℃で48時間培養した。その後E. coli浮遊液の5µlアリコート、500µlのTE緩衝液中で、100℃で10分間加熱し、かつその1.5µlを、PCRの基本として使用し、ベクターの挿入断片は、フランキングプライマー(配列番号:9及び10)で35サイクル以上(94℃1分、55℃1分、72℃2分)で増幅した。このPCR産物を、アガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色により明らかにした。PCR産物17µlを、6xSSCに最終容量252µlとなるように採取し、平衡化したナイロン膜(Hybond-N、Amersham社)上に、DNA-Dot-Blots(Sambrook、1989)を作成する標準技法に従い3コピーで固定した。残りの細菌培養物は、グリセロールストック培養物として-80℃で保存した。

#### 【0052】

4748個の個々のクローンのcDNAサブトラクションライブラリーを、E. coliグリセロールストック培養物の形で得、その固定されたPCR産物を、ナイロン膜に塗布し、かつその挿入断片の長さをアガロース電気泳動から調べた。予想されたように、挿入されたcDNA断片は、平均長約800bpを有することがわかった。

#### 【0053】

#### 実施例2:

#### cDNAサブトラクションライブラリーのディファレンシャルハイブリダイゼーションによる腫瘍遺伝子及び腫瘍-精巣遺伝子の選択

ヒト精巣-特異性cDNAライブラリー(Human Testis Specific PCR-Select(登録商標)cDNA; Clontech社、パロアルト)を、製造業者の指示に従い(94℃で10秒、66℃で30秒、72℃で1.5分)の11サイクルのPCRで増幅した。アリコートを、RTS RadPrime DNA Labeling System (GibcoBRL社)により、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dCTP (NEN社、ボストン)を製造業者の指示に従い用い標識し、かつ常法(Sambrook、1989)を使用し、実施例1に記されたDNA-Dot-Blotsにより、ストリンジェントな条件下(68℃)でハイブリダイゼーションした。Human Testis Specific PCR-Select(登録商標)cDNAでハイブリダイズされたクローンを、オートラジオグラフィーにより可視化した(Xomat DRフィルム、Kodak社)。第二のDNA-Dot-Blotsセットは、前述のように

、cDNA SCCプールの標識されたプローブによりハイブリダイズした。第三のDNA-Dot-Blotsセットは、同じ方法で、15種の正常組織(骨髄、心臓、腎、肝、肺、膝、骨格筋、脾臓、胸腺、小腸、胃、リンパ節、乳腺、前立腺及び気管)のcDNA正常組織プールのプローブによりハイブリダイズした。

#### 【0054】

画像及びオートラジオグラフィー又はセットのディファレンシャルハイブリダイゼーションされたスポットの正味の数と比較することにより、正常組織と比べて腫瘍においてのみmRNAが過剰発現されたクローンを選択することが可能であるか、もしくは腫瘍及び精巢(免疫特権化された(immunoprivileged)組織の例として)の両方において転写した。前者は腫瘍抗原クラス、後者は腫瘍-精巢抗原クラスの候補である。

#### 【0055】

##### 実施例3:

##### 腫瘍及び腫瘍-精巢抗原候補のDNA配列決定及び注解

実施例2で得られた結果を基に選択した234種のクローン由来のプラスミド-DNAを、製造業者(QIAgen社)の指示に従い単離し、かつサンガー法により、ABI-Prism装置で配列決定した。このようにして認められた配列は、BLAST-Search (National Center for Biotechnology Information)により注解され、かつESTデータベースとの比較を行った。これは、198種の公知の遺伝子及び36種の未知の遺伝子を同定することを可能にした。後者に関しては、EST入力のみを行う。36種の未知の遺伝子について、その発現プロフィールを推定した：対応するcDNAライブラリーのための出発組織は、実験により決定した配列と>95%の同一性(BLAST)を有するデータベースのEST全てについてチェックした。これらは、i)発症臨界正常組織、ii)胎児の「ディスポーザブル(disposal)」及び免疫特権化された組織、並びにiii)腫瘍及び腫瘍細胞株に、細分した。この「仮想mRNAプロフィール」を基に、10種のクローンを更なる実験分析のために選択した。

#### 【0056】

##### 実施例4:

##### 腫瘍組織及び正常組織における候補クローンの転写分析

腫瘍組織又は正常組織からの全RNAの2~5 $\mu$ gを、SuperScriptII (GibcoBRL社) 又はAMV-RT (Promega社)を製造業者の推奨するように使用し逆転写した。各々個々のRNAプローブについて、第二試験を、逆転写酵素なしに行い、染色体DNAの混入に関する対照とした。これらのcDNAの性質及び量を、 $\alpha$ -アクチン-特異性プライマー(配列番号:3及び4)及びGAPDH 特異性プライマー(配列番号:5及び6)を用い、30及び35サイクル(95 $^{\circ}$ で1分、55 $^{\circ}$ で1分、72 $^{\circ}$ で1分)によるPCRにより調べた。10種の候補遺伝子を、特異的プライマーにより、類似性について分析した。これらのPCR産物は、アガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色で検出した。「C42」と称される候補は、C42-特異的プライマー(配列番号:7及び8)による30サイクル後、比較的特異的な腫瘍/精巣転写物プロフィールを示し;乳癌、肺腺腫、肺の平板上皮腫瘍、腎臓癌、結腸癌、心臓、肺、肝、腎、結腸、脾臓及び精巣からのRNAの半定量的RT-PCRを、図1に示した。このクローンC42は549bpの挿入断片を含むが、これについて引き続き詳細な分析を行った。

【0057】

実施例5:

腫瘍組織及び正常組織中のC42の転写プロフィール

ノーザンブロット分析のために、Human Multiple Tissue Northern Blots (MTN; Clontech社、パロアルト)及び(Invitrogen社)で、[ $\gamma$ - $^{32}$ P]dCTP (NEN、ボストン)で標識した長さ549bpのC42 PCR産物を、68 $^{\circ}$ で2時間ハイブリダイズした。標準のオートラジオグラフィー(Hyperfilm, Amersham社)で可視化した。図2は、この分析の結果を示している:20種の正常組織(膵、副腎髄質、甲状腺、副腎皮質、精巣、胸腺、小腸、胃、脳、心臓、骨格筋、結腸、脾臓、腎臓、肝臓、胎盤、肺、白血球、胆嚢、食道)及び4種の腫瘍組織(胆嚢及び胃の腺腫、並びに食道及び肺の平板上皮腫瘍)に由来。C42について、長さ4.4kbの顕著な転写物が、食道及び肺由来の平板上皮腫瘍の腫瘍組織中に認められた。正常組織において、長さ4.4kbの弱い転写物が、食道においてのみ認められた。低い強度のシグナルは、起こりそうもない様に思われる、免疫学的に関係のある発現を生じている。別の3.5kb転写物は、恐らく4.4 kb転写物のスプライシング変種であるか、又は相同遺伝子に由来するが、これは、両腫瘍組織においては同定されたが、正常組織

においては同定されなかった(図2)。肺及び食道の平板上皮腫瘍内におけるTAA「C42」の存在は、最初にRDA法に使用された出発物質(肺の平板上皮腫瘍の個別の患者5名からのプール)に高度に対応し、かつ出現するTAAがこの種の癌に特異的であることを示している。

【0058】

実施例6：

C42 cDNAのクローニング

以下の手順を用いて、ヒトC42 cDNAをクローニングした：BLAST検索から、実施例4で得た長さ549bpのC42 cDNA挿入断片(「当初の断片」と重複する下記のESTを得た：AA429919；AA430055；AA446075；AA430264；AA160879。配列AA430055から出発し、クローンC42重複しているコンティグが、TigemNet (<http://gcg.tigem.it/cgi-bin/uniestass.pl>)のEstExtractorにより認められた。このコンティグ及び実施例4で得られた当初の断片の長さ549bpの配列(配列番号：19)の重複部分は、C42-特異的プライマー及び肺腫瘍cDNAのコンティグ(配列番号：11及び12)の3'末端に位置したプライマーによる、PCR増幅により証明された。C42の当初の断片と重複する配列AA430264及びAA446075を用いて、5'方向への伸長を得た。第一のPCRのためにはプライマー対(配列番号：13及び14)を、かつ「入れ子式」PCRのためにはプライマー対(配列番号：15及び16)を用いる、2種の連続PCRにより、C42に属する他の断片を、Advantage cDNA PCR Kit (Clontech社)及び続けてそこに記された常法を用い、SuperScript(登録商標) Testis cDNA Library (Gibco BRL社)から増幅した。この新規配列から出発し、C42に属する更に3種のEST入力を見つけた：A1493356；AA443218；AA443258。次にこれらの新たな配列に関する知識は、第一のPCRのためにはプライマー対(配列番号：13及び17)を及び内側に相殺(offset)された「入れ子式」PCRのためにはプライマー対(配列番号：15及び18)を用い、更に上流に、2種の連続PCRを行うことを可能にした。この方法で他のC42断片をクローニングした。

【0059】

配列分析のために、PCR調製物のアリコートを、pCR2.1ベクター (Invitrogen社)に直接連結し、その後コンピテントE. coil (OneShot(登録商標)、Invitrogen

n社)に形質転換し、かつ前述のように配列決定した。第一のPCRのためにはプライマー対配列番号：13及び配列番号：3及び「入れ子式」PCRのためにはプライマー対配列番号：15による、2種の連続PCRを用いて、SuperScript(登録商標)ヒト精巢cDNAライブラリー(Gibco BRL社)からの別のC42断片を、Advantage cDNA PCR kit (Clontech社)を用いて増幅した。追加の上流プライマーにより、新たなC42断片は同定されなかった。従って、長さ4077ヌクレオチドの C42(配列番号：1のcDNA 配列)の完全長mRNAが同定されたと推定される。この結果は、図2に示したMTN上のおよそ4.4kbのC42バンドの認識と一致する。(配列決定されたポリヌクレオチド鎖の長さMTNにより認識されたC42配列の間の差異は、ポリA尾部及びmRNAの分画の不正確さに起因するであろう)。このmRNAは、長さ943アミノ酸のポリペプチドをコードしている3392番ヌクレオチドまでの連続オープンリーディングフレームの開始を示す開始コドン(ヌクレオチド564-566に有する(配列番号：2))。

#### 【0060】

C42の配列は、様々な種において発現される(場合によっては、高度の組織特異性)Ca<sup>2+</sup>-依存性Cl<sup>-</sup>-チャネルタンパク質の遺伝子ファミリーと、ヌクレオチド及びタンパク質の両レベルで明確な相同性を示す。今までに、このファミリーの5種のメンバーがクローニングされ、かつ部分的に特徴付けられている：2種のウシ遺伝子bCLCA1 (ウシCa<sup>2+</sup>-依存性Cl<sup>-</sup>-チャネル-1; Cunninghamら、1995)及びLu-ECAM-1(ウシ肺上皮細胞接着分子-1; Elbleら、1997)、マウス遺伝子mCLCA1(マウスCa<sup>2+</sup>-依存性Cl<sup>-</sup>-チャネル-1; Gandhiら、1998)及び2種のヒト遺伝子hCLCA1 (ヒトCa<sup>2+</sup>-依存性Cl<sup>-</sup>-チャネル; Gruberら、1998)及びhCLCA3 (ヒトCa<sup>2+</sup>-依存性Cl<sup>-</sup>-チャネル-3; Gruberら、1999)。このタンパク質ファミリーのメンバーは全て、典型的膜貫通領域を有し、かつ現時点でわかっていることは、hCLCA3以外は、翻訳後に切断され、ヘテロ二量体を形成し、そのC-末端部分はグリコシル化される(Elbleら、1997)。例えばウシLu-ECAM-1は、マウス悪性黒色腫のB16F10肺転移を生じ、上皮細胞に結合させる(Zhuら、1992)。

#### 【0061】

ヌクレオチド配列の正確さをチェックするために、肺鱗状細胞腫瘍及び精巢か

らのC42断片の重複部分を、プライマー対配列番号：5及び6、配列番号：7及び8、配列番号：9及び10、配列番号：11及び12、配列番号：13及び14、配列番号：15及び16、配列番号：17及び18、配列番号：19及び20で増幅し、かつ配列決定した。両方の配列を並置したところ、2399番のサイレント突然変異位(G A)以外は、差異はなかった。

#### 【0062】

このC42配列は、タンパク質ファミリーの典型の5個の疎水性膜貫通領域を有する(配列番号：2の位置222-252、416-445、553-574、746-766及び900-92)が、他のメンバーとは異なり、強帯電したアミノ酸により形成されるC-末端を有した。

#### 【0063】

#### 実施例7：

#### C42のC-末端部分をコードしている領域の可能性のあるMHC-結合ペプチド

C42(配列番号：2)のC-末端断片のコード領域内の可能性のあるペプチドエピトープは、公知のモチーフ(Rammenseeら、1995)を基に、Parkerら、1994により説明されたアルゴリズムを用いて行った。対応するHLA分子に結合し、従って免疫原性CTL-エピトープを構成することが予想される9-員の候補ペプチドは、最も重要なHLA-型、特にHLA-A1、-A\*0201、-A3、-B7、-B14及び-B\*4403について同定した；発見されたペプチドを、表1に列記した。同様の方法により、他の可能性のあるペプチドエピトープを、他のHLA型又は8-もしくは10-員ペプチドについて認めることができる。

#### 【0064】

表1：C42(742個のアミノ酸)の C-末端断片の免疫原性ペプチド候補

| 配列番号：2 の<br>出発位置 | 配列        | HLA    |
|------------------|-----------|--------|
| 19               | KLFKEGCTF | A3     |
| 21               | FKEGCTFIY | A1     |
| 41               | FMQSLSSVV | A*0201 |
| 63               | NLQNMCSL  | A*0201 |
| 76               | DVITDSADF | A3     |
| 93               | TELPPPPTF | B*4403 |
| 95               | LPPPPTFSL | B7     |
| 102              | SLVQAGDKV | A*0201 |
| 112              | CLVLDVSSK | A3     |
| 120              | KMAEADRLL | A*0201 |
| 125              | DRLLQLQQA | B14    |
| 129              | QLQQAAEFY | A3     |
| 130              | LQQAAEFYL | A*0201 |
| 140              | QIVEIHTFV | A*0201 |
| 155              | SKGEIRAQL | B14    |
| 170              | DDRKLLVSY | B*4403 |
| 171              | DRKLLVSYL | B14    |
| 173              | KLLVSYLPT | A*0201 |
| 178              | YLPTTVSAK | A3     |
| 200              | EVVEKLNGK | A3     |
| 202              | VEKLNGKAY | B*4403 |
| 215              | ILVTSGDDK | A3     |
| 224              | LLGNCLPTV | A*0201 |
| 254              | ELSRLTGGL | A*0201 |
| 288              | DIFQQHIQL | B14    |
| 295              | QLESTGENV | A*0201 |

|     |           |         |
|-----|-----------|---------|
| 302 | NVKPHHQLK | A3      |
| 338 | ILFDPDGRK | A3      |
| 339 | LFDPDGRKY | A1      |
| 362 | SLWIPCTAK | A3      |
| 370 | KPGHWTYTL | B7      |
| 384 | SLQALKVTV | A*0201  |
| 407 | EAFVGRDSL | B7, B14 |
| 409 | FVGRDSLHF | A3      |
| 447 | TGDPVTLRL | A1      |
| 466 | KNDGIYSRY | A1      |
| 482 | GRYSLKVHV | B14     |
| 521 | QMNAPRKS  | A*0201  |
| 532 | NEEERKWGF | B*4403  |
| 563 | FPPCKIIDL | B7, B14 |
| 591 | FDQGQATSY | B*4403  |
| 606 | SLQNIQDDF | A3      |
| 652 | NGBTSHSR  | A1      |
| 665 | IRAMDRNSL | B14     |
| 690 | NSDPVPARD | A1      |
| 691 | SDPVPARDY | B*4403  |
| 692 | DPVPARDYL | B7, B14 |
| 694 | VPARDYLIL | B7      |
| 709 | MGLIGHICL | B14     |
| 733 | DKKENGTKL | B14     |

## 【0065】

## 実施例8：

## T2-A2ペプチド負荷アッセイ

このアッセイを利用し、HLA-A2分子に結合し、その結果T-細胞を提示する可能性のあるペプチドを同定する。可能性のあるC42エピトープは、実施例7に示した予測アルゴリズムにより同定し、かつこれらのペプチドを合成した(配列番号：90-101)。陽性対照として、チロシナーゼのHLA-A2ペプチドエピトープ(配列番号：102)を用い、陰性対照として、MAGE3のHLA-A1 エピトープ(配列番号：103)を

使用した。これらのペプチドは、DMSO(Sigma社)に、濃度40mg/mlで溶解し、かつPBSで希釈した。T2-細胞(ATCC寄託番号：CRL-1992)を、RPMI 1640中に濃度 $2.5 \times 10^6$ 個で再浮遊し、かつ10 $\mu$ g/ml<sub>2</sub>-ミクログロブリン(ICN社)を添加した。これらの細胞を、96ウェル微量力価決定プレート上に、200 $\mu$ l/ウェルで播種し、かつ0~320 $\mu$ gの一連のペプチド希釈液を負荷した。37 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベーションした後、安定したペプチド-HLA-<sub>2</sub>-ミクログロブリンの量を、第二の抗体R0480(DAKO社)により認識される抗-HLA抗体を用いて、蛍光活性化セルソーター(FACS)(Becton Dickinson社)で測定した(図3)。蛍光のシフトは、細胞表面上の安定化されたペプチドHLA-<sub>2</sub>-ミクログロブリン複合体の量を反映している。前述の試験に従い12種のC42-CTLにより選択された5種のC42-CTLペプチドの反応を、図3に示した。ペプチドC42-5、C42-6、C42-8及びC42-11(配列番号：94、95、97及び100)は、HLA-A 0201への結合を示している。従って、これらはT-細胞-特異性ペプチドエピトープの良好な候補である。

#### 【0066】

#### 文献

- Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga, J., and Knop, J. (1997), *J. Immunol. Methods* 203, 171 - 180. \_\_\_\_\_
- Blake, J., Johnston, J.V., Hellstrom, K.E., Marquardt, H., and, Chen, L. (1996), *J. Exp. Med.* 184, 121 - 130. \_\_\_\_\_
- Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, and A. Van Pel (1994), *Annu.Rev.Immunol.* 12: 337-365 \_\_\_\_\_
- Boon T ,(1998), Tumor antigens recognized by cytolytic Tcells. *Cancer Vaccine Week - International Symposium*, New York, Oct 1998; abstract S01
- Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312, 643-646 \_\_\_\_\_
- Bruggemann, M. and Neuberger, M.S., (1996), *Immunol. Today* 17, 391-397
- Buschle M, Schmidt W, Zauner W, Mechtler K, Trska B, Kiriappos H, Birnstiel M (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3256-3261 \_\_\_\_\_
- Celluzzi, CM and Falco, LD, Jr. (1998), *J. Immunol.* 160, 3081-3085
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S.,

Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 1914-1918. \_\_\_\_\_

Coulie, P.G. (1997), Mol. Med. Today 3, 261-268 \_\_\_\_\_

Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow, TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, and Slingluff, CL, Jr. (1994), Science 264, 716-719

**【 0 0 6 7 】**

Cunningham SA, Awayda MS, Bubien JK, Ismailov II, Arrate MP, Berdiev BK, Benos DJ, Fuller CM (1995), J. Biol. Chem. 270, 31016-31026 \_\_\_\_\_

Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6025-6030.

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90, 3539-3543. \_\_\_\_\_

Elble, R., Widom, J., Gruber, A.D., Abdel-Ghany, M., Levine, R., Goodwin, A., Cheng, H.-C., and Pauli, B.U. (1997), J. Biol. Chem. 272, 27853-27861.

Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J (1985), J. Virol. 55, 836-839

Falk, K., Rotzschke, O., Stevanović, S., Jung, G., and Rammensee, H-G (1991), Nature 351, 290-296. \_\_\_\_\_

Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H.I., Simons, J.W., Karasuyama, H., Vogelstein, B., and Frost, P. (1990), Cell 60, 397-403.

Gandhi, R., Elble, R.C., Gruber, A.D., Ji, H.-J., Copeland, S.M., Fuller, C.M., and Pauli, B.U. (1998), J. Biol. Chem. 273, 32096-32101.

Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K., Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), J. Exp. Med. 172, 1217-1224. \_\_\_\_\_

## 【0068】

- Graziano, R.F., et al., (1995), *J. Immunol.* 155, 4996-5002
- Griffiths, A.D., et al., (1994), *EMBO J.* 13, 3245-3260
- Gruber, A.D., Elble, R.C., Ji, H.-J., Schreur, K.D., Fuller, C.M., and Pauli, B.U. (1998), *Genomics* 54, 200-214.
- Gruber, A.D. and Pauli, B.U. (1999), *Biochim. Biophys. Acta* 1444, 418-423.
- Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, and Barnetson RS (1995), *World J. Surg.* 19, 352-358
- Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), *Nucleic. Acids. Res.* 22, 5640-5648.
- Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J., and Knuth, A. (1998), *J. Exp. Med.* 187, 26-270.
- Jakobovits, A., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 561-566
- Jameson, BA and Wolf, H (1988), The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4, 181-186

## 【0069】

- Jessup, JM and Loda, M (1998), Prognostic markers in rectal carcinoma. *Semin. Surg. Oncol.* 15, 131-140.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., King, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1995), *J. Immunol.* 154, 3961-3968.
- Kawakami, Y, Robbins, PF, and Rosenberg, SA (1996), *Keio J. Med.* 45, 100-108
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975), *Nature* 265, 495-497
- Kruif, J., et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3938-3942
- Kyte, J and Doolittle, RF (1982), *J. Mol. Biol.* 157, 105-132
- Lethe, B, Lucas, S, Michaux, L, De Smet, C, Godelaine, D, Serrano, A, De Plaen, E, and Boon, T (1998), *Int. J. Cancer* 76, 903-908

Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F, Viel S, and Hercend T (1993), *Cancer Res.* 53, 3569-3573 \_\_\_\_\_

Marchand M, Weynants P, Rankin E et al (1995), *Int. J. Cancer* 63:883-885  
【0070】

Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., and Lotze, M.T. (1995), *Nature Medicine* 1, 1297-1302. \_\_\_\_\_

McGuinness, B.T., et al., (1996), *Nature Biotechnol.* 14, 1149

Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 8, 651-657

Murphy, G.P., Elgamal, A.A., Su, S.L., Bostwick, D.G., and Holmes, E.H. (1998), *Cancer* 83, 2259-2269 \_\_\_\_\_

Neuberger, M.S., et al., (1984), *Nature* 312, 604-608 \_\_\_\_\_

Pardoll, D. M.(1998), *Nature Medicine* 4, 525-531 \_\_\_\_\_

Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. (1994), *J. Immunol.* 152, 163.

Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Kawakami, Y. (1996), *J. Immunol.* 157, 2539-2548.

【0071】

Paterson Y, Ikonomidis G (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5, 664-669

Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995), *Immunogenetics* 41, 178-228

Rapellino, M, Pecchio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, and Cavallo, A (1995), *Anticancer Res.* 15, 1065-1070 \_\_\_\_\_

Ravaoli, A., Bagli, L., Zucchini, A., and Monti, F. (1998), *Cell. Prolif.* 31, 113-126

Revillion, F, Bonnetterre, J, and Peyrat, JP (1998), *Eur. J. Cancer* 34, 791-808

Restifo NP (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5, 658-663 \_\_\_\_\_

Riechmann, L., et al., (1988), *Nature* 332: 323-327

Robbins, PF and Kawakami, Y (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 8, 628-636  
 Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., and Sette, A  
 . (1993), *Cell* 74, 929-937. \_\_\_\_\_

Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995),  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11810-11813 \_\_\_\_\_

**【 0 0 7 2 】**

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989

Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, and Segurado OG (1993), *J. Immunol.* 151, 4209-4220 \_\_\_\_\_

Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kiriappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel M (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 3262-3267 \_\_\_\_\_

Schweighoffer, T. (1997), *Onc. Res.* 3, 164-176 \_\_\_\_\_

Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., de I Guercio, M.-F., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., and Chisari, F.V. (1994), *J. Immunol.* 153, 5586-5592. \_\_\_\_\_

Stauss, H.J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., and Sinclair, C. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89, 7871-7875.

Tepper, R.I., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1989), *Cell* 57, 50-512.

Tighe H, Corr, M, Roman M, and Raz E (1998), *Immunol. Today* 19, 89-97

**【 0 0 7 3 】**

Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Rensing, M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14660-14665

Tuting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., and Storkus, W.J., (1997), *Eur. J. Immunol.* 27, 2702-2707,.

Van den Eynde, B. and Brichard, V.G. (1995), *Curr. Opin. Immunol.* 7, 674

-681.

Van den Eynde, BJ, and van der Bruggen, P (1997), *Curr. Opin. Immunol.* 9, 684-693

van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. (1991), *Science* 254, 1643-1647

van der Burg, S.H., et al., (1996), *J. Immunol.* 156, 3308-3314

van Elsas, A., van der Minne, C.E., Borghi, M., van der Spek, C.W., Braakman, E., Osanto, S., and Schrier, P.I. (1996), CTL Recognition of an IL-2 Producing Melanoma Vaccine. In: *Immunology of human melanoma. Tumor-host interaction and immunotherapy*, edited by M. Maio, Amsterdam: IOS, 1996, p. 165-173

【 0 0 7 4 】

van Elsas, A., Aarnoudse, C., van der Minne, C.E., van der Spek, C.W., Brouwenstijn, N., Osanto, S., and Schrier, P.I. (1997), *J. Immunother.* 20, 343-353.

Vaughan, T.J., et al., (1998), *Nature Biotechnol.* 16, 535-539

Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, KW (1995), *Science* 270, 484-487

Wang, L., et al., (1997), *Mol. Immunol.* 34, 609-618

Wang, RF (1997), *Mol. Med.* 3, 716-731

Winter, G., et al., (1994), *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455

Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), *Int. J. Cancer* 57, 413-418

Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11671-11675.

Zitvogel, L., Mayordomo, J.I., Tjandrawan, T., DeLeo, A.B., Clarke, M.R., Lotze, M.T., and Storkus, W.J. (1996), *J. Exp. Med.* 183, 87-97.

Zhu, D., Cheng, C.-F., and Pauli, B.U. (1992), *J. Clin. Invest.* 89, 171

8-1724.

## 【配列表】

## SEQUENZPROTOKOLL

```

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH
<120> Tumor-assoziiertes Antigen C42
<130> 12_208pct
<140>
<141>
<160> 103
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 4077
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> 5'UTR
<222> (1)..(563)
<220>
<221> CDS
<222> (564)..(3392)
<220>
<221> 3'UTR
<222> (3394)..(4077)
<400> 1
tccgctgacc caagggctgt agggactggg ctgcagaatg gatttctaaa tcttcaaaat 60
aaacaggcaa ggaaatcttg caacaaatga aaaatgactt gagggcagta gaaagtactt 120
gtgccaactg atggaggagg ttatgaaaaa tgaggagagg aaaatcacta tagacttctg 180
tgtttctact gcaagtggat tgaacagtcc agatatactg atttcagcc catatttcct 240
gcttttaagc tcctttggtc ttatttcctt cttctttctg aaaagttata aaatgaatga 300
agggcagaat gtttcttgcc caacatgat tcaggaggca gtcagccac agaacaggca 360
agtgtagcat tgcttgagg aaaaggactt gtagaggcag gtcccagatg gatccacccc 420
agacttttca aagaagacac ctccctcacc ttgtgttota aaacottgca agttcaggaa 480
gaaaccctct gcatccatat tgzaaacctg acacaatgta tgcagcaggc tcagtgtgag 540
tgaactggag gcttctctac aac atg acc caa agg agc att gca ggt cct att 593
Met Thr Gln Arg Ser Ile Ala Gly Pro Ile
1 5 10

```

|   |      |
|---|------|
| tgc aac ctg aag ttt gtg act ctc ctg gtt gcc tta agt tca gaa ctc | 641  |
| Cys Asn Leu Lys Phe Val Thr Leu Leu Val Ala Leu Ser Ser Glu Leu |      |
| 15 20 25  |      |
| cca ttc ctg gga gct gga gta cag ctt caa gac aat ggg tat aat gga | 689  |
| Pro Phe Leu Gly Ala Gly Val Gln Leu Gln Asp Asn Gly Tyr Asn Gly |      |
| 30 35 40  |      |
| ttg ctc att gca att aat cct cag gta cct gag aat cag aac ctc atc | 737  |
| Leu Leu Ile Ala Ile Asn Pro Gln Val Pro Glu Asn Gln Asn Leu Ile |      |
| 45 50 55  |      |
| tca aac att aag gaa atg ata act gaa gct tca ttt tac cta ttt aat | 785  |
| Ser Asn Ile Lys Glu Met Ile Thr Glu Ala Ser Phe Tyr Leu Phe Asn |      |
| 60 65 70  |      |
| gct acc aag aga aga gta ttt ttc aga aat ata aag att tta ata cct | 833  |
| Ala Thr Lys Arg Arg Val Phe Phe Arg Asn Ile Lys Ile Leu Ile Pro |      |
| 75 80 85 90   |      |
| gcc aca tgg aaa gct aat aat aac agc aaa ata aaa caa gaa tca tat | 881  |
| Ala Thr Trp Lys Ala Asn Asn Asn Ser Lys Ile Lys Gln Glu Ser Tyr |      |
| 95 100 105  |      |
| gaa aag gca aat gtc ata gtg act gac tgg tat ggg gca cat gga gat | 929  |
| Glu Lys Ala Asn Val Ile Val Thr Asp Trp Tyr Gly Ala His Gly Asp |      |
| 110 115 120   |      |
| gat cca tac acc cta caa tac aga ggg tgt gga aaa gag gga aaa tac | 977  |
| Asp Pro Tyr Thr Leu Gln Tyr Arg Gly Cys Gly Lys Glu Gly Lys Tyr |      |
| 125 130 135   |      |
| att cat ttc aca cct aat ttc cta ctg aat gat aac tta aca gct gcc | 1025 |
| Ile His Phe Thr Pro Asn Phe Leu Leu Asn Asp Asn Leu Thr Ala Gly |      |
| 140 145 150   |      |
| tac gga tca cga gcc cga gtg ttt gtc cat gaa tgg gcc cac ctc cgt | 1073 |
| Tyr Gly Ser Arg Gly Arg Val Phe Val His Glu Trp Ala His Leu Arg |      |
| 155 160 165 170   |      |
| tgg ggt gtg ttc gat gag tat aac aat gac aaa cct ttc tac ata aat | 1121 |
| Trp Gly Val Phe Asp Glu Tyr Asn Asn Asp Lys Pro Phe Tyr Ile Asn |      |
| 175 180 185   |      |
| ggg caa aat caa att aaa gtg aca agg tgt tca tct gac atc aca gcc | 1169 |
| Gly Gln Asn Gln Ile Lys Val Thr Arg Cys Ser Ser Asp Ile Thr Gly |      |
| 190 195 200   |      |
| att ttt gtg tgt gaa aaa ggt cct tgc ccc caa gaa aac tgt att att | 1217 |
| Ile Phe Val Cys Glu Lys Gly Pro Cys Pro Gln Glu Asn Cys Ile Ile |      |
| 205 210 215   |      |
| agt aag ctt ttt aaa gaa gga tgc acc ttt atc tac aat agc acc caa | 1265 |
| Ser Lys Leu Phe Lys Glu Gly Cys Thr Phe Ile Tyr Asn Ser Thr Gln |      |
| 220 225 230   |      |

|   |                 |
|---|-----------------|
| aat gca act gca tca ata atg ttc atg caa agt tta tct tct gtg gtt | 1313            |
| Asn Ala Thr Ala Ser Ile Met Phe Met Gln Ser Leu Ser Ser Val Val |                 |
| 235   | 240 245 250     |
| gaa ttt tgt aat gca agt acc cac aac caa gaa gca cca aac cta cag | 1361            |
| Glu Phe Cys Asn Ala Ser Thr His Asn Gln Glu Ala Pro Asn Leu Gln |                 |
|   | 255 260 265     |
| aac cag atg tgc agc ctc aga agt gca tgg gat gta atc aca gac tct | 1409            |
| Asn Gln Met Cys Ser Leu Arg Ser Ala Trp Asp Val Ile Thr Asp Ser |                 |
|   | 270 275 280     |
| gct gac ttt cac cac agc ttt ccc atg aat ggg act gag ctt cca cct | 1457            |
| Ala Asp Phe His His Ser Phe Pro Met Asn Gly Thr Glu Leu Pro Pro |                 |
|   | 285 290 295     |
| cct ccc aca ttc tcg ctt gta cag gct ggt gac aaa gtg gtc tgt tta | 1505            |
| Pro Pro Thr Phe Ser Leu Val Gln Ala Gly Asp Lys Val Val Cys Leu |                 |
|   | 300 305 310     |
| gtg ctg gat gtg tcc agc aag atg gca gag gct gac aga ctc ctt caa | 1553            |
| Val Leu Asp Val Ser Ser Lys Met Ala Glu Ala Asp Arg Leu Leu Gln |                 |
|   | 315 320 325 330 |
| cta caa caa gcc gca gaa ttt tat ttg atg cag att gtt gaa att cat | 1601            |
| Leu Gln Gln Ala Ala Glu Phe Tyr Leu Met Gln Ile Val Glu Ile His |                 |
|   | 335 340 345     |
| acc ttc gtg ggc att gcc agt ttc gac agc aaa gga gag atc aga gcc | 1649            |
| Thr Phe Val Gly Ile Ala Ser Phe Asp Ser Lys Gly Glu Ile Arg Ala |                 |
|   | 350 355 360     |
| cag cta cac caa att aac agc aat gat gat cga aag ttg ctg gtt tca | 1697            |
| Gln Leu His Gln Ile Asn Ser Asn Asp Asp Arg Lys Leu Leu Val Ser |                 |
|   | 365 370 375     |
| tat ctg ccc acc act gta tca gct aaa aca gac atc agc att tgt tca | 1745            |
| Tyr Leu Pro Thr Thr Val Ser Ala Lys Thr Asp Ile Ser Ile Cys Ser |                 |
|   | 380 385 390     |
| ggg ctt aag aaa gga ttt gag gtg gtt gaa aaa ctg aat gga aaa gct | 1793            |
| Gly Leu Lys Lys Gly Phe Glu Val Val Glu Lys Leu Asn Gly Lys Ala |                 |
|   | 395 400 405 410 |
| tat ggc tct gtg atg ata tta gtg acc agc gga gat gat aag ctt ctt | 1841            |
| Tyr Gly Ser Val Met Ile Leu Val Thr Ser Gly Asp Asp Lys Leu Leu |                 |
|   | 415 420 425     |
| ggc aat tgc tta ccc act gtg ctc agc agt ggt tca aca att cac tcc | 1889            |
| Gly Asn Cys Leu Pro Thr Val Leu Ser Ser Gly Ser Thr Ile His Ser |                 |
|   | 430 435 440     |
| att gcc ctg ggt tca tct gca gcc cca aat ctg gag gaa tta tca cgt | 1937            |
| Ile Ala Leu Gly Ser Ser Ala Ala Pro Asn Leu Glu Glu Leu Ser Arg |                 |
|   | 445 450 455     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| ctt | aca | gga | ggt | tta | aag | ttc | ttt | ggt | cca | gat | ata | tca | aac | tcc | aat | 1985 |
| Leu | Thr | Gly | Gly | Leu | Lys | Phe | Phe | Val | Pro | Asp | Ile | Ser | Asn | Ser | Asn |      |
|     | 460 |     |     |     | 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     |      |
| agc | atg | att | gat | gct | ttc | agt | aga | att | tcc | tct | gga | act | gga | gac | att | 2033 |
| Ser | Met | Ile | Asp | Ala | Phe | Ser | Arg | Ile | Ser | Ser | Gly | Thr | Gly | Asp | Ile |      |
|     | 475 |     |     | 480 |     |     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |      |
| ttc | cag | caa | cat | att | cag | ctt | gaa | agt | aca | ggt | gaa | aat | gtc | aaa | cct | 2081 |
| Phe | Gln | Gln | His | Ile | Gln | Leu | Glu | Ser | Thr | Gly | Glu | Asn | Val | Lys | Pro |      |
|     |     |     |     | 495 |     |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |      |
| cac | cat | caa | ttg | aaa | aac | aca | gtg | act | gtg | gat | aat | act | gtg | ggc | aac | 2129 |
| His | His | Gln | Leu | Lys | Asn | Thr | Val | Thr | Val | Asp | Asn | Thr | Val | Gly | Asn |      |
|     |     |     | 510 |     |     |     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |      |
| gac | act | atg | ttt | cta | ggt | acg | tgg | cag | gcc | agt | ggt | cct | cct | gag | att | 2177 |
| Asp | Thr | Met | Phe | Leu | Val | Thr | Trp | Gln | Ala | Ser | Gly | Pro | Pro | Glu | Ile |      |
|     |     | 525 |     |     |     | 530 |     |     |     |     |     | 535 |     |     |     |      |
| ata | tta | ttt | gat | cct | gat | gga | cga | aaa | tac | tac | aca | aat | aat | ttt | atc | 2225 |
| Ile | Leu | Phe | Asp | Pro | Asp | Gly | Arg | Lys | Tyr | Tyr | Thr | Asn | Asn | Phe | Ile |      |
|     | 540 |     |     |     |     | 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     |      |
| acc | aat | cta | act | ttt | cgg | aca | gct | agt | ctt | tgg | att | cca | gga | aca | gct | 2273 |
| Thr | Asn | Leu | Thr | Phe | Arg | Thr | Ala | Ser | Leu | Trp | Ile | Pro | Gly | Thr | Ala |      |
|     | 555 |     |     |     | 560 |     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |      |
| aag | cct | ggg | cac | tgg | act | tac | acc | ctg | aac | aat | acc | cat | cat | tct | ctg | 2321 |
| Lys | Pro | Gly | His | Trp | Thr | Tyr | Thr | Leu | Asn | Asn | Thr | His | His | Ser | Leu |      |
|     |     |     |     | 575 |     |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |      |
| caa | gcc | ctg | aaa | gtg | aca | gtg | acc | tct | cgt | gcc | tcc | aac | tca | gct | gtg | 2369 |
| Gln | Ala | Leu | Lys | Val | Thr | Val | Thr | Ser | Arg | Ala | Ser | Asn | Ser | Ala | Val |      |
|     |     |     | 590 |     |     |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |      |
| ccc | cca | gcc | act | gtg | gaa | gcc | ttt | gtg | gag | aga | gac | agc | ctc | cat | ttt | 2417 |
| Pro | Pro | Ala | Thr | Val | Glu | Ala | Phe | Val | Glu | Arg | Asp | Ser | Leu | His | Phe |      |
|     |     |     | 605 |     |     |     | 610 |     |     |     |     |     | 615 |     |     |      |
| cct | cat | cct | gtg | atg | att | tat | gcc | aat | gtg | aaa | cag | gga | ttt | tat | ccc | 2465 |
| Pro | His | Pro | Val | Met | Ile | Tyr | Ala | Asn | Val | Lys | Gln | Gly | Phe | Tyr | Pro |      |
|     | 620 |     |     |     |     | 625 |     |     |     |     |     | 630 |     |     |     |      |
| att | ctt | aat | gcc | act | gtc | act | gcc | aca | gtt | gag | cca | gag | act | gga | gat | 2513 |
| Ile | Leu | Asn | Ala | Thr | Val | Thr | Ala | Thr | Val | Glu | Pro | Glu | Thr | Gly | Asp |      |
|     | 635 |     |     |     | 640 |     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |      |
| cct | gtt | acg | ctg | aga | ctc | ctt | gat | gat | gga | gca | ggt | gct | gat | gtt | ata | 2561 |
| Pro | Val | Thr | Leu | Arg | Leu | Leu | Asp | Asp | Gly | Ala | Gly | Ala | Asp | Val | Ile |      |
|     |     |     |     | 655 |     |     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |      |
| aaa | aat | gat | gga | att | tac | tcg | agg | tat | ttt | ttc | tcc | ttt | gct | gca | aat | 2609 |
| Lys | Asn | Asp | Gly | Ile | Tyr | Ser | Arg | Tyr | Phe | Phe | Ser | Phe | Ala | Ala | Asn |      |
|     |     |     | 670 |     |     |     |     | 675 |     |     |     |     |     | 680 |     |      |

|   |      |
|---|------|
| ggt aga tat agc ttg aaa gtg cat gtc aat cac tct ccc agc ata agc | 2657 |
| Gly Arg Tyr Ser Leu Lys Val His Val Asn His Ser Pro Ser Ile Ser |      |
| 685 690 695   |      |
| acc cca gcc cac tct att cca ggg agt cat gct atg tat gta cca ggt | 2705 |
| Thr Pro Ala His Ser Ile Pro Gly Ser His Ala Met Tyr Val Pro Gly |      |
| 700 705 710   |      |
| tac aca gca aac ggt aat att cag atg aat gct cca agg aaa tca gta | 2753 |
| Tyr Thr Ala Asn Gly Asn Ile Gln Met Asn Ala Pro Arg Lys Ser Val |      |
| 715 720 725 730   |      |
| ggc aga aat gag gag gag cga aag tgg ggc ttt agc cga gtc agc tca | 2801 |
| Gly Arg Asn Glu Glu Glu Arg Lys Trp Gly Phe Ser Arg Val Ser Ser |      |
| 735 740 745   |      |
| gga gcc tcc ttt tca gtg ctg gga gtt cca gct gcc ccc cac cct gat | 2849 |
| Gly Gly Ser Phe Ser Val Leu Gly Val Pro Ala Gly Pro His Pro Asp |      |
| 750 755 760   |      |
| gtg ttt cca cca tgc aaa att att gac ctg gaa gct gta aaa gta gaa | 2897 |
| Val Phe Pro Pro Cys Lys Ile Ile Asp Leu Glu Ala Val Lys Val Glu |      |
| 765 770 775   |      |
| gag gaa ttg acc cta tct tgg aca gca cct gga gaa gac ttt gat cag | 2945 |
| Glu Glu Leu Thr Leu Ser Trp Thr Ala Pro Gly Glu Asp Phe Asp Gln |      |
| 780 785 790   |      |
| ggc cag gct aca agc tat gaa ata aga atg agt aaa agt cta cag aat | 2993 |
| Gly Gln Ala Thr Ser Tyr Glu Ile Arg Met Ser Lys Ser Leu Gln Asn |      |
| 795 800 805 810   |      |
| atc caa gat gac ttt aac aat gct att tta gta aat aca tca aag cga | 3041 |
| Ile Gln Asp Asp Phe Asn Asn Ala Ile Leu Val Asn Thr Ser Lys Arg |      |
| 815 820 825   |      |
| aat cct cag caa gct gcc atc agg gag ata ttt acg ttc tca ccc cag | 3089 |
| Asn Pro Gln Gln Ala Gly Ile Arg Glu Ile Phe Thr Phe Ser Pro Gln |      |
| 830 835 840   |      |
| att tcc acg aat gga cct gaa cat cag cca aat gga gaa aca cat gaa | 3137 |
| Ile Ser Thr Asn Gly Pro Glu His Gln Pro Asn Gly Glu Thr His Glu |      |
| 845 850 855   |      |
| agc cac aga att tat gtt gca ata cga gca atg gat agg aac tcc tta | 3185 |
| Ser His Arg Ile Tyr Val Ala Ile Arg Ala Met Asp Arg Asn Ser Leu |      |
| 860 865 870   |      |
| cag tct gct gta tct aac att gcc cag gcg cct ctg ttt att ccc ccc | 3233 |
| Gln Ser Ala Val Ser Asn Ile Ala Gln Ala Pro Leu Phe Ile Pro Pro |      |
| 875 880 885 890   |      |
| aat tct gat cct gta cct gcc aga gat tat ctt ata ttg aaa gga gtt | 3281 |
| Asn Ser Asp Pro Val Pro Ala Arg Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Val |      |
| 895 900 905   |      |



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

Ser Ala Lys Thr Asp Ile Ser Ile Cys Ser Gly Leu Lys Lys Gly Phe  
 385 390 395 400  
 Glu Val Val Glu Lys Leu Asn Gly Lys Ala Tyr Gly Ser Val Met Ile  
 405 410 415  
 Leu Val Thr Ser Gly Asp Asp Lys Leu Leu Gly Asn Cys Leu Pro Thr  
 420 425 430  
 Val Leu Ser Ser Gly Ser Thr Ile His Ser Ile Ala Leu Gly Ser Ser  
 435 440 445  
 Ala Ala Pro Asn Leu Glu Glu Leu Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu Lys  
 450 455 460  
 Phe Phe Val Pro Asp Ile Ser Asn Ser Asn Ser Met Ile Asp Ala Phe  
 465 470 475 480  
 Ser Arg Ile Ser Ser Gly Thr Gly Asp Ile Phe Gln Gln His Ile Gln  
 485 490 495  
 Leu Glu Ser Thr Gly Glu Asn Val Lys Pro His His Gln Leu Lys Asn  
 500 505 510  
 Thr Val Thr Val Asp Asn Thr Val Gly Asn Asp Thr Met Phe Leu Val  
 515 520 525  
 Thr Trp Gln Ala Ser Gly Pro Pro Glu Ile Ile Leu Phe Asp Pro Asp  
 530 535 540  
 Gly Arg Lys Tyr Tyr Thr Asn Asn Phe Ile Thr Asn Leu Thr Phe Arg  
 545 550 555 560  
 Thr Ala Ser Leu Trp Ile Pro Gly Thr Ala Lys Pro Gly His Trp Thr  
 565 570 575  
 Tyr Thr Leu Asn Asn Thr His His Ser Leu Gln Ala Leu Lys Val Thr  
 580 585 590  
 Val Thr Ser Arg Ala Ser Asn Ser Ala Val Pro Pro Ala Thr Val Glu  
 595 600 605  
 Ala Phe Val Glu Arg Asp Ser Leu His Phe Pro His Pro Val Met Ile  
 610 615 620  
 Tyr Ala Asn Val Lys Gln Gly Phe Tyr Pro Ile Leu Asn Ala Thr Val  
 625 630 635 640  
 Thr Ala Thr Val Glu Pro Glu Thr Gly Asp Pro Val Thr Leu Arg Leu  
 645 650 655  
 Leu Asp Asp Gly Ala Gly Ala Asp Val Ile Lys Asn Asp Gly Ile Tyr  
 660 665 670  
 Ser Arg Tyr Phe Phe Ser Phe Ala Ala Asn Gly Arg Tyr Ser Leu Lys  
 675 680 685

Val His Val Asn His Ser Pro Ser Ile Ser Thr Pro Ala His Ser Ile  
 690 695 700  
 Pro Gly Ser His Ala Met Tyr Val Pro Gly Tyr Thr Ala Asn Gly Asn  
 705 710 715 720  
 Ile Gln Met Asn Ala Pro Arg Lys Ser Val Gly Arg Asn Glu Glu Glu  
 725 730 735  
 Arg Lys Trp Gly Phe Ser Arg Val Ser Ser Gly Gly Ser Phe Ser Val  
 740 745 750  
 Leu Gly Val Pro Ala Gly Pro His Pro Asp Val Phe Pro Pro Cys Lys  
 755 760 765  
 Ile Ile Asp Leu Glu Ala Val Lys Val Glu Glu Glu Leu Thr Leu Ser  
 770 775 780  
 Trp Thr Ala Pro Gly Glu Asp Phe Asp Gln Gly Gln Ala Thr Ser Tyr  
 785 790 795 800  
 Glu Ile Arg Met Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ile Gln Asp Asp Phe Asn  
 805 810 815  
 Asn Ala Ile Leu Val Asn Thr Ser Lys Arg Asn Pro Gln Gln Ala Gly  
 820 825 830  
 Ile Arg Glu Ile Phe Thr Phe Ser Pro Gln Ile Ser Thr Asn Gly Pro  
 835 840 845  
 Glu His Gln Pro Asn Gly Glu Thr His Glu Ser His Arg Ile Tyr Val  
 850 855 860  
 Ala Ile Arg Ala Met Asp Arg Asn Ser Leu Gln Ser Ala Val Ser Asn  
 865 870 875 880  
 Ile Ala Gln Ala Pro Leu Phe Ile Pro Pro Asn Ser Asp Pro Val Pro  
 885 890 895  
 Ala Arg Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Val Leu Thr Ala Met Gly Leu  
 900 905 910  
 Ile Gly Ile Ile Cys Leu Ile Ile Val Val Thr His His Thr Leu Ser  
 915 920 925  
 Arg Lys Lys Arg Ala Asp Lys Lys Glu Asn Gly Thr Lys Leu Leu  
 930 935 940

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <400> 3                          |    |
| TGACGGGGTC ACCCACACTG TGCCCATCTA | 30 |
| <210> 4                          |    |
| <211> 29                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> Künstliche Sequenz         |    |
| <220>                            |    |
| <223> Primer                     |    |
| <400> 4                          |    |
| CTAGAAGCAT TGCGGTGGAC GATGGAGGG  | 29 |
| <210> 5                          |    |
| <211> 22                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> Künstliche Sequenz         |    |
| <220>                            |    |
| <223> Primer                     |    |
| <400> 5                          |    |
| AAGGTGAAGG TCGGAGTCAA CG         | 22 |
| <210> 6                          |    |
| <211> 24                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> Künstliche Sequenz         |    |
| <220>                            |    |
| <223> Primer                     |    |
| <400> 6                          |    |
| GGCAGAGATG ATGACCCTTT TGGC       | 24 |
| <210> 7                          |    |
| <211> 26                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> Künstliche Sequenz         |    |
| <220>                            |    |
| <223> Primer                     |    |

<400> 7  
GGAATGACC CTATCTTGA CAGCAC 26

<210> 8  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 8  
AGAGGCGCCT GGGCAATGTT AGATA 25

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 9  
GGATATCTGC AGAATTCGGC T 21

<210> 10  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 10  
CAGTGTGCTG GAATTCGGC 19

<210> 11  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 11  
 CAGTCTGCTG TATCTAACAT TGCCCA 26

<210> 12  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 12  
 TTTGTTCAIA GCCAAAGTGT AAGGGTTT 28

<210> 13  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 13  
 GGTGACACTA TAGAAGGTAC GC 22

<210> 14  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 14  
 CACTTTCGCT CCTCCTCATF TCTGCCT 27

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 15

CCTGCAGGTA CCGGTCCGGA

20

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 16

CIGAATATTA CCGTTTGCTG TGTAACCT

28

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 17

GACATTTTCA CCTGTACTTT CAAGCT

26

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 18

GTTCCAGAGG AAATTCTACT GAAGCA

27

<210> 19

<211> 549

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(549)

<223> cDNA-Fragment

&lt;400&gt; 19

```

accaggttac acagcaaacy gtaatattca gatgaatgct ccaaggaat cagtaggcag 60
aatgaggag gagcgaagt ggggtttag cagagtcagc tcaggaggct ccttttcagt 120
gctgggagtt ccagctggcc cccaccctga tgtgtttcca ccatgcaaaa ttattgacct 180
ggaagctgta aaagtagaag aggaattgac cctatcttgg acagcacctg gagaagactt 240
tgatcagggc caggctacaa gctatgaaat aagaatgagt aaaagtctac agaatatcca 300
agatgacttt aacaatgcta ttttagtaaa tacatcaaag cgaaatcctc agcaagctgg 360
catcaggag atatttacgt tctcaccoca aatttccacg aatggacctg aacatcagcc 420
aatggagaa acacatgaaa gccacagaat ttatggtgca atacgagcaa tggataggaa 480
ctcottaacag tctgctgtat ctaacattgc ccaggcgcct ctgtttatcc cccccaattc 540
tgatcctgt

```

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 20

GATTACATCC CATGCACTTC TGAGGCT 27

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 21

GGTGCTTCTT GGTTGTGGGT ACTTGCA 27

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 22

GGGCTGCAGA ATGGATTCT AAATCT 26

<210> 23  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 23

TGAGCCTGCT GCATACATTG TGTCAGGT

28

<210> 24  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 24

CCTTGCAAGT TCAGGAAGAA ACCATCT

27

<210> 25  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 25

GTTATCATTG AGTAGGAAAT TAGGTGTGA

29

<210> 26  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 26

GCACATGGAG ATGATCCATA CACCCTA

27

<210> 27  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 27

GATTACATCC CATGCACTTC TGAGGCT

27

<210> 28  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 28

GCACCCAAAA TGCAACTGCA TCAATAATGT

30

<210> 29  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 29

CAAAGAACTT TAAACCTCCT GTAAGACGT

29

<210> 30  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 30

GTGATGATAT TAGTGACCAG CGGAGA

26

<210> 31  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 31

CTGAGTTGGA GGCACGAGAG GTCA

24

<210> 32  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 32

GGAACAGCTA AGCCTGGGCA CTGGACT

27

<210> 33  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 33

CACTTTCGCT CCTCCTCATT TCTGCCT

27

<210> 34  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 34

GGTTACACAG CAAACGGTAA TATTCAGA

28

<210> 35  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 35

GGATCAGAAT TGGGGGAAT AACAGA

27

<210> 36  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 36

CAGTCTGCTG TATCTAACAT TGCCCA

26

<210> 37  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 37

TTTGTCATA GCCAAAGTGT AAGGGTTT

26

<210> 38  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Primer

<400> 38

GGTAGATCAA CAAATCTTT TTGGGGT

28

<210> 39  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Primer

<400> 39

GGGGCTATAA CTATCATTCC ATAATAAC

28

<210> 40  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Lys Leu Phe Lys Glu Gly Cys Thr Phe  
 1 5

<210> 41  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Phe Lys Glu Gly Cys Thr Phe Ile Tyr  
 1 5

<210> 42  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Phe Met Gln Ser Leu Ser Ser Val Val  
 1 5

<210> 43  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Asn Leu Gln Asn Gln Met Cys Ser Leu  
 1 5

<210> 44  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Asp Val Ile Thr Asp Ser Ala Asp Phe  
 1 5

<210> 45  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Thr Glu Leu Pro Pro Pro Pro Thr Phe  
 1 5

<210> 46  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Leu Pro Pro Pro Pro Thr Phe Ser Leu  
 1 5

<210> 47  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Ser Leu Val Gln Ala Gly Asp Lys Val  
 1 5

<210> 48  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Cys Leu Val Leu Asp Val Ser Ser Lys  
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Lys Met Ala Glu Ala Asp Arg Leu Leu  
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Asp Arg Leu Leu Gln Leu Gln Gln Ala  
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Leu Gln Gln Ala Ala Glu Phe Tyr  
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Leu Gln Gln Ala Ala Glu Phe Tyr Leu  
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Ile Val Glu Ile His Thr Phe Val  
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ser Lys Gly Glu Ile Arg Ala Gln Leu  
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Asp Asp Arg Lys Leu Leu Val Ser Tyr  
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Arg Lys Leu Leu Val Ser Tyr Leu  
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Lys Leu Leu Val Ser Tyr Leu Pro Thr  
1 5

<210> 58  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58

Tyr Leu Pro Thr Thr Val Ser Ala Lys  
1 5

<210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 59

Glu Val Val Glu Lys Leu Asn Gly Lys  
1 5

<210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Glu Lys Leu Asn Gly Lys Ala Tyr  
1 5

<210> 61  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 61

Ile Leu Val Thr Ser Gly Asp Asp Lys  
1 5

<210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

Leu Leu Gly Asn Cys Leu Pro Thr Val  
1 5

<210> 63  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 63

Glu Leu Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu  
1 5

<210> 64  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 64

Asp Ile Phe Gln Gln His Ile Gln Leu  
1 5

<210> 65  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 65

Gln Leu Glu Ser Thr Gly Glu Asn Val  
1 5

<210> 66  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 66

Asn Val Lys Pro His His Gln Leu Lys  
1 5

<210> 67  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 67

Ile Leu Phe Asp Pro Asp Gly Arg Lys  
1 5

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 68

Leu Phe Asp Pro Asp Gly Arg Lys Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 69

Ser Leu Trp Ile Pro Gly Thr Ala Lys  
1 5

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 70

Lys Pro Gly His Trp Thr Tyr Thr Leu  
1 5

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 71

Ser Leu Gln Ala Leu Lys Val Thr Val  
1 5

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 72

Glu Ala Phe Val Gly Arg Asp Ser Leu  
1 5

<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 73

Phe Val Gly Arg Asp Ser Leu His Phe  
1 5

<210> 74  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 74

Thr Gly Asp Pro Val Thr Leu Arg Leu  
1 5

<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 75

Lys Asn Asp Gly Ile Tyr Ser Arg Tyr  
1 5

<210> 76  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 76

Gly Arg Tyr Ser Leu Lys Val His Val  
1 5

<210> 77  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 77

Gln Met Asn Ala Pro Arg Lys Ser Val  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 78

Asn Glu Glu Glu Arg Lys Trp Gly Phe  
1 5

<210> 79  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 79

Phe Pro Pro Cys Lys Ile Ile Asp Leu  
1 5

<210> 80  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 80

Phe Asp Gln Gly Gln Ala Thr Ser Tyr  
1 5

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ser Leu Gln Asn Ile Gln Asp Asp Phe  
1 5

<210> 82  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 82

Asn Gly Glu Thr His Glu Ser His Arg  
1 5

<210> 83  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 83

Ile Arg Ala Met Asp Arg Asn Ser Leu  
1 5

<210> 84  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 84

Asn Ser Asp Pro Val Pro Ala Arg Asp  
1 5

<210> 85  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 85

Ser Asp Pro Val Pro Ala Arg Asp Tyr  
1 5

<210> 86  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 86

Asp Pro Val Pro Ala Arg Asp Tyr Leu  
1 5

<210> 87  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 87

Val Pro Ala Arg Asp Tyr Leu Ile Leu  
1 5

<210> 88  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Gly Leu Ile Gly Ile Ile Cys Leu  
1 5

<210> 89  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 89

Asp Lys Lys Glu Asn Gly Thr Lys Leu  
1 5

<210> 90  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Met Gln Ser Leu Ser Ser Val Val  
1 5

<210> 91  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 91

Asn Leu Gln Asn Gln Met Cys Ser Leu  
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ser Leu Val Gln Ala Gly Asp Lys Val  
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Lys Met Ala Glu Ala Asp Arg Leu Leu  
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Leu Gln Gln Ala Ala Glu Phe Tyr Leu  
1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Gln Ile Val Glu Ile His Thr Phe Val  
1 5

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Lys Leu Leu Val Ser Tyr Leu Pro Thr  
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Leu Leu Gly Asn Cys Leu Pro Thr Val  
1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Glu Leu Ser Arg Leu Thr Gly Gly Leu  
1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Gln Leu Glu Ser Thr Gly Glu Asn Val  
1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Ser Leu Gln Ala Leu Lys Val Thr Val  
1 5

```
<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

Gln Met Asn Ala Pro Arg Lys Ser Val
 1                               5
```

```
<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102

Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val
 1                               5
```

```
<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
 1                               5
```

#### 【図面の簡単な説明】

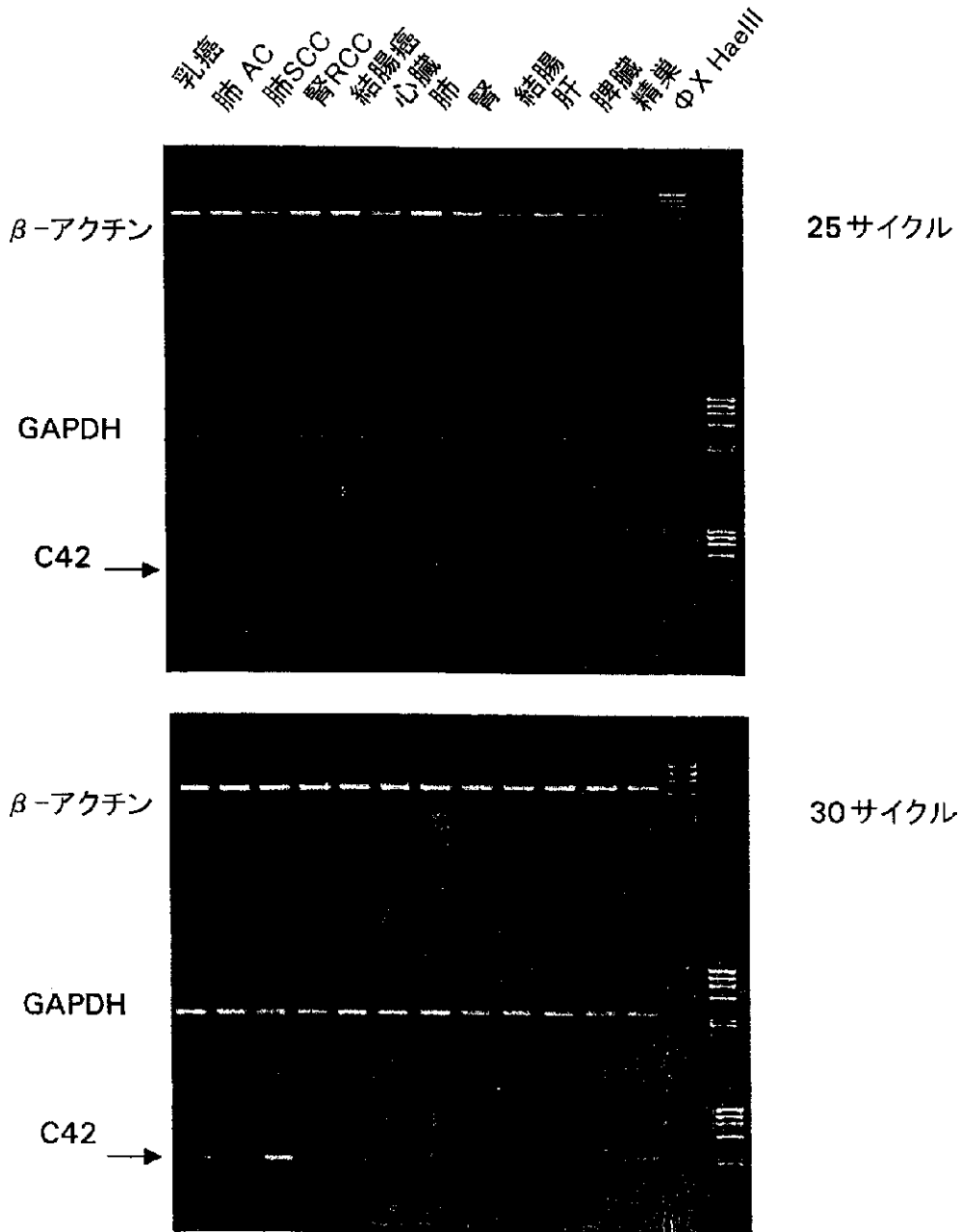
【図1】 腫瘍組織及び正常組織におけるC42のトランスフェクション：様々な組織由来のRNAの半-定量的RT-PCR。

【図2】 腫瘍組織及び正常組織のC42のノーザンプロット分析。

【図3】 5種の選択されたC42 CTLペプチドのHLA-A\*0201への結合アッセイ。

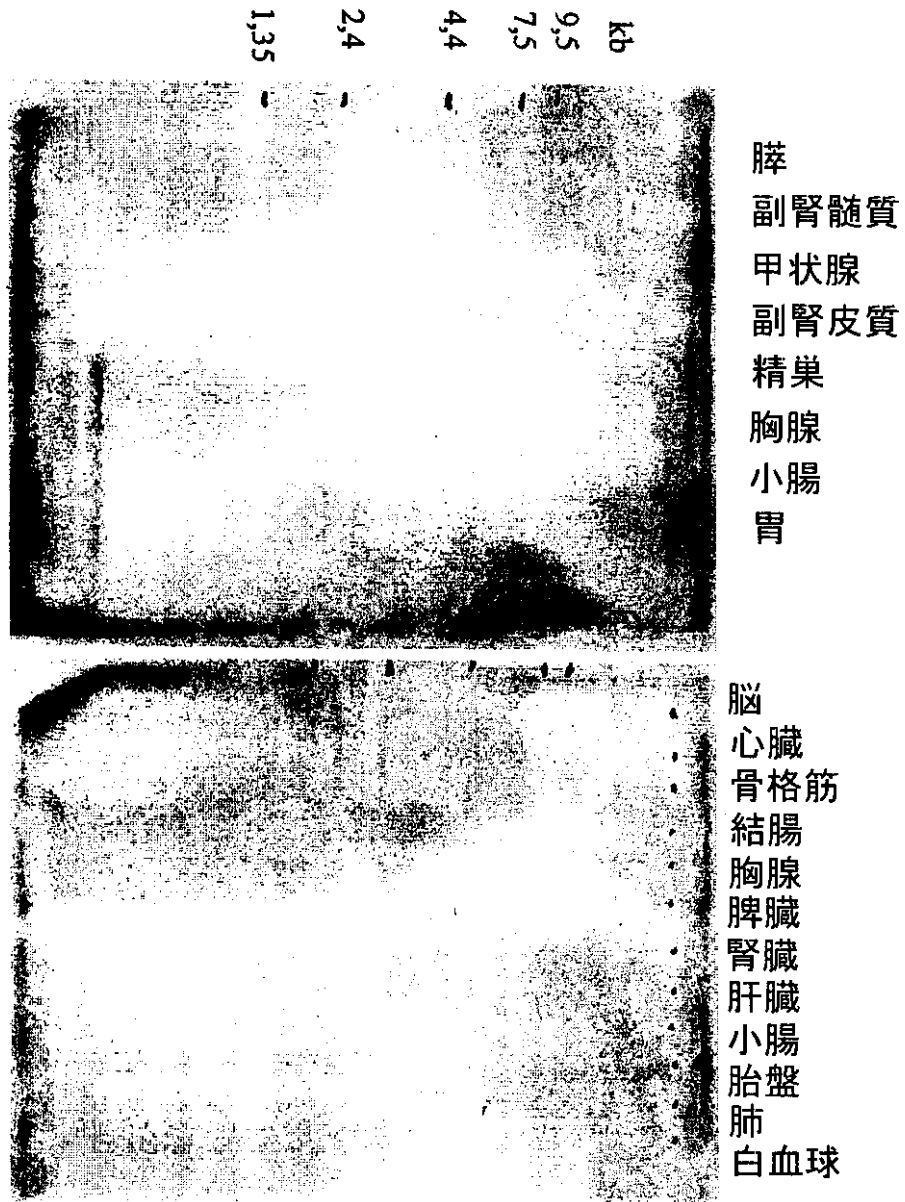
【図1】

Fig.1



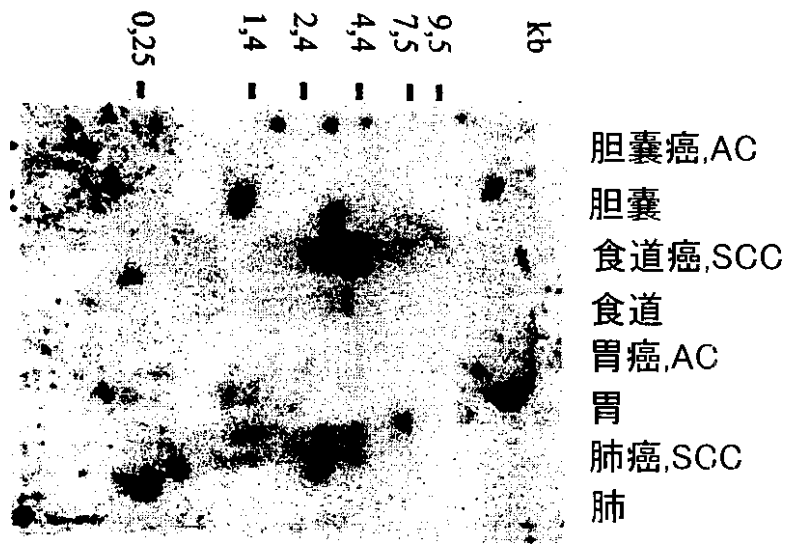
【圖2A】

Fig. 2A



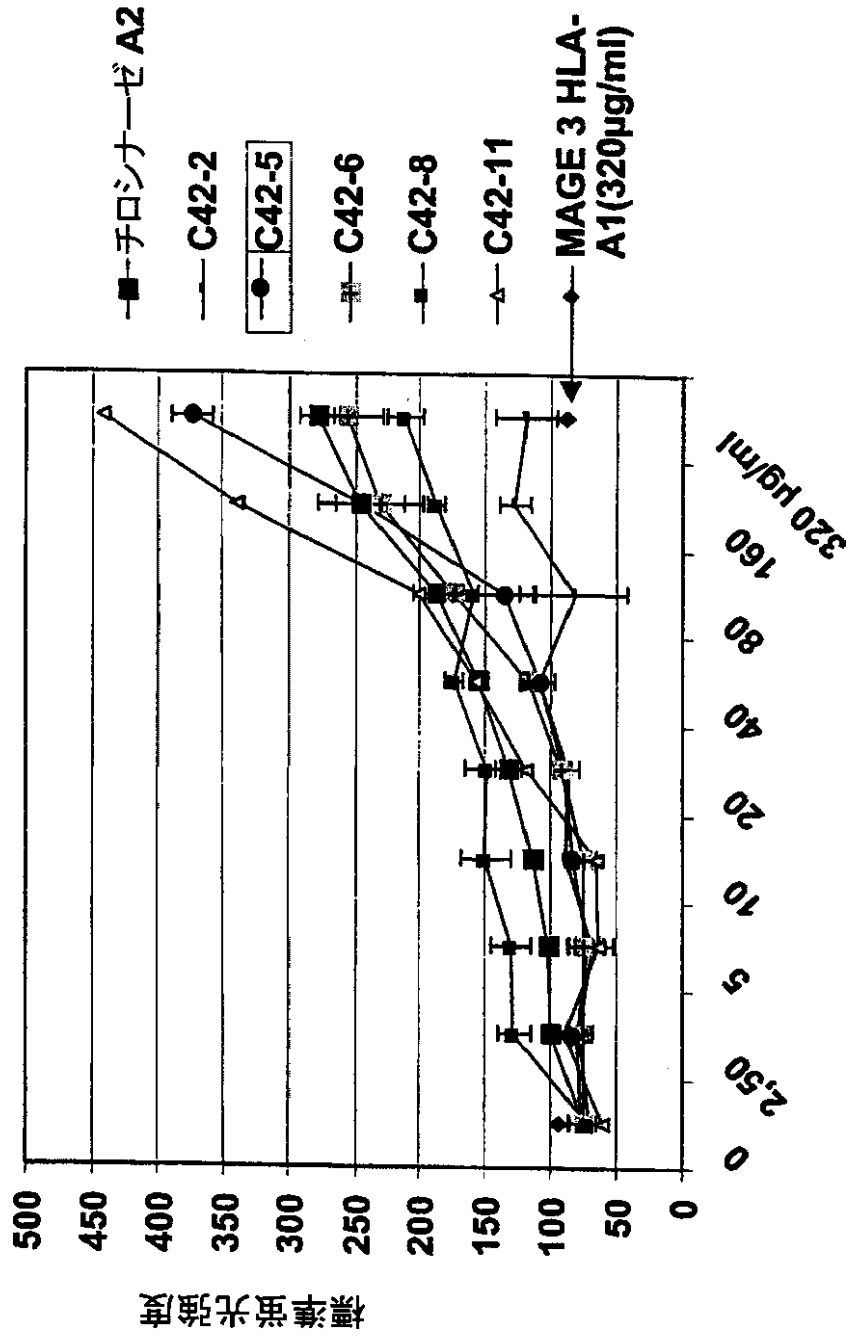
【图2B】

Fig. 2B



【図3】

Fig. 3



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|  |
|--|
| International Application No.<br>PCT/EP 00/04533 |
|--|

|  |  |   |  |  |
|--|--|---|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |  |   |  |  |
| IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/30 A61K39/00  |  |   |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |   |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |  |   |  |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 C12N C07K A61K  |  |   |  |  |
| 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)<br><b>STRAND</b>  |  |   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |   |  |  |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |  |  |
| X  | AGNEL, M. ET AL.: "Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea."<br>FEBS LETTERS,<br>vol. 455, 26 March 1999 (1999-03-26),<br>pages 295-301, XP002147086<br>the whole document<br>---<br>-/--   | 1,4,6,<br>12-16,<br>18,19   |  |  |
| <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 :  |  |   |  |  |
| <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="vertical-align: top;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table> |  |   | <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |
| <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>   | <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |   |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>11 September 2000</b>  |  | Date of mailing of the international search report<br><b>26/09/2000</b> |  |  |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentian 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |  | Authorized officer<br><b>Smalt, R</b>                                   |  |  |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 00/04533

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| P, X   | ITOH, R. ET AL.: "Isolation of Ca-activated chloride channel from human corneal epithelium and expression patterns of chloride channels in human cornea." INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, vol. 41, no. 4 (Suppl.), 15 March 2000 (2000-03-15), pages 5032-Abstr.5946, XP000939361<br>Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, Florida, USA April 30-May 05, 2000<br>the whole document | 2-4, 6, 12-16         |
| X  | -& DATABASE EMBL - EMHUM1 'Online!<br>Entry/acc.no. AB026833,<br>26 May 1999 (1999-05-26)<br>ITOH, R. ET AL.: "Homo sapiens mRNA for chloride channel protein, complete cds."<br>XP002147087   |                       |
| A  | the whole document   | 7                     |
| P, X   | WO 99 47674 A (CORIXA CORP)<br>23 September 1999 (1999-09-23)  | 2-4, 6-8, 12-20       |
| P, Y   | see seq.ID's 160 and 161 and the claims page 44, line 22 -page 45, line 2  | 5                     |
| Y  | RAMMENSEE H -G ET AL: "MHC LIGANDS AND PEPTIDE MOTIFS: FIRST LISTING" IMMUNOGENETICS, DE, SPRINGER VERLAG, BERLIN, vol. 41, no. 4, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 178-228, XP000673045<br>ISSN: 0093-7711<br>cited in the application<br>the whole document   | 5                     |
| P, X   | WO 00 12711 A (INCYTE PHARMA INC ;AZIMZAI YALDA (US); CORLEY NEIL C (US); REDDY R)<br>9 March 2000 (2000-03-09)<br>see seq.ID's 9 and 27.<br>page 67   | 2-4, 6, 8, 12-16      |
| P, X   | GRUBER, A.D. ET AL.: "Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 276, no. 6, 1 June 1999 (1999-06-01), pages C1261-C1270, XP000939159<br>the whole document  | 1-4, 6, 12-16         |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/04533

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9947674 A                           | 23-09-1999       | AU 3094999 A            | 11-10-1999       |
| WO 0012711 A                           | 09-03-2000       | AU 6137699 A            | 21-03-2000       |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号   | F I     | テ-マ-コ-ト' (参考) |         |
|--------------------------|--|---------|---------------|---------|
| C 0 7 K                  | 14/47  | C 0 7 K | 16/30         |         |
|                          | 16/30  | G 0 1 N | 33/48         | M       |
| G 0 1 N                  | 33/48  |         | 33/53         | D       |
|                          | 33/53  | C 1 2 P | 21/08         |         |
| // C 1 2 P               | 21/08  | C 1 2 N | 15/00         | Z N A A |
| (81)指定国                  | E P ( A T , B E , C H , C Y ,<br>D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I<br>T , L U , M C , N L , P T , S E ) , E A ( A M , A Z<br>, B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M ) , A E<br>, A U , B G , B R , C A , C N , C Z , E E , H U ,<br>I D , I L , I N , J P , K R , L T , L V , M X , N<br>O , N Z , P L , R O , S G , S I , S K , T R , U A<br>, U S , U Z , V N , Y U , Z A |         |               |         |
| (72)発明者                  | ハイダー カール ハイנטツ<br>オーストリア アー2000 シュトツケラウ<br>ヨハン シュトラウス プロムナーデ<br>4 - 11   |         |               |         |
| (72)発明者                  | ケーニツヒ ウルリツヒ<br>オーストリア アー1180 ウィーン ホー<br>ケガッセ 17 - 17   |         |               |         |
| (72)発明者                  | ゾメルゲルベル ウォルフガンク<br>オーストリア アー3002 ブルケルスドル<br>フ リンツァーシュトラッセ 19 ハウス<br>4  |         |               |         |
| F タ-ム(参考)                | 2G045 AA24 AA25 DA78 FB03<br>4B024 AA01 BA36 CA04 DA02 GA11<br>HA17<br>4B064 AG27 AG31 CA10 DA05<br>4C085 AA03 AA04 AA14 AA19 BB01<br>CC02 DD62<br>4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA41<br>DA50 DA75 DA76 DA86 EA22<br>EA31 FA74   |         |               |         |

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 肿瘤相关抗原 ( C42 )   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2003501025A</a>  | 公开(公告)日 | 2003-01-14 |
| 申请号            | JP2001500751   | 申请日     | 2000-05-19 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 百灵佳殷格翰国际股份有限公司   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 勃林格殷格翰国际法理社会手套Beshurenkuteru有限公司   |         |            |
| [标]发明人         | アドルフギュンター<br>ハイダーカールハインツ<br>ケーニツヒウルリッヒ<br>ゾメルグルベルウォルフガンク   |         |            |
| 发明人            | アドルフ ギュンター<br>ハイダー カール ハインツ<br>ケーニツヒ ウルリッヒ<br>ゾメルグルベル ウォルフガンク  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/48 A61K39/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/47 C07K16/30 C12N15/09<br>C12N15/12 C12P21/08 G01N33/53  |         |            |
| CPC分类号         | A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/5152 A61K2039/5158 A61K2039/53 A61P35/00 A61P37/00<br>C07K14/4748  |         |            |
| FI分类号          | A61K39/00.H A61K39/395.T A61P35/00 A61P37/00 C07K14/47 C07K16/30 G01N33/48.M G01N33/53.<br>D C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A   |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/DA78 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA36 4B024/CA04 4B024<br>/DA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/DA05 4C085/AA03<br>4C085/AA04 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB01 4C085/CC02 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045<br>/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86<br>4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/FA74 |         |            |
| 优先权            | 19924199 1999-05-27 DE   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

肿瘤相关抗原，由其衍生的免疫原性肽和编码它们的DNA分子，及其在癌症的免疫治疗中的用途。

