

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] （参考）
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/00	H 4 B 0 2 4
39/00		39/39	4 B 0 6 3
39/39		45/00	4 B 0 6 4
45/00		48/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求（全 86数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000－608741(P2000－608741)	(71)出願人	スミスクライン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
(86)(22)出願日	平成12年3月20日(2000.3.20)		ベルギー国 リキセンザール ビー 1330
(85)翻訳文提出日	平成13年9月25日(2001.9.25)		ルー デ ランスティテュート 89
(86)国際出願番号	PCT/EP00/02478	(72)発明者	ブルック，クラウディン，エルヴァイア，マリー
(87)国際公開番号	W000/58460		ベルギー国 リキセンザール ビー1330
(87)国際公開日	平成12年10月5日(2000.10.5)		,ルー デ ランスティテュート 89,スミ
(31)優先権主張番号	9907113.6		スクライン ビーチャム バイオロジカルズ
(32)優先日	平成11年3月26日(1999.3.26)		ソシエテ アノニム
(33)優先権主張国	イギリス(GB)	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 （外2名）
(31)優先権主張番号	9922858.7		
(32)優先日	平成11年9月25日(1999.9.25)		
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 新規化合物

(57)【要約】

CASB619ポリペプチドおよびポリヌクレオチド、ならびに組換え技術によりこのようなポリペプチドを製造する方法が開示される。また、CASB619ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを診断に利用する方法、さらに癌（特に卵巣癌および大腸癌）、自己免疫疾患、および関連病態の予防的ならびに治療的処置のためのワクチンも開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項2】 アミノ酸配列が配列番号2に対して少なくとも95%の同一性を有するものである、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 配列番号2の単離されたポリペプチド。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫原性断片を含んでなるポリペプチドであって、該免疫原性断片の免疫原活性が配列番号2のポリペプチドのものと実質的に同一である、上記ポリペプチド。

【請求項6】 ポリペプチドがより大きな融合タンパク質の一部である、請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項7】 担体タンパク質に化学的に結合された、請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項8】 請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項9】 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、または単離された該ポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項10】 コード領域全体にわたって配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、または単離された該ポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項11】 配列番号1の全長にわたって配列番号1のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単

離されたポリヌクレオチド、または単離された該ポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 前記同一性が少なくとも95%である、請求項8～11のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項13】 以下の(a)～(c)から選択される単離されたポリヌクレオチド：

(a) 配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1のポリヌクレオチド；および

(c) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1の配列もしくはその断片を有する標識プローブを用いて適当なライブラリーをスクリーニングすることによって得られるポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが配列番号2のタンパク質に類似した免疫原特性を有するタンパク質をコードしている該ポリヌクレオチド；

または単離された該ポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列。

【請求項14】 請求項8～13のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、発現ベクターまたは組換え生存微生物。

【請求項15】 請求項14に記載の発現ベクターまたは請求項8～13のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項16】 請求項15に記載の宿主細胞を、請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドを産生させるのに十分な条件下で培養し、その培養培地から該ポリペプチドを回収することを含む、前記ポリペプチドの製造方法。

【請求項17】 有効量の請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドおよび製薬上許容される担体を含むワクチン。

【請求項18】 有効量の請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドおよび製薬上許容される担体を含むワクチン。

【請求項19】 請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドをin vitroで加えることにより改変したか、または請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現するようにin vitroで遺伝的に改変した、有効量の抗原提

示細胞、および製薬上許容される担体を含むワクチン。

【請求項20】 TH-1誘導アジュバントをさらに含む、請求項17～19のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項21】 TH-1誘導アジュバントが、3D-MPL、QS21、QS21とコレステロールの混合物、およびCpGオリゴヌクレオチドを含むアジュバントの群から選択される、請求項20に記載のワクチン。

【請求項22】 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは免疫原性断片に対して免疫特異的な抗体。

【請求項23】 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドの機能を刺激または抑制する化合物を同定するためのスクリーニング法であって、

(a) 候補化合物と、上記ポリペプチド（または該ポリペプチドを担持している細胞もしくはその膜）またはその融合タンパク質との結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合させた標識により測定すること、

(b) 候補化合物と、上記ポリペプチド（または該ポリペプチドを担持している細胞もしくはその膜）またはその融合タンパク質と、の結合を、標識競合物質の存在下で測定すること、

(c) 候補化合物が上記ポリペプチドの活性化または抑制により生ずるシグナルをもたらすか否かを、該ポリペプチドを担持している細胞または細胞膜に適した検出系を用いて調べること、

(d) 候補化合物と、請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドを含有する溶液とを一緒にして混合物を調製し、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定して、該混合物の活性をスタンダードと比較すること、または

(e) 候補化合物が細胞における上記ポリペプチドをコードするmRNAおよび該ポリペプチドの産生に及ぼす効果を例えばELISAアッセイを用いて検出すること、
よりなる群から選択される方法を含んでなるスクリーニング法。

【請求項24】 請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを哺乳動物の免疫系に由来する細胞と共にin vitroでインキュベートすることにより、請求項1～5の

いずれか1項に記載の分子に対する免疫応答をin vitroで誘導すること、およびそれらの活性化免疫細胞を疾病の治療のために該哺乳動物に再注入することを含む、免疫学的予防または治療による被験体の処置方法。

【請求項25】 前記処置が卵巣癌または大腸癌に対するものである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項27】 治療上使用するための、以下の(a)～(c)のいずれかである化合物：

(a) 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニスト；

(b) 請求項8～13のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド；または

(c) 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現をモジュレートする核酸分子。

【請求項28】 被験体から得られたサンプル中の請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドの存在または量を分析することを含む、該被験体における該ポリペプチドの発現または活性に関連した該被験体の疾病または該疾病への罹りやすさを診断する方法。

【請求項29】 被験体から得られたサンプル中の請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの存在または量を分析することを含む、該被験体における該ポリヌクレオチドの発現または活性に関連した該被験体の疾病または該疾病への罹りやすさを診断する方法。

【請求項30】 被験体から得られたサンプル中の請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドの存在または量を分析することを含む、該被験体における該ポリペプチドの発現または活性に関連した該被験体の大腸癌の存在または大腸癌への罹りやすさを診断する方法。

【請求項31】 被験体から得られたサンプル中の請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの存在または量を分析することを含む、該被験

体における該ポリヌクレオチドの発現または活性に関連した該被験体の大腸癌の存在または大腸癌への罹りやすさを診断する方法。

【請求項32】 以下の(a)～(c)からなる群から選択される単離されたポリヌクレオチド：

(a) 配列番号3の全長にわたって配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(b) 配列番号3のポリヌクレオチドを含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(c) 配列番号3のポリヌクレオチド。

【請求項33】 請求項14に記載の発現ベクターまたは組換え生存微生物を含む生ワクチン組成物。

【請求項34】 癌腫の治療における医薬を製造するための請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項35】 大腸癌の治療における医薬を製造するための請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項36】 癌腫の治療における医薬を製造するための請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項37】 大腸癌の治療における医薬を製造するための請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、本明細書中でCASB619ポリヌクレオチドと呼ぶポリヌクレオチド、それによりコードされるポリペプチド(本明細書中でCASB619ポリペプチドと呼ぶ)、組換え物質、ならびにその生産方法に関する。別の態様において、本発明は、癌、特に大腸癌、および自己免疫疾患ならびに他の関連病態の治療をはじめとする、前記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関する。更なる態様では、本発明は、本発明により提供される物質を用いてアゴニストおよびアンタゴニスト／インヒビターを同定する方法、ならびに同定された化合物を用いてCASB619平衡異常と関連した症状を治療することに関する。さらに他の態様において、本発明は不適當なCASB619ポリペプチド活性またはCASB619ポリペプチドレベルと関連した疾病を検出するための診断アッセイに関する。

【0002】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、腫瘍に対する特定の予防または治療のための免疫用の重要な免疫原であると考えられている。何故なら、前記ポリヌクレオチドおよび前記ポリペプチドは、正常細胞と比較して腫瘍において特異的に発現されるかまたはかなり過剰に発現され、抗原特異的免疫機構の標的となって前記腫瘍細胞の破壊をもたらさうからである。また、それらを使用して腫瘍細胞の発生を診断することもできる。さらに、特定の環境における不適切な発現により、自己免疫性の不適切な免疫応答の誘導を引き起こし得るが、該応答は前記同様のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを用いる適切なワクチン接種により矯正することができる。この点において、本発明の目的として最も重要な生物学的活性は、本発明のポリペプチドの抗原性活性および免疫原性活性である。また、本発明のポリペプチドは、CASB619ポリペプチドの少なくとも1つの他の生物学的活性を示すものであってもよく、該活性により本発明のポリペプチドを免疫応答に関連したものとは異なる治療的または予防的介入の標的とみなすことができる。

【0003】

最初の態様において、本発明はCASB619ポリペプチドに関する。この種のペプ

チドには、配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97～99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドには配列番号2のアミノ酸を含んでなるポリペプチドが含まれる。

【0004】

本発明の他のペプチドには、そのアミノ酸配列が配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97～99%の同一性を有する単離されたポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドとしては配列番号2のポリペプチドがある。

【0005】

本発明の更なるペプチドには、配列番号1に含まれる配列を含んでなるポリヌクレオチドによりコードされる単離されたポリペプチドが含まれる。

【0006】

また本発明は、CASB619ポリペプチドの免疫原性断片、すなわち配列番号2のアミノ酸配列を含むCASB619ポリペプチドと同様のまたは類似した免疫原特性を有する前記ポリペプチドの連続した部分、を提供する。すなわち、前記断片(必要であれば、担体に結合されている)は、CASB619ポリペプチドを認識する免疫応答を引き出すことができる。こうした免疫原性断片には、例えば、N末端のリーダー配列、膜貫通ドメインまたはC末端のアンカードメインを欠くCASB619ポリペプチドが含まれる。好ましい態様において、本発明のCASB619の免疫原性断片は、配列番号2の全長にわたって配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97～99%の同一性を有するポリペプチドの実質的に全ての細胞外ドメインを含む。

【0007】

CASB619のエピトープを含むペプチド断片は、典型的に、配列番号2に由来する少なくとも7個、好ましくは9または10個の連続したアミノ酸を含んでなる。好ましいエピトープを配列番号5～配列番号77に示している。

【0008】

これらのエピトープを含むペプチドは、本発明の好ましい態様である。また、これらのエピトープと同じ特性を有するミモトープ (mimotope) 、およびそのようなミモトープを含む免疫原であって、免疫応答を引き起こし、CASB619分子に関するエピトープと交差反応するものは、本発明の一部を構成するものである。

【0009】

したがって本発明は、それらのエピトープ自体およびそれらの任意のミモトープを包含する単離されたペプチドを含む。ミモトープの意味は、天然CASB619エピトープと十分に類似しているために、該天然分子を認識する抗体により認識され得るもの (Gheysen, H.M.ら, 1986, Synthetic peptides as antigens. Wiley, Chichester, Ciba foundation symposium 119, p130-149; Gheysen, H.M., 1986, Molecular Immunology, 23,7, 709-715) であるか、あるいは適切な担体に結合した場合に該天然分子と交差反応する抗体を生じさせ得るものとして、定義される。

【0010】

前記のエピトープのペプチドミモトープは、特定の目的のために、選択されたアミノ酸の付加、欠失または置換によって設計することができる。従って、本発明のペプチドは、タンパク質担体への結合を容易にするために改変しても良い。例えば、ある種の化学結合法では、エピトープの末端にシステインを含有させることが好ましい。更に、タンパク質担体に結合させたペプチドについては、該ペプチドの結合末端から遠い位置に疎水性末端を含有させて、該ペプチドの非結合遊離末端が担体タンパク質の表面に結合されないままにすることが好ましい。それにより該ペプチドのコンホメーション上の自由度が低減するため、完全な分子の場合にみられるようなペプチドコンホメーションと最も近似しているコンホメーションで該ペプチドが提示される可能性が高まる。例えば、該ペプチドは、N

末端システインおよびC末端疎水性アミド化テールを含有するように改変しうる。あるいは、1以上のアミノ酸のD-立体異性体の付加または置換を行うことにより、例えば該ペプチドの安定性を向上させるなど、有益な誘導体を作製しうる。そのような改変ペプチドまたはミモトープは、その構成残基が20種の天然アミノ酸に限定される必要はなく、全体としてもしくは部分的に非ペプチド性ミモトープであってもよいことは、当業者であれば理解できるであろう。さらにそれらは、当技術分野で公知の技術により環化して、該ペプチド配列が分子全体である場合の形状によく似たコンホメーションとすることができる。ペプチドを環化する好適な方法には、ジスルフィド架橋形成を生じうる一対のシステイン残基を付加することが含まれる。

【0011】

さらに、当業者であれば、本発明のミモトープまたは免疫原が上記のエピトープより大きいものであって本明細書に開示した配列を含むものでありうることは理解されるだろう。したがって、本発明のミモトープは、一方または両方の末端においていくつかのさらなる天然残基をNおよび／またはC末端伸長部に付加したものからなっているてもよい。該ペプチドミモトープはまた、天然配列の逆配列、すなわち配列の方向が逆であるものか、あるいは該配列が全体としてまたは少なくとも一部がD-立体異性体のアミノ酸で構成されている（インベルソ(inverso)配列)のものであってよい。また、該ペプチド配列は特徴として逆-インベルソ(retro-inverso)、すなわち配列の方向が逆でありかつアミノ酸がD-立体異性体であるものであってもよい。そのような逆ペプチドまたは逆-インベルソペプチドは非自己であるという利点を有し、それにより免疫系における自己免疫寛容の問題が克服されうる。

【0012】

あるいはペプチドミモトープは、本発明のエピトープに結合可能な抗体を用いて、ファージディスプレイ技法(EP 0 552 267 B1)等の技術によって同定することができる。この技術は、天然ペプチドの構造を模倣しておりそのため抗天然ペプチド抗体に結合可能であるペプチド配列を多数生成するが、それらの配列自体は天然ペプチドに対し有意に相同な配列を必ずしも共有していなくてもよい。

この方法は増強された免疫原特性を有するペプチドを同定することができるようにすることにより大きな利点を有するものであり、すなわち天然ペプチド配列の使用に伴ういかなる潜在的な自己抗原免疫寛容の問題も克服することができる。さらに、この技術により、各天然ペプチドに対する認識パターンを、認識されたミモトープ配列の間で共有される化学的特性によって同定することができるようになる。

【0013】

免疫原性担体へのペプチドの共有結合は当技術分野で周知の方法で行うことができる。したがって、例えば直接的な共有結合には、一般的な市販されているヘテロ二機能性リンカー、例えばCDAPおよびSPDPを（製造業者の説明書に従って）利用して、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、またはN-[γ -マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステルを使用することができる。結合反応の後、免疫原は、透析法、ゲルろ過法、分画法等により容易に単離および精製することができる。

【0014】

本発明の免疫原に用いる担体の種類は、当業者であれば容易に認識できるであろう。担体の機能は、ペプチドに対する免疫反応を誘導させるようにサイトカインを促進することである。本発明で用いられうる担体を非網羅的に列挙すると、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)等の血清アルブミン、破傷風毒素もしくはジフテリア毒素(TTおよびDT)等の不活性化細菌性毒素、またはそれらの組換え断片（例えば、TTのフラグメントCのドメイン1、もしくはDTの転座ドメイン）、あるいはツベルクリンの精製タンパク質誘導体(PPD)が挙げられる。あるいは、ミモトープまたはエピトープは、T細胞を促進する免疫原をさらに含むリポソーム担体に直接結合させてもよい。好ましくはミモトープと担体の割合は1:1~20:1であり、好ましくは各担体が3~15個のペプチドを保持すべきである。

【0015】

本発明の実施形態において、好適な担体はインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)由来のプロテインD (EP 0 594 610 B1) である。プロテインDは、イン

フルエンザ菌由来のIgD結合タンパク質であり、Forsgrenに特許が与えられている（WO 91/18926、特許付与番号EP 0 594 610 B1）。ある種の状況では、例えば組換え免疫原発現系においては、プロテインDの断片、例えばプロテインDの1/3（プロテインDのN末端の100～110個のアミノ酸を含むもの（GB 9717953.5））を用いることが望ましい。

【0016】

本発明のペプチドを提示するための別の好適な方法は、組換え融合分子に関連するものである。例えば、EP 0 421 635 Bは、ウイルス様粒子において外来ペプチド配列を提示するためのキメラヘパドナウイルスコア抗原粒子の使用について記載している。同様に本発明の免疫原は、B型肝炎コア抗原からなるキメラ粒子において提示されるペプチドを含んでもよい。さらに、組換え融合タンパク質は本発明のミモトープと担体タンパク質（例えばインフルエンザウイルスのNS1等）を含むものでありうる。本発明の一部を構成する組換え法により発現された任意のタンパク質に関して、前記免疫原をコードしている核酸もまた本発明の一態様を構成する。

【0017】

本発明において用いられるペプチドは、当技術分野で周知の固相法により容易に合成できる。適切な合成は、「T-boc」法または「F-moc」法を用いることにより行うことができる。環状ペプチドは、よく知られた「F-moc」法およびポリアミド樹脂を用い、完全に自動化した装置にて、固相法で合成することができる。あるいは、当業者であればその過程を手作業で行うために必要な実験室的手法を認知しているであろう。固相合成のための技術および手法は、E. AthertonおよびR.C. Sheppardによる「固相ペプチド合成：実用的方法（Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach）」（IRL(Oxford University Press)発行(1989)）に記載されている。あるいはペプチドは、細菌株または哺乳動物細胞系においてミモトープをコードする核酸分子を発現させ、その後発現されたミモトープを精製することを含む、組換え法により生成することができる。ペプチドおよびタンパク質の組換え発現のための技術は当技術分野で公知であり、Maniatis, T., Fritsch, E.F.およびSambrookらのMolecular cloning, a laboratory manual

1、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)に記載されている。

【0018】

本発明のポリペプチドまたは免疫原性断片は「成熟」タンパク質の形であっても、前駆体または融合タンパク質のような、より大きいタンパク質の一部であってもよい。しばしば、追加のアミノ酸配列を含めることが有利であり、このようなアミノ酸配列としては、分泌すなわちリーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、または組換え体生産の間の安定性を確保する付加的配列などがある。さらに、外来ポリペプチドまたは脂質テイル(lipid tail)またはポリヌクレオチド配列の追加により最終的な分子の免疫原としての可能性を高めることも考慮される。

【0019】

1つの態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、各種サブクラス (IgG、IgM、IgA、IgE) の免疫グロブリンのH鎖またはL鎖の定常領域の様々な部分と、を含んでなる遺伝子工学的に作製された可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとしてはヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部が好ましく、その場合は融合がヒンジ領域で起こる。特定例では、血液凝固因子Xaで開裂され得る開裂配列を組み込むことで、Fc部分を簡単に除去できる。さらに、本発明は、これら融合タンパク質の遺伝子工学的作製方法、ならびに薬物スクリーニング、診断および治療におけるそれらの使用に関する。また、本発明の更なる態様はこのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。融合タンパク質技術の例は国際特許出願 W094/29458 およびW094/22914に見いだせる。

【0020】

前記タンパク質を化学的に結合するかまたは組換え融合タンパク質として発現させることにより、発現系において該タンパク質が非融合タンパク質に比べて増大されたレベルで産生される。融合パートナーはTヘルパーエпитープ、好ましくはヒトにより認識されるTヘルパーエпитープの提供を助ける(免疫学的融合パートナー)か、または前記タンパク質の、元の組換えタンパク質より高い産生

量での発現を助ける(発現エンハンサー)ことができる。好ましくは、前記融合パートナーは免疫学的融合パートナーおよび発現エンハンサーパートナーの両方である。

【0021】

融合パートナーには、ヘモフィルス・インフルエンザB(*Haemophilus influenza B*)由来のプロテインDおよびインフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質NS1(赤血球凝集素)が含まれる。別の免疫学的融合パートナーはLYTAとして知られるタンパク質である。好ましくは、該分子のC末端部分を使用する。Lytaは、N-アセチル-L-アラニンアミダーゼであるアミダーゼLYTA(*lytA*遺伝子によりコードされる[Gene. 43(1986) page 265-272])、すなわちペプチドグリカン骨格内の特定の結合を特異的に分解する自己分解酵素を合成するストレプトコッカス・ニューモニア(*Streptococcus pneumoniae*)から得られる。前記LYTAタンパク質のC末端ドメインは、コリン、またはDEAE等の数種のコリン類似体に対する親和性に関与している。この性質を融合タンパク質の発現に有用な大腸菌(*E. coli*)C-LYTA発現プラスミドの開発に利用した。そのアミノ末端に前記C-LYTA断片を含有するハイブリッドタンパク質の精製については、Biotechnology:10. (1992) page 795-798に記載されている。前記Lyta分子のC末端に見出され、残基178から始まる反復部分(例えば残基188~305)を使用することができる。

【0022】

また、前記ポリペプチドの変異体、すなわち保存的アミノ酸置換(ある残基が性質の似ている他の残基により置換される)により基準ポリペプチドと相違しているポリペプチドも本発明に含まれる。典型的なこうした置換は、Ala, Val, Leu および Ileの間; Ser とThr の間; 酸性残基 AspとGlu の間; Asn とGln の間; 塩基性残基 LysとArg の間; または芳香族残基 PheとTyr の間で起こる。特に、数個、5~10個、1~5個、1~3個、1~2個または1個のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失または付加されている変異体が好適である。

【0023】

本発明のポリペプチドは任意の適当な方法で製造することができる。このようなポリペプチドには、単離された天然のポリペプチド、組換え的に生産されたポ

リペプチド、合成的に製造されたポリペプチド、またはこれらの方法の組合せにより製造されたポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドを製造するための手段は当業界でよく理解されている。

【0024】

更なる態様において、本発明は、CASB619ポリヌクレオチドに関する。このようなポリヌクレオチドには、配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドが含まれる。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリペプチドが一層好ましいが、少なくとも98~99%の同一性を有するものがより一層好ましく、少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドが最も好ましいものである。かかるポリヌクレオチドとして、配列番号2のポリペプチドをコードする配列番号1に含まれるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドが挙げられる。

【0025】

本発明の更なるポリヌクレオチドには、配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して、その全コード領域にわたって、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドが含まれる。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリヌクレオチドが一層好ましいが、少なくとも98~99%の同一性を有するものがより一層好ましく、少なくとも99%の同一性を有するポリヌクレオチドが最も好ましいものである。

【0026】

本発明の更なるポリヌクレオチドには、配列番号1の全長にわたって配列番号1のポリヌクレオチドに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離された

ポリヌクレオチドが含まれる。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリヌクレオチドが一層好ましいが、少なくとも98~99%の同一性を有するものがより一層好ましく、少なくとも99%の同一性を有するポリヌクレオチドが最も好ましいものである。かかるポリヌクレオチドとして、配列番号1のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドおよび配列番号1のポリヌクレオチドが挙げられる。前記ポリヌクレオチドを適当なプラスミドまたは組換え微生物ベクターに挿入して免疫に用いることができる(例えば、Wolffら、Science 247:1465-1468(1990); Corrら、J.Exp.Med. 184:1555-1560(1996); Doeら、Proc.Natl.Acad.Sci. 93:8578-8583(1996)を参照されたい)。また、本発明は前記の全てのポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも提供する。

【0027】

また本発明は、被験体に投与された際に配列番号1のポリヌクレオチドと同様の免疫原特性を有する、CASB619ポリヌクレオチドの断片も提供する。

【0028】

また本発明は、前記で定義したCASB619ポリペプチドの免疫学的断片をコードするポリヌクレオチドも提供する。

【0029】

配列番号1のヌクレオチド配列はヒト(Homo sapiens)1番染色体クローンRP4-641D22マップp13.1-13.3(アクセッション番号 AL157901)との相同性を示す。配列番号1のヌクレオチド配列はcDNA配列であり、配列番号2のポリペプチドである1013個のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリペプチドコード配列(ヌクレオチド番号1~3043)を含む。配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1に含まれるポリペプチドコード配列と同一であっても、遺伝子コードの重複性(縮重)のため、やはり配列番号2のポリペプチドをコードする、配列番号1に含まれる配列以外の配列であってもよい。配列番号2のポリペプチドは、その他の既知タンパク質のいずれとも関連がない。

【0030】

本発明の好適なポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、とりわけ、それと相同なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと同様の生物学的機能/性質をもつこ

とが期待される。さらに、本発明の好ましいポリペプチド、免疫学的断片およびポリヌクレオチドは配列番号1または配列番号2のいずれかの少なくとも1つの適当な活性を有する。

【0031】

また、本発明は、配列番号1および配列番号2の対応する全長配列の決定に先立って最初に同定された部分的またはそれ以外の不完全なポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列に関する。

【0032】

したがって、更なる態様において、本発明は、

(a) 配列番号3の全長にわたって配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは97～99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、

(b) 配列番号3の全長にわたって配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは97～99%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド、

(c) 配列番号3のポリヌクレオチドである単離されたポリヌクレオチド、

(d) 配列番号4の全長にわたって配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97～99%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド、
ならびに配列番号3のポリヌクレオチド、を提供する。

【0033】

本発明は、さらに以下のポリペプチド：

(a) 配列番号4の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくと

も70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97～99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(b) 配列番号4の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97～99%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(c) 配列番号4のアミノ酸を含むポリペプチド、および

(d) 配列番号4のポリペプチドであるポリペプチド、

ならびに、配列番号3の配列に含まれる配列を含むポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、を提供する。

【0034】

配列番号3のヌクレオチド配列およびそれによりコードされるペプチド配列はエクспレスド・シーケンス・タグ (Expressed Sequence Tag: EST) 配列から誘導される。当業者であれば、EST配列中に若干のヌクレオチド配列読み取り誤差が必然的に存在することを理解するであろう (Adams, M.D.ら, Nature 377 (supp)3, 1995を参照のこと)。したがって、配列番号3のヌクレオチド配列およびそれによりコードされるペプチド配列は配列精度において同一の固有の限界を受けることがある。さらに、配列番号3によりコードされるペプチド配列は、最も相同性の高いまたは構造的に類似したタンパク質に対して、同一性もしくは高い相同性、および／または高い構造類似性 (例えば保存アミノ酸の相違) を有する領域を含むものである。

【0035】

本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニング技術により、ヒト大腸癌の細胞中のmRNAから誘導されたcDNAライブラリーから得ることができる (例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. Cold Spring harbor Laboratory Press. Cold Spring harbor, N.Y. (19

89)を参照されたい)。また、本発明のポリヌクレオチドはゲノムDNAライブラリーのような天然源から得ることができ、市販されている周知の技術を用いて合成することもできる。

【0036】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え体生産のために用いる場合、そのポリヌクレオチドには、成熟ポリペプチドのコード配列単独、または他のコード配列（例えば、リーダーまたは分泌配列、プレーまたはプローまたはプレプロタンパク質配列、もしくは他の融合ペプチド部分をコードする配列）と同じリーディングフレーム内にある成熟ポリペプチドのコード配列が含まれる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコードされ得る。本発明のこの態様の好ましい具体例として、マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)により提供されかつ Gentzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824に記載されるような、ヘキサ-ヒスチジンペプチド、またはHAタグである。また、このポリヌクレオチドは5'および3'非コード配列、例えば、転写されるが翻訳されない配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、およびmRNA安定化配列を含んでいてもよい。

【0037】

本発明の更なる具体例としては、数個、例えば5～10個、1～5個、1～3個、1～2個、または1個のアミノ酸残基が任意の組合せで置換、欠失または付加されている、配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドがある。

【0038】

配列番号1に含まれるヌクレオチド配列と同一であるか十分に同一であるポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする全長cDNAおよびゲノムクローンを単離するために、また、配列番号1に対して高い配列類似性を有する他の遺伝子（ヒト起源のパラログ体(paralog)ならびにヒト以外の種に由来するオルソログ体(ortholog)およびパラログ体をコードする遺伝子を含む）のcDNAおよびゲノムクローンを単離するために、cDNAおよびゲノムDNA用のハイブリダイゼーションプローブとして、または核酸増幅（PCR）反応用のプライマーとして用い

ることができる。一般的に、これらのヌクレオチド配列は基準のヌクレオチド配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%同一である。プローブまたはプライマーはたいてい15個以上のヌクレオチドを含み、好ましくは30個以上を含み、50個以上のヌクレオチドを有していてもよい。特に好ましいプローブは30～50個の範囲のヌクレオチドを有するものである。特に好ましいプライマーは20～25個の範囲のヌクレオチドを有するものである。特に、近縁な動物起源からの配列に由来するポリペプチドまたはポリヌクレオチドを免疫原として使用して、ヒトの遺伝子に対する交差反応性免疫応答を得ることができる。

【0039】

本発明のポリペプチド（ヒト以外の種に由来する相同体を含む）をコードするポリヌクレオチドは、配列番号1の配列またはその断片を有する標識プローブを用いて、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングし、該ポリヌクレオチド配列を含む全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する各工程を含んでなる方法により得られる。このようなハイブリダイゼーション技法は当業者に周知である。好ましいストリンジントなハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×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)、5×Denhardt溶液、10%デキストラン硫酸および20 µg/mlの変性し切断したサケ精子DNAを含有する溶液中42℃で一夜インキュベートし、次いでフィルターを0.1×SSC 中約65℃で洗浄することを含む。かくして、本発明は、配列番号1の配列またはその断片を有する標識プローブを用いて、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングすることにより得られるポリヌクレオチドをも包含する。

【0040】

当業者には理解されるように、多くの場合、ポリペプチドをコードする領域がそのcDNAの5'末端で短く切断されることから、単離されたcDNA配列は不完全であるだろう。

【0041】

完全長cDNAを得るための、または短鎖cDNAを伸長させるための、当業者に周知で利用可能な方法がいくつかあり、例えば、cDNA末端高速増幅法（RACE）に基づいた方法がある（例えば、Frohmanら、PNAS USA 85, 8998-9002, 1988を参照のこと）。例えばMarathonTM技術(Clontech Laboratories Inc.)により示されるような、上記技法の最近の改良により、より長いcDNAの検索が大いに簡便化された。MarathonTM技術では、所定の組織より抽出されたmRNAからcDNAを作製し、各末端に「アダプター」配列を連結する。続いて、遺伝子特異的およびアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて核酸増幅（PCR）を行い、cDNAの「欠失」5'末端を増幅する。次に、「ネステッド(nested)」プライマー、すなわち増幅産物の内部にアニールするように設計されたプライマー（典型的には、アダプター配列のさらに3'側にアニールするアダプター特異的プライマーおよび既知遺伝子配列のさらに5'側にアニールする遺伝子特異的プライマー）を用いてPCR反応を繰り返す。その後、この反応の産物をDNA塩基配列決定により解析し、この産物を既存のcDNAに直接結合して完全な配列とするか、または5'プライマー設計用の新たな配列情報を用いて別の全長PCRを行うことにより、全長cDNAを構築することができる。

【0042】

本発明の組換え体ポリペプチドは、当業界で周知の方法を用いて、発現系を含有する遺伝子操作宿主細胞から生産することができる。したがって、更なる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現系、該発現系により遺伝子操作された宿主細胞、および組換え法による本発明のポリペプチドの生産に関する。本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いてこの種のタンパク質を生産するために、無細胞翻訳系を使用することもできる。

【0043】

組換え体生産に関しては、本発明のポリヌクレオチドの発現系またはその一部を組み込むために宿主細胞を遺伝子操作する。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) などの多くの標準的な

実験室マニュアルに記載された方法により行うことができる。好適なこうした方法として、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)または感染などがある。

【0044】

好ましくは、本発明のタンパク質をトランス型チオレドキシン(thioredoxin in trans:TIT)と共発現させる。プロテアーゼを必要とすること無しに、抗原をチオレドキシンの無い状態に維持するためには、シス型よりもトランス型のチオレドキシンを共発現させることが好ましい。チオレドキシンの共発現は本発明のタンパク質の可溶化を容易にする。また、チオレドキシンの共発現はタンパク質の精製収率、精製されたタンパク質の溶解性および品質に重大な影響を与える。

【0045】

適当な宿主の代表的な例として、細菌細胞（例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌）、真菌細胞（例：酵母、アスペルギルス）、昆虫細胞（例：ショウジョウバエS2、スポドプテラSf9）、動物細胞（例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞）および植物細胞が挙げられる。

【0046】

多種多様な発現系を使用することができる。こうした発現系として、例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来の系、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入因子由来、酵母染色体エレメント由来、ウイルス（例：バキュロウイルス、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス）由来のベクター、およびこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものがある。これらの発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御領域を含んでいてもよい。一般的に、

宿主内でのポリペプチドの産生のためにポリヌクレオチドを維持し、増やし、発現することができる系またはベクターはどれも使用しうる。Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (前掲)に記載されるような、日常的に用いられる周知の技法のいずれかにより、適当なヌクレオチド配列を発現系に挿入することができる。翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

【0047】

また、前記発現系はウイルスまたは細菌等の組換え生存微生物であってもよい。目的とする遺伝子を組換え生存ウイルスまたは細菌のゲノム内に挿入することができる。この生存ベクターを用いての接種またはin vivo感染により、抗原のin vivo発現および免疫応答の誘導がもたらされる。この目的のために使用するウイルスおよび細菌としては、例えば、ポックスウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘ウイルス)、アルファウイルス(シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ヴェネズエラウマ脳炎ウイルス)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ピコルナウイルス(ポリオウイルス、ライノウイルス)、ヘルペスウイルス(水痘-帯状ヘルペスウイルス等)、リステリア、サルモネラ、シゲラ、BCG、がある。これらのウイルスおよび細菌は有毒であっても、または生ワクチンを得るために種々の方法により弱毒化されていてもよい。そのような生ワクチンもまた、本発明の一部を成すものである。

【0048】

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用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、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた周知の方法を用いることができる。最も好ましくは、イオン金属アフィニティークロマトグラフィー(ion metal affinity chromatography:IMAC)が精製に用いられる。ポリペプチドが

細胞内合成、単離および／または精製中に変性されるときは、タンパク質を再生させるための周知の技法を用いて、活性のあるコンフォメーションを復元することが可能である。

【0049】

本発明の別の重要な態様は哺乳動物において免疫学的応答を誘導、増強またはモジュレートする方法に関するものであり、この方法は、癌および自己免疫疾患および関連病態の予防または治療的処置のための抗体および／またはT細胞免疫応答を生ずるのに十分な本発明の断片または全長ポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドを、哺乳動物に接種することを含んでなる。本発明のさらに別の態様は、哺乳動物を前記疾患からの予防または治療のための免疫応答を生じさせるような免疫学的応答を引き出すために、*in vivo* で本発明のポリペプチドをコードし、該ポリヌクレオチドの発現を指令するベクターまたは細胞を介して、本発明のポリペプチドを送達することを含んでなる、哺乳動物において免疫学的応答を誘導、増強またはモジュレートする方法に関する。

【0050】

本発明の更なる態様は、哺乳動物宿主に導入したとき、その哺乳動物において本発明のポリペプチドに対する免疫学的応答を誘導、増強またはモジュレートする免疫学的／ワクチン製剤（組成物）に関し、この組成物は本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドまたは上記で定義したその免疫原性断片を含有する。ワクチン製剤は適当な担体をさらに含んでいてもよい。ポリペプチドは胃の中で分解される可能性があるので、非経口的に（例えば、皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射により）投与することが好ましい。非経口投与に適した製剤としては、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤およびこの製剤を受容者の血液と等張にする溶質を含みうる水性および非水性の無菌注射液、並びに懸濁化剤または増粘剤を含みうる水性および非水性の無菌懸濁液がある。こうした製剤は1回量容器または数回量容器（例えば、密閉アンプルおよびバイアル）で提供することができ、また、使用直前に無菌の液状担体を添加するだけでよい凍結乾燥状態で保管することもできる。

【0051】

本発明の更なる態様は、本発明の断片または完全なポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、あるいは本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含む分子に対する免疫応答を、哺乳動物の免疫系からの細胞を使用してin vitroで誘導し、前記哺乳動物のこれらの活性化された免疫細胞を疾病の治療のために再注入することに関する。免疫系からの細胞の活性化は、本発明の完全なポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、または本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含む分子と共に種々の免疫モジュレーター分子の存在下または不在下でin vitroにてインキュベートすることにより達成される。本発明の更なる態様は、本発明の部分もしくは完全なポリペプチドまたは本発明のポリペプチドを含む分子をin vitroで供給することにより改変した抗原提示細胞の投与による哺乳動物の免疫化、ならびに免疫原性による方法にてin vivo投与することによる前記免疫化に関する。あるいは、抗原提示細胞を本発明の断片もしくは完全なポリヌクレオチドまたは本発明のポリヌクレオチドを含む分子を含有するベクターでin vitroでトランスフェクトして、対応するポリペプチドを発現させることができ、さらに免疫原性的方法でin vivoにて投与することができる。

【0052】

また、本発明のワクチン製剤は該製剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系を含んでいてもよい。好ましくは、前記アジュバント系は選択的にTH1型の応答を生じさせる。

【0053】

免疫応答は極端な2つのカテゴリー(体液性または細胞媒介性免疫応答[慣例では、それぞれ抗体による、および細胞エフェクターによる防御機構によって特徴付けられている])に大まかに区別することができる。これらの応答カテゴリーは、TH1型応答(細胞媒介性応答)およびTH2型免疫応答(体液性応答)と呼ばれている。

【0054】

極端なTH1型免疫応答は、抗原特異的でハプロタイプ拘束性細胞傷害性Tリンパ球の生成およびナチュラルキラー細胞の応答により特徴付けられる。マウスではTH1型応答はIgG2aサブタイプの抗体の生成により特徴付けられることが多いが

、ヒトではこれらはIgG1型抗体に相当する。TH2型免疫応答はマウスIgG1、IgAおよびIgMを含む広範囲の免疫グロブリンアイソタイプの生成により特徴付けられる。

【0055】

これらの2タイプの免疫応答の発生を陰で駆動している力はサイトカインであると考えられる。高濃度のTH1型サイトカインは所与の抗原に対して細胞媒介性免疫応答を好んで誘導する傾向があるが、高濃度のTH2型サイトカインは前記抗原に対して体液性免疫応答を好んで誘導する傾向がある。

【0056】

TH1およびTH2型免疫応答の区別は絶対的なものではない。実際、ある人は、主にTH1であるとか、主にTH2であるとか記載されるような免疫応答を支持している。しかしながら、多くの場合、MosmannおよびCoffmanによりマウスCD4+ve T細胞クローンについて記載された内容(Mosmann, T.R. および Coffmann, R.L. (1989) TH 1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173)から、サイトカインのファミリーを考慮するのが都合がよい。慣例上、TH1型応答はTリンパ球によるINF- γ およびIL-2サイトカイン産生と関連している。TH1型免疫応答の誘導に直接関わることの多い他のサイトカインは、IL-12等のT細胞によっては産生されない。対照的に、TH2型応答はIL-4、IL-5、IL-6およびIL13の分泌に関連している。

【0057】

特定のワクチンアジュバントがTH1またはTH2型のいずれかのサイトカイン応答の刺激にとりわけ適していることが知られている。慣例上、ワクチン接種または感染後の免疫応答におけるTH1：TH2平衡の最良の指標としては、抗原再刺激後のin vitroでのTリンパ球によるTH1またはTH2サイトカイン産生の直接測定、および／または抗原特異的抗体応答のIgG1：IgG2a比の測定が挙げられる。

【0058】

従って、TH1型アジュバントは、抗原によりin vitroで再刺激された際に優先的に単離されたT細胞集団を刺激して高濃度のTH1型サイトカインを産生し、CD8

+細胞傷害性Tリンパ球の発生およびTH1型アイソタイプに関連した抗原特異的免疫グロブリン応答を促進するものである。

【0059】

TH1細胞応答を優先的に刺激し得るアジュバントは、国際特許出願番号W094/00153およびW095/17209に記載されている。

【0060】

3De-0-アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) はそうしたアジュバントの1つである。これはGB2220211(Ribi)により知られている。化学的には、該アジュバントは3De-0-アシル化モノホスホリルリピドAと4、5、6本のアシル化された鎖との混合物であり、Ribi Immunochem. Montanaにより製造される。3De-0-アシル化モノホスホリルリピドAの好ましい形態は、欧州特許第0 689 454 B1号(SmithKline Beecham Biologicals SA)に開示されている。

【0061】

好ましくは、3D-MPLの粒子は、0.22ミクロンの膜を通り抜けて滅菌ろ過されるのに十分な程度小さい(欧州特許第0 689 454 B1号)。3D-MPLは投与量あたり10 μ g~100 μ g、好ましくは25~50 μ gの範囲で存在する。この場合、抗原は通常投与量あたり2~50 μ gの範囲で存在する。

【0062】

別の好ましいアジュバントは、QS21(Quillaja Saponaria Molinaの樹皮から得た、Hplc精製した毒性の無い画分)を含む。任意でこれを3De-0-アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) と、場合により担体と共に混合することもできる。

【0063】

QS21の製造方法は米国特許第5,057,540号に開示されている。

【0064】

QS21を含有する反応性の無いアジュバント製剤は以前に記載されている(W096/33739)。QS21およびコレステロールを含むそうした製剤は、抗原と共に製剤する場合には良好なTH1刺激性アジュバントであることが示されている。

【0065】

TH1細胞応答の優先的刺激物質である別のアジュバントとしては、免疫調節性

の(immunomodulatory)オリゴヌクレオチド、例えばW096/02555に開示されている非メチル化CpG配列が挙げられる。

【0066】

また、前述したもののような異なるTH1刺激アジュバントの組み合わせも、TH1細胞応答の優先的な刺激物質であるアジュバントを提供する際に考慮される。例えば、QS21を3D-MPLと共に製剤化することができる。通常、QS21:3D-MPL比は1:10~10:1であり、好ましくは1:5~5:1であり、多くの場合は実質的に1:1である。最適な共働作用のために好ましい範囲は、2.5:1~1:1の3D-MPL:QS21である。

【0067】

好ましくは、本発明のワクチン組成物中に担体も存在する。前記担体は水中油型エマルジョンであっても、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム等のアルミニウム塩であってもよい。

【0068】

好ましい水中油型エマルジョンは代謝可能な油、例えばスクアレン、 α -トコフェロールおよびTween80を含む。特に好ましい態様では本発明のワクチン組成物中の抗原をそのようなエマルジョン中でQS21および3D-MPLと組み合わせる。更に、前記水中油型エマルジョンはスパン85および／またはレシチンおよび／またはトリカプリリン(tricaprylin)を含んでいてもよい。

【0069】

通常、ヒトへの投与の場合は、QS21および3D-MPLは投与量あたり1~200 μ gの範囲内、例えば10~100 μ g、好ましくは10~50 μ gの範囲内でワクチン中に存在する。通常、水中油型エマルジョンは、2~10%のスクアレン、2~10%の α -トコフェロールおよび0.3~3%のTween80を含む。好ましくは、スクアレン： α -トコフェロール比は1以下であり、これによってより安定なエマルジョンが提供される。また、スパン85は1%という濃度で存在しうる。幾つかの場合、本発明のワクチンが更に安定化剤を含むことが有益であろう。

【0070】

毒性の無い水中油型エマルジョンは、好ましくは、毒性の無い油(例えばスクアレンもしくはスクアレン)、または乳化剤(例えばTween80)を水性担体中に含む

。前記水性担体は、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水でありうる。

【0071】

水中油型エマルジョン中にQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含む特に有効なアジュバント製剤はW095/17210に記載されている。

【0072】

また本発明は、本発明のワクチン製剤を他の抗原、特に癌、自己免疫疾患および関連病態の治療に有用な抗原と組み合わせて含む多価ワクチン組成物を提供する。そのような多価ワクチン組成物は前記のTH1誘導性アジュバントを含みうる。

【0073】

本発明はまた、診断薬として、本発明のポリヌクレオチドに由来するプライマーとしてのポリヌクレオチドの使用、および本発明のポリペプチドに特異的な抗体または試薬としてのポリペプチドの使用に関する。

【0074】

発癌経路に伴うごく初期の変化の検出が可能になると思われる、血液もしくは組織中の遺伝学的または生化学的マーカーを同定することは、患者にとって最良の治療を決定する上で役立つ。ポリヌクレオチド発現等の代理腫瘍マーカーは、癌の各種形態および状態を診断するために用いることができる。本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを同定することは、癌疾患のステージ決定および癌組織の性質の等級付けの両方において有用であろう。ステージ決定過程は、癌の進行度を観察し、生検部位に悪性組織が存在するか存在しないかで判定する。本発明のポリヌクレオチドは癌の侵襲性に関するマーカーを同定することにより、例えば身体の種々の部位におけるその存在を同定することにより、ステージ決定過程を実施するのに役立たせることができる。癌の等級付けは、腫瘍が同じ種類の正常組織にどれだけ近似しているかを示すものであり、それはその細胞の形態および他の分化マーカーによって評価される。本発明のポリヌクレオチドは、それらが腫瘍細胞の分化の状態を判別する上で役立つことから、腫瘍の等級を決定する上で有用である。

【0075】

診断アッセイは、被験体から得られたサンプルからポリペプチドまたはmRNAのレベルの異常な低下または増加を測定することを含む方法による診断を行うことで、癌、自己免疫疾患および関連病態への罹りやすさを診断または判定する方法を提供する。この診断方法は示差的発現として知られる。特定の遺伝子の発現を罹患組織と正常組織との間で比較するものである。2つの組織における該ポリヌクレオチドに関連する遺伝子、mRNA、またはタンパク質の差異、例えば分子量、アミノ酸もしくはヌクレオチド配列、または相対的存在量の差異は、罹患が疑われるヒトの組織における、該遺伝子またはそれを調節する遺伝子の変化を示している。

【0076】

発現の低下または増加は、RNAレベルで測定することができる。まずポリA RNAを2つの組織から単離し、さらに本発明の示差的に発現されるポリヌクレオチドに対応する遺伝子がコードするmRNAを、例えば、組織切片におけるin situハイブリダイゼーション、逆転写酵素PCR、ポリA+ mRNAを含むノーザンブロット、または他の任意の直接的もしくは間接的なRNA検出法によって検出することができる。正常組織と比較した場合の罹患組織における所定のRNAの発現の増大または低減は、転写産物および／または発現されたタンパク質がその疾患に関与していることを示唆する。したがって、正常レベルと比較した場合に、より高いレベルまたはより低いレベルの配列番号1または3に対応するmRNAが検出されることは、患者における癌の存在を示唆するものである。

【0077】

サンプル中のmRNA発現レベルは、該サンプルに由来するエクспレスド・シーケンス・タグ(EST)のライブラリーを作製することにより決定される。該ライブラリー中のESTの相対的提示量を、出発サンプルにおける遺伝子転写産物の相対的提示量を評価するために用いることができる。そしてその試験のEST分析を基準サンプルのEST分析と比較して、目的とするポリヌクレオチドの相対的発現レベルを決定することができる。

【0078】

その他のmRNA解析としては、遺伝子発現の連続的解析(SAGE)法 (Velculescuら

Science (1995) 270:484)、ディファレンシャルディスプレイ法(例えば、米国特許第5,776,683号)、またはヌクレオチドの相互作用の特異性に依存したハイブリダイゼーション分析を用いて行うことができる。

【0079】

あるいは、タンパク質レベルで比較を行ってもよい。2つの組織におけるタンパク質のサイズを、2つの組織からのタンパク質抽出物のウェスタンブロットにおいて、ポリペプチドを検出するための抗体を用い、比較する。また発現レベルおよび細胞小器官局在化を、対応するタンパク質に対する抗体を用いて免疫学的に検出することもできる。宿主に由来するサンプル中の、本発明のポリペプチド等のタンパク質のレベルを測定するために用いることができる他のアッセイ技術は、当業者には周知である。罹患組織におけるポリペプチドの発現レベルが、正常組織における同タンパク質の発現レベルと比較した場合に増加または低減していることは、その発現されるタンパク質が該疾患に関与している可能性があることを示す。

【0080】

本発明のアッセイにおいて、配列番号1または3に記載の少なくとも片方の配列にコードされた遺伝子の遺伝子産物発現レベルを検出することにより、上記の診断を下すことができる。また、正常組織に対する罹患組織のmRNAまたはタンパク質レベルの比較は、疾患の進行または寛解を追跡観察するためにも用いる。

【0081】

サンプル中の多量のポリヌクレチド配列は、ポリヌクレオチドアレイを用いてアッセイすることができる。これらは遺伝子の示差的発現を調べ、遺伝子機能を特定するために用いることができる。例えば、配列番号1または3のポリヌクレオチド配列のアレイは、該ポリヌクレオチドが正常細胞と癌細胞との間で示差的に発現することがある場合には、それを判別するのに用いることができる。本発明の1つの実施形態においては、配列番号1または3のヌクレオチド配列またはそれらの断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば遺伝子突然変異体の効率的なスクローニングを行うことができる。アレイ技法は周知であり、一般的な適用可能性があり、さらに、遺伝子発現、遺伝的連鎖、およ

び遺伝的多様性を含む分子遺伝学における様々な問題に取り組む上で用いることができる（例えばM.Cheeら, Science, 274巻、pp610-613(1996)）。

【0082】

本発明で用いる「診断」とは、被験体の疾患への罹りやすさの判定、被験体が現在該疾患を罹っているかどうかの判定、および該疾患を罹っている被験体の予後判定を含む。

【0083】

本発明はさらに、

(a) 本発明のポリヌクレオチド（好ましくは、配列番号1もしくは3のヌクレオチド配列）もしくはその断片、

(b) (a) のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、

(c) 本発明のポリペプチド（好ましくは、配列番号2もしくは4のポリペプチド）もしくはその断片、または

(d) 本発明のポリペプチド（好ましくは、配列番号2もしくは4のポリペプチド）に対する抗体、

を含んでなる、診断アッセイを実施するための診断用キットに関する。

【0084】

また、本発明のヌクレオチド配列は染色体位置決定にも有用である。この配列は個々のヒト染色体上の特定の位置を特異的にターゲティングし、その特定位置とハイブリダイズすることができる。本発明に従って関連配列をマッピングすることは、これらの配列と遺伝子関連疾患とを相関させるうえで重要な第一段階である。ひとたび配列が正確な染色体位置にマップされたら、その染色体上のその配列の物理的位置を遺伝的地図データと相関させることができる。この種のデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Library からオンラインで入手可能) 中に見いだせる。その後、同一の染色体領域にマップされた遺伝子と疾患との関係を連鎖解析（物理的に隣接した遺伝子の共遺伝）により確認する。罹患個体と非罹患個体とのcDNAまたはゲノム配列の差異も調べることができる。

【0085】

本発明のポリペプチド、その断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに免疫特異的な抗体を生産するための免疫原としても使用することができる。「免疫特異的」とは、その抗体が従来技術における他の関連ポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を示すことを意味する。

【0086】

さらなる態様において、本発明は本発明のポリペプチドまたはその免疫原性断片（本明細書中上記にて定義したとおりである）に対して免疫特異的な抗体を提供する。好ましくは、該抗体はモノクローナル抗体である。

【0087】

本発明のポリペプチドに対する抗体は、慣用のプロトコールを用いて、動物（好ましくはヒト以外の動物）に該ポリペプチドまたはエピトープを含む断片、類似体もしくは細胞を投与することにより得られる。モノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物から抗体を産生させる任意の技法を用いることができる。例を挙げると、ハイブリドーマ法（Kohler, G.およびMilstein, C., Nature (1975) 256:495-497)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozborら, Immunology Today (1983) 4:72) およびEBV-ハイブリドーマ法（Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985) などがある。

【0088】

本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を産生するために、米国特許第4,946,778号に記載されるような一本鎖抗体の調製法も適応することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウスまたは他の哺乳動物を含む他の生物を利用することができる。

【0089】

前記の抗体を用いて、そのポリペプチドを発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。本発明の抗体はまた、癌（特に卵巣癌および大腸癌）、自己免疫疾患および関連病態を予防または治療するためにも用いられ得る。

【0090】

本発明の更なる態様は哺乳動物において免疫学的応答を誘導またはモジュレートする方法に関するものであり、この方法は、特に前記疾患の症状もしくは進行を防ぐかまたは改善するための抗体および／またはT細胞免疫応答を生ずるのに十分な本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含んでなる。本発明のさらに別の態様は、哺乳動物を前記疾患から防御する抗体を産生させるような免疫学的応答を誘導するために、*in vivo* で本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を指令するベクターを介して該ポリペプチドを送達することを含んでなる、哺乳動物において免疫学的応答を誘導またはモジュレートする方法に関する。

【0091】

それゆえ、本発明によって、CASB619ポリペプチド活性の存在、該活性の過剰、または該活性の過少発現のいずれかと関連した、例えば癌および自己免疫疾患、特に卵巣癌および大腸癌などの異常な状態を治療する方法が提供されることが理解されるであろう。

【0092】

さらに本発明は、CASB619ポリペプチドの機能を刺激または抑制する化合物を同定するための化合物のスクリーニング法を提供する。一般的には、前記疾患の治療および予防目的のためにアゴニストまたはアンタゴニストが使用される。種々の供給源、例えば、細胞、無細胞調製物、化学物質ライブラリーおよび天然産物の混合物から化合物を同定することができる。このように同定されたアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターは、場合により、該ポリペプチドの天然のまたは修飾された基質、リガンド、受容体、酵素などであってよく、また、その構造的または機能的なミメティックであってもよい (Coliganら, *Current Protocols in Immunology* 1(2): Chapter 5 (1991)を参照のこと)。スクリーニング法は当業者には公知であろう。さらなるスクリーニング法は、例えば D. Bennettら, *J. Mol. Recognition*, 8:52-58 (1995) および K. Johansonら, *J. Biol. Chem.*, 270(16):9459-9471 (1995)ならびに本明細書中の引用文献にみられる。

【0093】

したがって本発明は、本発明のポリペプチドの機能を刺激または抑制する化合物を同定するためのスクリーニング法であって、以下：

(a) 候補化合物と、上記ポリペプチド（または該ポリペプチドを担持している細胞もしくはその膜）またはその融合タンパク質との結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合させた標識により測定すること、

(b) 候補化合物と、上記ポリペプチド（または該ポリペプチドを担持している細胞もしくはその膜）またはその融合タンパク質との結合を、標識競合物質の存在下で測定すること、

(c) 候補化合物が上記ポリペプチドの活性化または抑制により生ずるシグナルをもたらすか否かを、該ポリペプチドを担持している細胞または細胞膜に適した検出系を用いて調べること、

(d) 候補化合物と、請求項1に記載のポリペプチドを含有する溶液とを一緒にして混合物を調製し、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定して、該混合物の活性をスタンダードと比較すること、または

(e) 候補化合物が細胞における上記ポリペプチドをコードするmRNAおよび該ポリペプチドの産生に及ぼす効果を例えばELISAアッセイを用いて検出すること

、

よりなる群から選択される方法を含んでなるスクリーニング法を提供する。

【0094】

膜に結合した受容体または可溶性の受容体が存在するのであれば、当業界で公知の標準的な受容体結合法によりこの種の受容体を同定するために本発明のポリペプチドを用いることができる。また周知のスクリーニング法を用いて、その受容体への本発明のポリペプチドの結合に関して競合する、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを（もし存在するのであれば）同定することもできる。

【0095】

かくして、他の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など、またはこの種のポリペプチドの産生を低減または増加させる化合物を同定するためのスクリーニ

ングキットに関し、このキットは、

- (a) 本発明のポリペプチド、
 - (b) 本発明のポリペプチドを発現している組換え細胞、
 - (c) 本発明のポリペプチドを発現している細胞膜、または
 - (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体、
- を含んでなり、前記ポリペプチドは好ましくは配列番号2のポリペプチドである。

当業者であれば、本発明のポリペプチドは、その構造に基づいて該ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターを設計する方法にも使用できることが容易に理解されよう。この方法は、

- (a) 最初に該ポリペプチドの三次元構造を解析し、
 - (b) アゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターの確実と思われる反応部位または結合部位の三次元構造を想定し、
 - (c) 想定された反応部位または結合部位と結合または反応すると予想される候補化合物を合成し、そして
 - (d) その候補化合物が実際にアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターであるか否かを調べる、
- ことを含んでなる。

【0096】

また、遺伝子治療を利用して、被験体の適切な細胞によりCASB619ポリペプチドを内生的に産生させることもできる。遺伝子治療の概要については、Human Molecular Genetics, T StrachanおよびA P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd(1996)中、20章 Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches（および本明細書で引用した引用文献）を参照のこと。

【0097】

ワクチン調製については、Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach (PowellおよびNewmanによる編集), Plenum Press, 1995; New Trends and Developments in Vaccines (Vollerらによる編集), University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978に

一般的に記載されている。リポソーム内へのカプセル化は、例えばFullerton, 米国特許第4,235,877号に記載されている。タンパク質の巨大分子へのコンジュゲート化は、例えばLikhite, 米国特許第4,372,945号、およびArmorら, 米国特許第4,474,757号により開示されている。

【0098】

各ワクチン用量中のタンパク質量は、典型的なワクチンにおいては、重大かつ不利益な副作用を引き起こすことなく免疫防御応答を誘導する量として選択される。そのような量は、用いた特定の免疫原によって異なるであろう。一般的には、各用量はタンパク質を1～1000 µg、好ましくは2～100 µg、最も好ましくは4～40 µg含むことが期待される。特定のワクチンについての最適な量は、被験体における抗体力価およびその他の応答の測定を伴う標準的研究により確定することができる。最初のワクチン接種に引き続いて、被験体は約4週間の間に1回の追加免疫を受けることもある。

【0099】

「単離された」とは、天然の状態から「人間の手によって」改変されたことを意味する。「単離された」組成物または物質が天然に存在するのであれば、それはそのもとの環境から変化しているか分離されており、またはその両方である。例えば、生存している動物の体内に自然界で存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その天然状態の共存物質から分離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書中で用いられるように、「単離された」ものである。

【0100】

「ポリヌクレオチド」とは、一般に任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指し、これは一本鎖および二本鎖の領域を含む、修飾されていないRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであり得る。

【0101】

本明細書中で用いる「変異体」とは、基準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、不可欠な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。典型的なポリヌクレオチドの変異体は基準ポリヌクレオチド

とヌクレオチド配列の点で相違する。この変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても、しなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、以下で述べるように、基準配列によりコードされるポリペプチドのアミノ酸の置換、欠失、付加、融合および末端切断（トランケーション）をもたらさう。典型的なポリペプチドの変異体は基準ポリペプチドとアミノ酸配列の点で相違する。一般的には、基準ポリペプチドの配列と変異体の配列が全般的によく類似しており、多くの領域で同一となるような相違に限られる。変異体と基準ポリペプチドは任意に組み合わせた1以上の置換、欠失、付加によりアミノ酸配列が相違してよい。置換または付加されるアミノ酸残基は遺伝子コードによりコードされるものであっても、なくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は対立遺伝子変異体のように天然に存在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない変異体は、突然変異誘発法または直接合成により作製することができる。

【0102】

当技術分野で知られる「同一性」とは、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の比較により決定された、2以上のかかる配列間の類縁性のことである。当技術分野ではまた、「同一性」はポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の鎖間の一致度(match)により決定された、このような配列間の配列類縁性の程度を意味する。「同一性」および「類似性」は公知の方法により難なく算出することができ、こうした方法として、例えば Computational Molecular Biology, Lesk, A.M.編, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. and Griffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991; および Carillo, H. and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988) に記載された方法があるが、これらに限らない。同一性を決定するため

の好ましい方法は、検討する配列間で最大級のマッチングが得られるように設計される。同一性および類似性を決定する方法は一般に入手可能なコンピュータプログラムに編集されている。2配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム法としては、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J.ら, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTNおよびFASTA (Atschul, S.F.ら, J. Molec. Biol. 215:403-410 (1990)) があるが、これらに限らない。BLASTXプログラムはNCBIおよび他のソースから一般に入手可能である (BLAST Manual, Altschul, S.ら, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S.ら, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。公知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性の決定に使用することができる。

【0103】

使用した好適なアルゴリズムはFASTAである。このアルゴリズムを用いたポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列比較のための好適なパラメーターは、以下のものを含む：

ギャップペナルティー：12

ギャップ伸長ペナルティー：4

ワードサイズ：2、最大6

ポリペプチド配列をその他の方法で比較するための好ましいパラメーターは次のものを含む：

1) アルゴリズム：Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス：BLOSSUM62、Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919 (1992)

ギャップペナルティー：12

ギャップ長ペナルティー：4

これらのパラメーターを用いて有効なプログラムは Genetics Computer Group (Madison WI) から「gap」プログラムとして一般に入手可能である。前記のパラメーターはポリペプチド比較のためのデフォルトパラメーター(default parameter) である (末端ギャップのペナルティーは無し)。

【0104】

ポリヌクレオチド配列を比較するための好ましいパラメーターは次のものを含む：

1) アルゴリズム：Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)；

比較マトリックス：マッチ＝＋10、ミスマッチ＝0

ギャップペナルティー：50

ギャップ長ペナルティー：3

これらのパラメーターを用いて有用であるプログラムは Genetics Computer Group(Madison WI)から「gap」プログラムとして公に入手可能である。前記パラメーターはポリヌクレオチド比較のためのデフォルトパラメーターである。

【0105】

例として、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号1の基準配列と同一である、すなわち基準配列に対して100%の同一性を有するか、または該基準配列に対して、一定の整数個までのヌクレオチド変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個のヌクレオチドの欠失、置換（トランジションおよびトランスバージョンを含む）または挿入よりなる群から選択され、こうした変異は基準ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置、またはこれらの末端位置の間のどこに存在してもよく、基準配列中のヌクレオチドの間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。ヌクレオチド変異の数は、配列番号1のヌクレオチドの総数に、それぞれの同一性%値の絶対比率（100で割った値）を掛け、その積を配列番号1のヌクレオチドの総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_n はヌクレオチド変異の数であり、 x_n は配列番号1のヌクレオチドの総数であり、 y は例えば70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95などであり、さらに x_n と y の非整数の積は、その積を x_n から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の改変は、そのコード配列にナンセンス、ミスセンスまたはフレー

ムシフト突然変異を生じさせ、それにより、こうした変異後に該ポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドを改変させることができる。

【0106】

同様に、本発明のポリペプチド配列は、配列番号2の基準配列と同一である、すなわち基準配列に対して100%の同一性を有するか、または同一性%が100%未満であるように基準配列に対して一定の整数個までのアミノ酸変異を含むことができる。このような変異は少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（保存的および非保存的アミノ酸置換を含む）または挿入よりなる群から選択され、これらの変異は基準ポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間のどこに存在してもよく、基準配列中のアミノ酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続したグループとして散在する。アミノ酸変異の数は、配列番号2中のアミノ酸の総数にそれぞれの（100で割った）同一性%の絶対比率を掛け、その積を配列番号2中のアミノ酸の総数から引くことにより、すなわち次式により求められる。

【0107】

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y)$$

式中、 n_a はアミノ酸変異の数であり、 x_a は配列番号2中のアミノ酸の総数であり、 y は例えば70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85等であり、さらに x_a と y の非整数の積は、その積を x_a から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0108】

「相同体」とは、当技術分野において用いられる、被験配列に対し高度な配列近縁性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を指す総称用語である。この類縁性は前述のように比較した配列間の同一性および／または類似性の程度を決定することにより定量化することができる。別々の種における機能的に等価なポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する「オーソログ体」、同じ種内で考える場合に機能的に類似した配列を意味する「パラログ体」という用語は、この総称用語の範囲に含まれるものである。

【0109】

実施例

実施例1

リアルタイムRT-PCR分析

リアルタイムRT-PCR(U.Gibson, 1996, Genome Research:6, 996)を用いて複数の患者由来の対応する腫瘍および正常大腸組織における候補抗原のmRNA転写産物存在度を比較する。さらに、正常組織のパネルにおける候補遺伝子のmRNAレベルを、この手法により評価する。

【0110】

正常大腸および腫瘍大腸由来の総RNAをTriPure試薬(Boehringer)を用いて急速凍結生検材料から抽出する。正常組織由来の総RNAは、InVitrogen社から購入するか、またはTriPure試薬(Boehringer)を用いて急速凍結生検材料から抽出する。ポリ-A⁺ mRNAをオリゴ-dT磁気ビーズ(Dynal)を用いてDNase処理後に総RNAから精製する。mRNAの定量化は、分光蛍光分析(VersaFluor, BioRad)によってSybrII染料(Molecular Probes)を用いて行う。リアルタイムPCR増幅用のプライマーは、TaqMan増幅条件用のデフォルトオプションを用いてPerkin-Elmer Primer Expressソフトウェアで設計する。

【0111】

リアルタイム反応を、各反応について、標準PCRプロトコルにしたがって2ngの精製mRNAを用いてアセンブルする。SybrI染料(Molecular Probes)をリアルタイム検出のために1/75000の最終希釈度で加える。増幅(40サイクル)およびリアルタイム検出は、Perkin-Elmer Biosystems社製 PE7700システムにて通常の機器設定を用いて行う。Ct値はPE7700 Sequence Detectorソフトウェアを用いて計算する。各患者サンプルについて2つのCt値が得られる。すなわちそれは、腫瘍Ct(C_{tT})および対応する正常大腸Ct(C_{tN})である。リアルタイムPCRによって得られるCt値は標的鋳型のコピー数と対数直線的に関連している。一般的な実験条件下でのPCR増幅の効率は理論的な増幅効率に近似しているので、 $2^{(C_{tN} - C_{tT})}$ は、2つの組織における相対的転写産物レベルの推定値(すなわち、腫瘍中のmRNA過剰発現の倍率)である。リアルタイムPCR反応は24人の患者に由来する生検材料について行う。各患者について、mRNAの過剰発現レベルを記載の通りに算出する。次い

で、候補抗原のmRNA過剰発現の平均レベル、および該候補抗原を過剰発現している患者の割合を、このデータセットから計算する。それぞれの値は同一サンプル中のアクチンに関して標準化され（比率）、それは図1に示される。ここで値が1であることはアクチン発現が同レベルであることに対応する。これらの結果は対数スケールで示している。

【0112】

また、28種の組織に対応する全部で48個の正常組織サンプル系列を、同じ手法で試験した。候補抗原に関するCt値を、同じ組織サンプルから得たアクチンについてのCt値と比較した。アクチンに関して標準化した値を図2に示す。

【0113】

大腸癌／正常大腸サンプルにおけるリアルタイムPCRの結果

概要

【表1】

大腸腫瘍でCASB619を過剰発現している患者（％）	大腸腫瘍における過剰発現の平均レベル（倍率）
16/24（67％）	208

結論：隣接した正常大腸と比較して、67％の大腸癌サンプルでは平均してほぼ200倍のCASB619が過剰発現されている。正常組織における発現は、他の消化管組織、ならびに主に気管および精巣でのみ起こる。

【0114】

実施例2

DNAマイクロアレイ

DNAマイクロアレイを用いて、複数サンプル中の遺伝子の大規模コレクションのmRNA発現プロファイルを調べる。この情報をリアルタイムPCRによって得られるデータを補完するために用いて、腫瘍と正常組織における遺伝子発現レベルの独立した測定を行う。

【0115】

DNAマイクロアレイを製造する現在の技術の例としては、1) フォトリソグラフィ法を用いた固相化学合成法によりオリゴヌクレオチドをチップ表面上で合成する、Affymetrix社の「GeneChip」アレイ、2) 少量のDNA溶液を自動機械で注出して、固相（例えばガラス）表面上に固定化する、DNAスポッティング技術、が挙げられる。どちらの場合でも、チップは、目的とする組織（例えば正常組織、腫瘍等）から抽出して放射活性によりまたは蛍光リポーター分子により標識したcDNAまたはcRNAとハイブリダイズさせる。標識された物質を該チップとハイブリダイズさせ、チップ上のそれぞれの配列に結合したプローブの量を特殊なスキャナーを使用して測定する。該実験は1種類の蛍光リポーター（または放射活性）を用いて設定することができるが、その代わりに2種類の蛍光リポーターを用いて実施することもできる。その後者の場合、2つのサンプルのそれぞれをリポーター分子のうち的一方で標識する。次いで2つの標識されたサンプルをDNAチップ上の配列に競合的にハイブリダイズさせる。2種類の蛍光シグナルの比率をチップ上の各配列について決定する。この比率を用いて2つのサンプル中の転写産物の相対的存在量を算出する。詳細なプロトコルは、「DNAマイクロアレイ：実用的アプローチ（DNA Microarrays: A practical approach.）Schena M. Oxford University Press 1999」およびワールドワイドウェブ(World Wide Web) (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/index.html>、<http://arrayit.com/DNA-Microarray-Protocols/>) ならびに専門の販売業者（例えばAffymetrix社）を含む数多くの情報源から入手可能である。

【0116】

実施例3

ESTプロフィール

実験的な抗原組織発現特性解析に対する補足的アプローチは、ヒトの「エクспレスド・シーケンス・タグ(EST)」データベースを調べることである。ESTは特定の組織または細胞系列から抽出されたmRNAのコレクションから作製された小断片のcDNAである。現在このようなデータベースは、様々な種類および状態の疾患に由来する腫瘍性組織を含む、数百種のcDNA組織ライブラリーから得た大量のEST (10^6) を提供している。組織発現をさらに理解するために、情報科学ツール（

Blast) を用いてCASB616配列の比較検索を行う。

【0117】

【表2】

CASB619のEST分類

DbEST アクセッション	ATG ライブラリーID	説明
NCBI:1202616	937	NCI_CGAP_Co2 (大腸絨毛線種)
NCBI:1202659	937	NCI_CGAP_Co2 (大腸絨毛線種)
NCBI:1208269	935	NCI_CGAP_Pr4.1 (前立腺上皮内腫瘍)
NCBI:1152744	888	NCI_CGAP_Pr6 (前立腺上皮内腫瘍)
NCBI:1157532	910	NCI_CGAP_Pr22 (正常前立腺)
NCBI:1178873	882	NCI_CGAP_Co3 (12個のプールした大腸腫瘍)
NCBI:1040601	628	精巣 NHT
NCBI:1056221	628	精巣 NHT
NCBI:1298131	910	NCI_CGAP_Pr22 (正常前立腺)
NCBI:976517	715	精巣上体
NCBI:1618753	417	甲状腺腫瘍
NCBI:1737305	895	NCI_CGAP_Br2 (プールした乳癌組織)
NCBI:1738600	895	NCI_CGAP_Br2 (プールした乳癌組織)
NCBI:1767617	628	精巣 NHT
NCBI:1889992	424	胎児性心臓
NCBI:1907671	628	精巣 NHT
NCBI:2074937	1076	NCI_CGAP_Lu5 View stats
NCBI:2147596	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:2147632	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:2308815	1462	NCI_CGAP_Ut2
NCBI:2441896	1410	NCI_CGAP_Pr28
NCBI:2447648	1463	NCI_CGAP_Ut3
NCBI:2381271	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:2582781	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:2583713	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:2585593	1410	NCI_CGAP_Pr28

NCBI:2587322	1463	NCI_CGAP_Ut3
NCBI:2601136	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:2824305	1463	NCI_CGAP_Ut3
NCBI:3007221	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:3078572	2301	NCI_CGAP_Pit1
NCBI:3086989	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:3087235	1461	NCI_CGAP_Ut1
NCBI:3045696	1661	NCI_CGAP_Lu19
NCBI:3218161	2467	NCI_CGAP_Co20
NCBI:3291383	2508	NCI_CGAP_Sub3
NCBI:3028913	2107	BT130
NCBI:3655706	1447	NCI_CGAP_Co14
NCBI:2553046	1728	Soares_Dieckgraefe_colon_NHCD
NCBI:979345	781	子宮内膜腫瘍
NCBI:3289738	2508	NCI_CGAP_Sub3
NCBI:614598	464	?
NCBI:978076	781	子宮内膜腫瘍
NCBI:979060	781	子宮内膜腫瘍
NCBI:1616799	417	甲状腺腫瘍
NCBI:978445	781	子宮内膜腫瘍

まとめると、CASB619に該当する93%のESTは、腫瘍組織、胎児性組織または正常生殖器官に由来するものである。このことは、該遺伝子がこれらの組織においてより頻繁に発現されることを示唆している。

【0118】

実施例4

ノーザン-サザンブロット分析

限られた量の混合した腫瘍cDNAおよび対応する正常大腸cDNAをAdvantage PCRによって増幅する（上記参照）。また、複数の正常組織からのメッセンジャーRNAを、同じ手法を用いて増幅する。増幅したcDNA（1μg）を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写する。該メンブレンは、候補TAA cDNAの断片を用いて調製したプローブとハイブリダイズさせる（AlkPhos Direct System）。ノーザン-サザン分析は、腫瘍組織および正常組織における転写物の大きさ、スプライス変異体の存在および転写物量についての情報を提供する。

【0119】

実施例5

ノーザンブロット分析

ノーザンブロットはポリA+mRNAを1 μ g用いて標準的プロトコールにしたがって行う。放射性プローブはReady-to-Goシステム (Pharmacia) を用いて調製する。

【0120】

実施例6

完全長cDNA配列の同定

大腸腫瘍cDNAライブラリーを λ ZapIIシステム(Stratagene)を用いて5 μ gのポリA⁺ mRNAから構築する。SuperscriptII(Life Technologies)を逆転写ステップに用いる以外は提供されたプロトコルに従う。オリゴdTでプライムしたライブラリーおよびランダムプライムしたライブラリーを構築する。各ライブラリースクリーニングに対して約 1.5×10^6 の独立したファージを平板培養する。ファージブラークをナイロンフィルター上に移し、AlkPhos Directで標識したcDNAプローブを用いてハイブリダイズさせる。陽性ファージを化学発光により検出する。陽性ファージを寒天平板から切り出し、500 μ lのSMバッファーで溶離し、遺伝子特異的PCRにより確認する。溶離したファージをin vivo切り出しによって1本鎖M13バクテリオファージに変換する。次いで、該バクテリオファージを大腸菌(E.coli)の感染によって2本鎖プラスミドDNAに変換する。感染した細菌を平板培養し、cDNAプローブによるスクリーニングの第2ラウンドを行う。プラスミドDNAを陽性細菌クローンから精製し、両方の鎖について配列決定する。

【0121】

完全長遺伝子をcDNAライブラリーから直接取得することができない場合、欠けている配列はRACE技術(Marathon Kit, ClonTech.)を用いて単離される。この手法は、mRNAを2本鎖cDNAに逆転写し、cDNAの末端にリンカーをライゲートし、遺伝子特異的プライマーおよびリンカーオリゴヌクレオチドの一つを用いてcDNAの所望の末端を増幅することに依拠する。Marathon PCR産物をプラスミド(pCRII-TOP0, InVitrogen)にクローニングし、配列決定する。

【0122】

得られた配列(配列番号1)は、1013個のアミノ酸からなる推定上のオープンリーディングフレーム(配列番号2)を有する。推定上のタンパク質配列は、細

胞内局在化に関する予測アルゴリズム (PSORT: <http://psort.nibb.ac.jp/>およびTopPred: http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/toppred_source.htm) にかけた。CASB619は、ペプチドシグナルと、1～3つの膜貫通ドメインを有すると考えられる (この予測の信頼度は低い)。他のモチーフまたはドメインは認められなかった。

【0123】

実施例7:

7.1 腫瘍特異的抗原の発現および精製

ワクチン用途のために本発明の抗原を産生させるため、そして天然発現のタンパク質の免疫組織化学による特性評価に必要な抗体の迅速な精製および作製、または精製の追跡用のタンパク質断片またはタンパク質全体を産生させるために、微生物宿主における発現、またはその代わりにin vitroでの転写／翻訳を用いる。

【0124】

組換えタンパク質が2つの微生物宿主、大腸菌および酵母(*Saccharomyces cerevisiae*または*Pichia pastoris*など)において発現され得る。このことによって、この特定の抗原産生にとって最良の特性を有する発現系の選択が可能である。一般的に、組換え抗原は大腸菌で発現され、試薬タンパク質は酵母で発現される。

【0125】

発現の戦略は、まず、組換え抗原の一次構造の設計を含む。一般に、抗原の免疫原性特性をモジュレートするのに有用な領域、免疫融合パートナー(IFP)をも含み得る発現融合パートナー(EFP)が、発現レベルを向上させるためにN末端に配置される。加えて、さらに精製を促進するのに有用なアフィニティ融合パートナー(AFP)がC-末端に含まれる。

【0126】

組換え株が入手可能な場合、組換え産物は、発現レベルの評価、および粗抽出物中の反応の分析によるタンパク質のさらなる可溶性の予測によって特徴付けられる。

【0127】

適当な培地上で増殖させ、組換えタンパク質の発現を誘導した後、全抽出物をSDS-PAGEで分析する。組換えタンパク質を、染色ゲルで視覚化し、特異的抗体を用いてウェスタンブロット分析で同定する。

【0128】

種々のタイプの発現した抗原を比較評価することで、さらなる精製および免疫学的評価に用いられることになる最も有望な候補の選別が可能になる。

【0129】

精製スキームは、組換えタンパク質におけるアフィニティHis末端の存在に基づく古典的な手法に従う。典型的な実験では、破壊した細胞を濾過し、細胞抽出物を、組換えタンパク質を特異的に保持するイオン金属アフィニティクロマトグラフィー(Ion Metal Affinity Chromatography)(IMAC: Qiagen製の Ni^{++}NTA)にかける。保持されたタンパク質をリン酸バッファー中0~500mMのイミダゾール勾配(可能な限り界面活性剤の存在下)で溶出する。

【0130】

7.2 抗体産生および免疫組織化学

少量の比較的精製されたタンパク質を用いて、

- a) 正常または癌組織切片における免疫組織化学による発現を検出するため、
 - b) 発現を検出し、精製プロセス中のタンパク質を追跡するため(ELISA/ウェスタンブロット)、または
 - c) 精製タンパク質を特性評価/定量するため(ELISA)
- に、免疫学的ツールを作成することができる。

【0131】

7.2.1 ポリクローナル抗体：免疫感作

2~3羽のウサギを、アジュバント3D-MPL/QS21中で処方した100 μg のタンパク質にて、3週間間隔で3回筋内投与(I.M.)により免疫感作する。各免疫感作の3週間後、血液サンプルを採取し、抗体力価を、標準プロトコルにしたがってコーティング抗原としてタンパク質を用いて血清中でELISAによって評価する。

【0132】

ELISA

96ウェルマイクロプレート(maxisorb Nunc)を5 μ gのタンパク質で4℃にて一晩かけて被覆する。PBS NCS1%で37℃にて1時間飽和させた後、ウサギ血清の連続希釈液を37℃で1時間30分かけて加える(1/10から出発)。PBS Tween中で3回洗浄した後、抗ウサギビオチニル化抗血清(Amersham)を加える(1//5000)。プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(1/5000)を37℃で30分かけて加える。洗浄後、50 μ lのTMB(BioRad)を7分かけて加え、次いで反応を0.2MのH₂SO₄で停止させる。ODを450nmで測定し、SoftmaxProで中点希釈度を計算し得る。

【0133】

7.2.2 モノクローナル抗体免疫感作

5匹のBALB/cマウスを5 μ gの精製タンパク質にて3週間間隔で3回免疫感作する。II後14日目、3後1週間目にブリーディングを行う。この血清を、被覆抗原として用いられる精製タンパク質についてElisaによって試験する。これらの結果(中点希釈度>10000)に基づいて、融合のために1匹のマウスを選別する。

【0134】

融合/HAT選別

標準プロトコルにしたがってPEG40%およびDMSO5%を用いて、脾臓細胞をSP2/0骨髓腫と融合する。次いで、細胞を96ウェルプレートに $2.5 \times 10^4 \sim 10^5$ 細胞/ウェルで接種して、耐性クローンをHAT培地中で選択する。これらのハイブリドーマの上清を特異的抗体のその含量について試験し、陽性の場合、限界希釈法を2サイクル行う。スクリーニングを2ラウンド行った後、3種のハイブリドーマを腹水(ascitis)産生用を選択する。

【0135】

7.2.3 免疫組織化学

抗体が入手可能な場合、

- ・ 正常組織に対する癌における本発明の抗原の発現のレベル、または
- ・ その抗原を発現している一定のタイプの癌の割合、

- ・その他の癌のタイプもその抗原を発現するかどうか、
 - ・癌組織においてその抗原を発現している細胞の割合、
- を測定するために、免疫染色を正常または癌組織切片で行う。

【0136】

組織サンプル調製

切開後、組織サンプルをOCT化合物中でコルクディスク上にのせ、液体窒素(-160°C)中で予め過冷却したイソペンタン中で急速に凍結させる。次いで、ブロックを使用するまで-70°Cで保存する。7~10 μmの切片はクライオスタットチャンバー(-20、-30°C)中で作製される。

【0137】

染色

組織切片を室温(RT)で5分間乾燥し、アセトン中にRTにて10分間固定し、再び乾燥し、PBS0.5%BSA5%血清で飽和する。RTで30分間置いた後、直接または間接染色を抗原特異的抗体を用いて行う。直接染色は良好な特異性をもたらすが、染色の強さは小さく、一方間接染色は染色の強さは大きいが染色の特異性が低い。

【0138】

7.3 本発明の抗原に対するヒト細胞性免疫反応の分析

本発明の抗原の免疫学的な適切性はヒトT細胞のin vitro初回抗原刺激によって評価することができる。全てのT細胞リンパ球系および樹状細胞を健康なドナーのPBMC(末梢血単核細胞)(好ましくはHLA-A2サブタイプ)から誘導する。またHLA-A2.1/K^bトランスジェニックマウスをHLA-A2.1ペプチドのスクリーニングに用いる。

【0139】

新たに発見された抗原特異的CD8⁺ T細胞系を週1回のin vitro刺激により生じさせ、維持する。抗原または抗原由来のペプチドに応答したCD8系のγ-IFN産生および溶菌活性を標準方法で試験する。

【0140】

CD8⁺ T細胞系を生じさせるために2つのストラテジー、すなわちペプチドに基づく手法と全遺伝子に基づく手法が用いられる。両手法には、適当な送達システ

ム中にクローニングするか、またはHLA結合ペプチドの配列を予測するのに用いられる、正確なリーディングフレームでの新たに発見された抗原の全長cDNAが必要である。

【0141】

ペプチドに基づく手法

HLA-A2結合ペプチド配列を、Parker'sアルゴリズム (Parker, K.C., M.A. Bednarek および J.E. Coligan 1994 Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J. Immunol. 152:163 ならびに http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) または Rammensee 法 (Rammensee, Friede, Stevanovic, MHC ligands and peptide motifs: 1st listing, Immunogenetics 41, 178-228, 1995; Rammensee, Bachmann, Stevanovic: MHC ligands and peptide motifs. Landes Bioscience 1997 および <http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm>) のいずれかを用いて予測する。次いで、ペプチドを HLA-A2.1/K^b トランスジェニックマウスモデル (Vitiello ら) でスクリーニングする。

【0142】

a) 予測されたエピトープ結合 HLA A0201 対立遺伝子:

【表3】

a.1) HLA-A*0201 ノンマー

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rammensee eスコア	Parker スコア○	配列番号
848	F	L	W	E	S	A	A	A	C		777.681	68
24	R	L	W	R	L	L	L	W	A		521.615	5
761	S	L	A	D	R	L	I	G	V	30	655.875	6

893	S	L	P	E	Q	R	V	T	I	26		7
886	K	L	C	S	G	G	I	S	L	25		8
853	A	A	A	C	P	L	C	S	V	25		9
674	S	A	L	A	N	T	V	T	L	24		10
499	F	V	F	E	T	L	C	S	V	24	976.762	11
129	E	L	P	H	G	F	A	S	L	23		12
973	L	I	F	T	S	K	K	S	L	22		13
936	K	L	E	Y	K	Y	S	K	L	22		14
903	K	T	I	D	F	W	L	K	V	22		15
860	S	V	A	D	Y	H	A	I	V	22		16
830	L	L	L	P	G	T	C	S	D	22		17
675	A	L	A	N	T	V	T	L	A	22		18
503	T	L	C	S	V	N	C	E	L	22		19
169	N	T	D	E	C	T	A	T	L	22		20
81	S	L	P	D	P	V	K	G	T	22		21
980	S	L	F	G	K	I	K	S	F	21		22
918	C	T	A	I	L	L	T	V	L	21		23
867	I	V	S	S	C	V	A	G	I	21		24
710	K	M	S	V	C	T	D	N	V	21		25
259	V	L	V	R	N	I	A	I	T	21		26
234	E	L	N	R	G	N	N	V	L	21		27
175	A	T	L	M	Y	A	V	N	L	21		28
70	V	A	V	P	H	T	P	G	L	21		29
24	R	L	W	R	L	L	L	W	A	21		30
914	S	A	G	T	C	T	A	I	L	20		31
891	G	I	S	L	P	E	Q	R	V	20		32
824	K	T	V	P	G	S	L	L	L	20		33
765	R	L	I	G	V	T	T	D	M	20		34
681	T	L	A	G	G	P	S	F	T	20		35
539	Y	I	I	E	E	N	T	T	T	20		36
264	I	A	I	T	G	V	A	Y	T	20		37
38	V	T	Q	G	T	G	P	E	L	20		38

○この配列を含む分子の脱会合の半減期の算出値

【0143】

【表4】

a.2) HLA A02_01デカマー

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Rammen see スコア*	Parker スコア○	配列番号
980	S	L	F	G	K	I	K	S	F	T		151.648	39
866	A	I	V	S	S	C	V	A	G	I	25		40
852	S	A	A	A	C	P	L	C	S	V	24		41
786	H	L	E	S	L	G	I	P	D	V	24		42
571	K	I	Y	S	I	N	V	T	N	V	24	246.353	43
761	S	L	A	D	R	L	I	G	V	T	23		44
626	I	L	K	A	H	Q	P	Y	G	V	23		5
485	V	M	A	D	T	E	N	K	E	V	23	350.117	46
29	L	L	W	A	G	T	A	F	Q	V	23	5691.997	47
916	G	T	C	T	A	I	L	L	T	V	22		48
778	I	T	S	P	A	E	L	F	H	L	22		49
766	L	I	G	V	T	T	D	M	T	L	22		50
428	T	L	P	T	N	M	E	T	T	V	22		51

350	L	M	Y	K	W	A	K	P	K	I	22		52
972	D	L	I	F	T	S	K	K	S	L	21		53
692	G	L	K	Y	F	H	H	F	T	L	21		54
644	G	T	K	N	N	K	I	H	S	L	21		55
465	S	D	N	D	F	M	I	L	T	L	21		56
260	L	V	R	N	I	A	I	T	G	V	21		57
77	G	L	C	T	S	L	P	D	P	V	21		58
949	T	L	K	D	C	D	L	P	A	A	20		59
795	V	I	F	F	Y	R	S	N	D	V	20		60
733	S	I	T	A	Y	V	C	Q	A	V	20		61
712	S	V	C	T	D	N	V	T	D	L	20		62
702	S	L	C	G	N	Q	G	R	K	M	20		63
432	N	M	E	T	T	V	L	S	G	I	20		64
263	N	I	A	I	T	G	V	A	Y	T	20		65
121	G	I	R	F	D	E	W	D	E	L	20		66

【0144】

【表5】

○ この配列を含む分子の脱会合の半減期の算出値

HLA_A0205

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Parker スコア○	配列番号
499	F	V	F	E	T	L	C	S	V	216	11

【0145】

【表6】

HLA A0203

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Rammenscore	配列番号
846	F	H	F	L	W	E	S	A	A	A	27	67

簡単に述べると、トランスジェニックマウスをアジュバントを加えたHLA-A2ペプチドで免疫感作し、CD8応答(ペプチドでパルスした自己脾臓細胞の効率的な溶解により定義される)を誘導できないものをヒト系においてさらに分析する。

【0146】

ヒト樹状細胞(Romaniらにしたがって培養したもの)をペプチドでパルスし、(Facsにより)CD8で選別したT細胞を刺激するのに用いる。週1回の刺激を数回行った後、CD8系をまずペプチドパルス化自己BLCL(EBV-B形質転換細胞系)にて試験する。ペプチドの適正なin vivoプロセッシングを確認するために、CD8系をcDNAトランスフェクト腫瘍細胞(HLA-A2トランスフェクトLnCaP、Skov3またはCAMA腫瘍細胞)にて試験する。

【0147】

全遺伝子に基づく手法

CD8+ T細胞系を、遺伝子銃でトランスフェクトした樹状細胞、レトロウイルスにより形質導入されたB7.1-トランスフェクト線維芽細胞、組換えポックスウイルス(Kimら)またはアデノウイルス(Butterfieldら)を感染させた樹状細胞のいずれかで抗原刺激する。ウイルス感染細胞は、抗原が高レベルで発現されるので抗原ペプチドを提示するのに非常に効率的であるが、ウイルスT細胞系の過剰増殖を回避するために1回使用できるにすぎない。

【0148】

交互に刺激した後、CD8+系を上記のようなcDNAトランスフェクト腫瘍細胞にて試験する。ペプチドの特異性および同一性を決定して免疫学的な有効性を確認する。

【0149】

参考文献

Vitielloら(L.Sherman), J. Exp. Med., J. Exp. Med., 1991, 173:1007-1015。

【0150】

Romaniら, J. Exp. Med., 1994, 180:93-93。

【0151】

Kimら, J. Immunother., 1997, 20:276-286。

【0152】

Butterfieldら, J. Immunol., 1998, 161:5607-5613。

【0153】

本明細書に引用された全ての刊行物、例えば限定するものではないが、特許および特許出願などは、それぞれの刊行物が、あたかも完全に記載されているかの如く参照により本明細書に組み入れるものとする。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.

5 <120> Novel Compounds

<130> BC45226

10 <160> 68

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

15 <211> 3280

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 1

20	atggctgagc	ctgggacag	ccaccatctc	tccgccagag	tcagggggaag	aactgagagg	60
	cgcatatcccc	ggctgtggcg	gctgctgctc	tgggctggga	ccgccttcca	ggtgacccag	120
	ggaaocgggac	cggagcttca	tgctgcaaa	gagctctgag	accactatga	gtacacggcg	180
	tgtgacagca	cgggttccag	gtggagggtc	gccgtgccgc	ataccccggg	cctgtgcacc	240
	agcctgcctg	accccgctca	gggcacccag	tgctccttct	cctgcaacgc	cggggagttt	300
25	ctggatatga	aggaccagtc	atgtaagcca	tgctgagagg	gccgtacttc	cctcggcaca	360
	ggcatttcgt	ttgatgagtg	ggatgagctg	ccccatggct	ttgccagcct	ctcagccaac	420
	atggagctgg	atgacagtgc	tgctgagtc	accgggaact	gtacttcgtc	caagtgggtt	480
	ccccggggcg	actacatcgc	ctccaacacg	gacgaatgca	cagccacact	gatgtacgcc	540
	gtcaacctga	agcaatctgg	caccgttaac	ttcgaatact	actatccaga	ctccagcctc	600
30	atctttttagt	ttttcgttca	gaatgaccag	tgccagccca	atgcagatga	ctccaggttg	660
	tcaaataaag	cagagaaagg	atgggaattc	cacagtgtgg	agctaaatcg	aggcaataat	720
	gtcctctatt	ggagaaccac	agccttctca	gtatggacca	aagtacccaa	gcctgtgctg	780
	gtgagaaaca	ttgccataac	aggggtggcc	tacacttcag	aatgcttccc	ctgcaaacct	840
	ggcacgtatg	cagacaagca	gggctcctct	ttctgcaaac	tttgccagc	caactcttat	900
35	tcaaataaag	gagaaacttc	ttgccaccag	tgtgacctcg	acaaataact	agagaaagga	960
	tcttcttctc	gtaacgtgcg	cccagcttgc	acagacaaag	attatttcta	cacacacacg	1020
	gcctgcgatg	ccaacggaga	gacacaactc	atgtacaaat	gggccaagcc	gaaaatctgt	1080
	agcgaggacc	ttgagggggc	agtgaagctg	cctgcctctg	gtgtgaagac	ccactgcca	1140
	ccctgcaacc	caggcttctt	caaaacccaac	aacagcacct	gccagccctg	cccatatggg	1200
40	tctacttcca	atggctcaga	ctgtaccgcg	tgccctgcag	ggactgaacc	tgctgtggga	1260
	tttgaataca	aatggtggaa	cacgctgccc	acaaacatgg	aaacgaccgt	tctcagtggg	1320
	atcaacttcg	agtacaaggg	catgacaggg	tgggagggtg	ctgggtgatca	cattttacaca	1380
	getgctggag	cctcagacaa	tgacttcatg	attctcactc	tggttgtgcc	aggatttaga	1440
	cctccgcagt	cgggtgatggc	agacacagag	aataaagagg	tgccagagaat	cacattttgtc	1500
45	tttgagaccc	tctgttctgt	gaactgtgag	ctctacttca	tggtgggtgt	gaattctagg	1560
	accaacactc	ctgtggagac	gtggaaagggt	tccaaaggca	aacagtccta	tacctacatc	1620
	attgaggaga	acactaccac	gagcttcacc	tgggccttcc	agaggaccac	ttttcatgag	1680
	gcaagcagga	agtacacca	tgacgttgcc	aagatctact	ccatcaatgt	caccaatggt	1740
	atgaatggcg	tggtctccta	ctgccgtccc	tggtgccctag	aagcctctga	tggtggctcc	1800
50	tcttgcaact	cttgtctctg	tggttactat	attgaccgag	attcagggaac	ctgccactcc	1860
	tgccccctta	acacaattct	gaaagcccac	cagccttatg	gtgtccaggc	ctgtgtgccc	1920
	tggtgtccag	ggaccaagaa	caacaagatc	cactctctgt	gctacaatga	ttgcaccttc	1980
	tcacgcaaca	ctccaaccag	gactttcaac	tacaacttct	ccgctttggc	aaacacccgtc	2040
	actcttgctg	gagggccaag	cttcacttcc	aaaggggtga	aatacttcca	tcactttacc	2100
55	ctcagctctc	gtggaacca	gggtaggaaa	atgtctgtgt	gcaccgacaa	tgctactgac	2160
	ctccggattc	ctgagggtga	gtcagggttc	tccaaatcta	tcacagccta	cgtctgccag	2220
	gcagctatca	tccccccaga	ggtgacaggc	tacaaggccg	gggtttcttc	acagcctgtc	2280
	agccttgctg	atcgacttat	tggggtgaca	acagatatga	ctctggatgg	aatcacctcc	2340
	ccagctgaac	ttttccacct	ggagtccttg	ggaataccgg	acgtgatctt	cttttatagg	2400
60	tccaatgatg	tgacccagtc	ctgcagttct	gggagatcaa	ccaccatccg	cgtcagggtgc	2460
	agtccacaga	aaactgtccc	tggaagtttg	ctgctgccag	gaacgtgtctc	agatgggacc	2520
	tgtgatggct	gcaacttcca	cttctctgtg	gagagcgccg	ctgcttgccc	gctctgctca	2580

	gtggtgact	accatgctat	cgtcagcagc	tgtgtggctg	ggatccagaa	gactacttac	2640
	gtgtggcgag	aacccaagct	atgctctggt	ggcatttctc	tgctgagca	gagagtacc	2700
	atctgcaaaa	ccatagattt	ctggctgaaa	gtgggcatct	ctgcaggcac	ctgtactgcc	2760
5	atcctgctca	ccgtcttgac	ctgctacttt	tggaataaga	atcaaaaact	agagtacaag	2820
	tactccaagc	tggtgatgaa	tgctactctc	aaggactgtg	acctgccagc	agctgacagc	2880
	tgccccatca	tggaaggcga	ggatgtagag	gacgacctca	tctttaccag	caagaagtca	2940
	ctctttggga	agatcaaatc	atttacctcc	aagaggactc	ctgatggatt	tgactcagt	3000
	ccgctgaaga	catcctcagg	aggcccagac	atggacctgt	gagaggcact	gcctgcctca	3060
	cctgcctcct	caccttgcat	agcacctttg	caagcctcgc	gcgatttggg	tgccagcatc	3120
10	ctgcaacacc	cactgctgga	aatctcttca	ttgtggcctt	atcagatgtt	tgaatttcag	3180
	atcttttttt	atagagtacc	caaacctccc	tttctgcttg	cctcaaacct	gccaaatata	3240
	cccacacttt	gtttgtaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa			3280
	<210> 2						
15	<211> 1013						
	<212> PRT						
	<213> homo sapiens						
	<400> 2						
20	Met Ala Glu Pro Gly His Ser His His Leu Ser Ala Arg Val Arg Gly						
	1 5 10 15						
	Arg Thr Glu Arg Arg Ile Pro Arg Leu Trp Arg Leu Leu Leu Trp Ala						
	20 25 30						
25	Gly Thr Ala Phe Gln Val Thr Gln Gly Thr Gly Pro Glu Leu His Ala						
	35 40 45						
	Cys Lys Glu Ser Glu Tyr His Tyr Glu Tyr Thr Ala Cys Asp Ser Thr						
	50 55 60						
	Gly Ser Arg Trp Arg Val Ala Val Pro His Thr Pro Gly Leu Cys Thr						
	65 70 75 80						
30	Ser Leu Pro Asp Pro Val Lys Gly Thr Glu Cys Ser Phe Ser Cys Asn						
	85 90 95						
	Ala Gly Glu Phe Leu Asp Met Lys Asp Gln Ser Cys Lys Pro Cys Ala						
	100 105 110						
	Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Gly Thr Gly Ile Arg Phe Asp Glu Trp Asp						
35	115 120 125						
	Glu Leu Pro His Gly Phe Ala Ser Leu Ser Ala Asn Met Glu Leu Asp						
	130 135 140						
	Asp Ser Ala Ala Glu Ser Thr Gly Asn Cys Thr Ser Ser Lys Trp Val						
	145 150 155 160						
40	Pro Arg Gly Asp Tyr Ile Ala Ser Asn Thr Asp Glu Cys Thr Ala Thr						
	165 170 175						
	Leu Met Tyr Ala Val Asn Leu Lys Gln Ser Gly Thr Val Asn Phe Glu						
	180 185 190						
	Tyr Tyr Tyr Pro Asp Ser Ser Ile Ile Phe Glu Phe Phe Val Gln Asn						
45	195 200 205						
	Asp Gln Cys Gln Pro Asn Ala Asp Asp Ser Arg Trp Met Lys Thr Thr						
	210 215 220						
	Glu Lys Gly Trp Glu Phe His Ser Val Glu Leu Asn Arg Gly Asn Asn						
	225 230 235 240						
50	Val Leu Tyr Trp Arg Thr Thr Ala Phe Ser Val Trp Thr Lys Val Pro						
	245 250 255						
	Lys Pro Val Leu Val Arg Asn Ile Ala Ile Thr Gly Val Ala Tyr Thr						
	260 265 270						
	Ser Glu Cys Phe Pro Cys Lys Pro Gly Thr Tyr Ala Asp Lys Gln Gly						
55	275 280 285						
	Ser Ser Phe Cys Lys Leu Cys Pro Ala Asn Ser Tyr Ser Asn Lys Gly						
	290 295 300						
	Glu Thr Ser Cys His Gln Cys Asp Pro Asp Lys Tyr Ser Glu Lys Gly						
	305 310 315 320						
60	Ser Ser Ser Cys Asn Val Arg Pro Ala Cys Thr Asp Lys Asp Tyr Phe						
	325 330 335						
	Tyr Thr His Thr Ala Cys Asp Ala Asn Gly Glu Thr Gln Leu Met Tyr						

[illegible]

		835		840		845	
		Leu Trp Glu Ser Ala Ala Ala Cys Pro Leu Cys Ser Val Ala Asp Tyr					
		850		855		860	
5		His Ala Ile Val Ser Ser Cys Val Ala Gly Ile Gln Lys Thr Thr Tyr					
		865		870		875	880
		Val Trp Arg Glu Pro Lys Leu Cys Ser Gly Gly Ile Ser Leu Pro Glu					
			885		890		895
		Gln Arg Val Thr Ile Cys Lys Thr Ile Asp Phe Trp Leu Lys Val Gly					
			900		905		910
10		Ile Ser Ala Gly Thr Cys Thr Ala Ile Leu Leu Thr Val Leu Thr Cys					
			915		920		925
		Tyr Phe Trp Lys Lys Asn Gln Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Ser Lys Leu					
			930		935		940
		Val Met Asn Ala Thr Leu Lys Asp Cys Asp Leu Pro Ala Ala Asp Ser					
15			945		950		955
		Cys Ala Ile Met Glu Gly Glu Asp Val Glu Asp Asp Leu Ile Phe Thr					
			965		970		975
		Ser Lys Lys Ser Leu Phe Gly Lys Ile Lys Ser Phe Thr Ser Lys Arg					
			980		985		990
20		Thr Pro Asp Gly Phe Asp Ser Val Pro Leu Lys Thr Ser Ser Gly Gly					
			995		1000		1005
		Pro Asp Met Asp Leu					
		1010					
25		<210> 3					
		<211> 677					
		<212> DNA					
		<213> homo sapiens					
30		<400> 3					
		ttttttaatt tacaacaaaa gtgtgggtat atttggcagg tttgaggcaa gcagaaagga				60	
		gggtttgggt actctataaa aaaagatctg aaattcaaac atctgataag gccacaatga				120	
		agagatttcc agcagtgggt gttgcaggat gctggcacc aaatcgccgc acgttgcaaa				180	
		ggtgctatgc aaggtgagga ggcaggtgag gcaggcagtg cctctcacag gtccatgtct				240	
35		gggcctcctg aggatgtctt cagcggcact gagtcaaacc catcaggagt cctcttgag				300	
		gtaaatgatt tgatcttccc aaagagtgc ttcttgctgg taaagatgag gtcgtcctct				360	
		acatcctcgc cttccatgat ggcgcagtgt cagctgctgg caggtcacag tccttgagag				420	
		tagcattcat caccagcttg gactacttgt actctagttt ttgattcttt ttccaaaagt				480	
		agcaggtcaa gacggtgagc aggatggcag tacaggtgcc tgcagagatg cccactttca				540	
40		gccagaaatc tatggttttg cagatggtga ctctctgctc aggcagagaa atgccaccag				600	
		agcatagctt gggttctcgc cacacgtaag tagtcttctg gatcccagcc acacagctgc				660	
		tgacgatagc atggtag				677	
		<210> 4					
45		<211> 105					
		<212> PRT					
		<213> homo sapiens					
		<400> 4					
50		Tyr His Ala Ile Val Ser Ser Cys Val Ala Gly Ile Gln Lys Thr Thr					
		1 5 10 15					
		Tyr Val Trp Arg Glu Pro Lys Leu Cys Ser Gly Gly Ile Ser Leu Pro					
		20 25 30					
55		Glu Gln Arg Val Thr Ile Cys Lys Thr Ile Asp Phe Trp Leu Lys Val					
		35 40 45					
		Gly Ile Ser Ala Gly Thr Cys Thr Ala Ile Leu Leu Thr Val Leu Thr					
		50 55 60					
		Cys Tyr Phe Trp Lys Lys Asn Gln Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Ser Lys					
		65 70 75 80					
60		Leu Val Met Asn Ala Thr Leu Lys Asp Cys Asp Leu Pro Ala Ala Asp					
		85 90 95					
		Thr Ala Pro Ser Trp Lys Ala Arg Met					

	100	105
	<210> 5	
	<211> 9	
5	<212> PRT	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 5	
10	Arg Leu Trp Arg Leu Leu Trp Ala	
	1 5	
	<210> 6	
	<211> 9	
15	<212> PRT	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 6	
20	Ser Leu Ala Asp Arg Leu Ile Gly Val	
	1 5	
	<210> 7	
	<211> 9	
25	<212> PRT	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 7	
30	Ser Leu Pro Glu Gln Arg Val Thr Ile	
	1 5	
	<210> 8	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial Sequence	
35	<400> 8	
	Lys Leu Cys Ser Gly Gly Ile Ser Leu	
	1 5	
40	<210> 9	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 9	
45	Ala Ala Ala Cys Pro Leu Cys Ser Val	
	1 5	
	<210> 10	
	<211> 9	
50	<212> PRT	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 10	
55	Ser Ala Leu Ala Asn Thr Val Thr Leu	
	1 5	
	<210> 11	
	<211> 9	
60	<212> PRT	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 11	

```

Phe Val Phe Glu Thr Leu Cys Ser Val
1      5

5      <210> 12
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 12
10     Glu Leu Pro His Gly Phe Ala Ser Leu
      1      5

      <210> 13
      <211> 9
15     <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 13
20     Leu Ile Phe Thr Ser Lys Lys Ser Leu
      1      5

      <210> 14
      <211> 9
25     <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 14
30     Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Ser Lys Leu
      1      5

      <210> 15
      <211> 9
      <212> PRT
35     <213> Artificial Sequence

      <400> 15
      Lys Thr Ile Asp Phe Trp Leu Lys Val
      1      5

40     <210> 16
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 16
45     Ser Val Ala Asp Tyr His Ala Ile Val
      1      5

      <210> 17
50     <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 17
55     Leu Leu Leu Pro Gly Thr Cys Ser Asp
      1      5

      <210> 18
60     <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

```

```

      <400> 18
Ala Leu Ala Asn Thr Val Thr Leu Ala
 1              5

5      <210> 19
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

10     <400> 19
Thr Leu Cys Ser Val Asn Cys Glu Leu
 1              5

15     <210> 20
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

20     <400> 20
Asn Thr Asp Glu Cys Thr Ala Thr Leu
 1              5

25     <210> 21
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

30     <400> 21
Ser Leu Pro Asp Pro Val Lys Gly Thr
 1              5

35     <210> 22
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

40     <400> 22
Ser Leu Phe Gly Lys Ile Lys Ser Phe
 1              5

45     <210> 23
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

50     <400> 23
Cys Thr Ala Ile Leu Leu Thr Val Leu
 1              5

55     <210> 24
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

60     <400> 24
Ile Val Ser Ser Cys Val Ala Gly Ile
 1              5

60     <210> 25
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

```

```

      <400> 25
Lys Met Ser Val Cys Thr Asp Asn Val
 1               5
5
      <210> 26
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
10
      <400> 26
Val Leu Val Arg Asn Ile Ala Ile Thr
 1               5
15
      <210> 27
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
20
      <400> 27
Glu Leu Asn Arg Gly Asn Asn Val Leu
 1               5
25
      <210> 28
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
30
      <400> 28
Ala Thr Leu Met Tyr Ala Val Asn Leu
 1               5
35
      <210> 29
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
40
      <400> 29
Val Ala Val Pro His Thr Pro Gly Leu
 1               5
45
      <210> 30
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
50
      <400> 30
Arg Leu Trp Arg Leu Leu Leu Trp Ala
 1               5
55
      <210> 31
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
60
      <400> 31
Ser Ala Gly Thr Cys Thr Ala Ile Leu
 1               5
      <210> 32
      <211> 9
      <212> PRT

```



```

      <213> Artificial Sequence

      <400> 32
5      Gly Ile Ser Leu Pro Glu Gln Arg Val
      1                               5

      <210> 33
      <211> 9
      <212> PRT
10      <213> Artificial Sequence

      <400> 33
      Lys Thr Val Pro Gly Ser Leu Leu Leu
      1                               5
15

      <210> 34
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
20

      <400> 34
      Arg Leu Ile Gly Val Thr Thr Asp Met
      1                               5
25

      <210> 35
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
30

      <400> 35
      Thr Leu Ala Gly Gly Pro Ser Phe Thr
      1                               5
35

      <210> 36
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 36
40      Tyr Ile Ile Glu Glu Asn Thr Thr Thr
      1                               5

      <210> 37
      <211> 9
      <212> PRT
45      <213> Artificial Sequence

      <400> 37
      Ile Ala Ile Thr Gly Val Ala Tyr Thr
      1                               5
50

      <210> 38
      <211> 9
      <212> PRT
55      <213> Artificial Sequence

      <400> 38
      Val Thr Gln Gly Thr Gly Pro Glu Leu
      1                               5
60

      <210> 39
      <211> 10

```

```

      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 39
5      Ser Leu Phe Gly Lys Ile Lys Ser Phe Thr
      1              5              10

      <210> 40
      <211> 10
10     <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 40
15     Ala Ile Val Ser Ser Cys Val Ala Gly Ile
      1              5              10

      <210> 41
      <211> 10
20     <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 41
25     Ser Ala Ala Ala Cys Pro Leu Cys Ser Val
      1              5              10

      <210> 42
      <211> 10
30     <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 42
35     His Leu Glu Ser Leu Gly Ile Pro Asp Val
      1              5              10

      <210> 43
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

40     <400> 43
      Lys Ile Tyr Ser Ile Asn Val Thr Asn Val
      1              5              10

      <210> 44
      <211> 10
45     <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 44
50     Ser Leu Ala Asp Arg Leu Ile Gly Val Thr
      1              5              10

      <210> 45
      <211> 10
55     <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 45
60     Ile Leu Lys Ala His Gln Pro Tyr Gly Val
      1              5              10

      <210> 46

```

```

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

5      <400> 46
      Val Met Ala Asp Thr Glu Asn Lys Glu Val
        1              5              10

      <210> 47
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 47
15     Leu Leu Trp Ala Gly Thr Ala Phe Gln Val
        1              5              10

      <210> 48
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 48
25     Gly Thr Cys Thr Ala Ile Leu Leu Thr Val
        1              5              10

      <210> 49
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

30     <400> 49
      Ile Thr Ser Pro Ala Glu Leu Phe His Leu
        1              5              10

35     <210> 50
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

40     <400> 50
      Leu Ile Gly Val Thr Thr Asp Met Thr Leu
        1              5              10

45     <210> 51
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

50     <400> 51
      Thr Leu Pro Thr Asn Met Glu Thr Thr Val
        1              5              10

      <210> 52
55     <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 52
60     Leu Met Tyr Lys Trp Ala Lys Pro Lys Ile
        1              5              10

```

```

      <210> 53
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence
5
      <400> 53
      Asp Leu Ile Phe Thr Ser Lys Lys Ser Leu
      1           5           10

10
      <210> 54
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

15
      <400> 54
      Gly Leu Lys Tyr Phe His His Phe Thr Leu
      1           5           10

20
      <210> 55
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

25
      <400> 55
      Gly Thr Lys Asn Asn Lys Ile His Ser Leu
      1           5           10

30
      <210> 56
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

35
      <400> 56
      Ser Asp Asn Asp Phe Met Ile Leu Thr Leu
      1           5           10

40
      <210> 57
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

45
      <400> 57
      Leu Val Arg Asn Ile Ala Ile Thr Gly Val
      1           5           10

50
      <210> 58
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

55
      <400> 58
      Gly Leu Cys Thr Ser Leu Pro Asp Pro Val
      1           5           10

60
      <210> 59
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial Sequence

      <400> 59
      Thr Leu Lys Asp Cys Asp Leu Pro Ala Ala
      1           5           10

```

```

    <210> 60
    <211> 10
    <212> PRT
5    <213> Artificial Sequence

    <400> 60
Val Ile Phe Phe Tyr Arg Ser Asn Asp Val
  1             5             10
10

    <210> 61
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence
15

    <400> 61
Ser Ile Thr Ala Tyr Val Cys Gln Ala Val
  1             5             10
20

    <210> 62
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence
25

    <400> 62
Ser Val Cys Thr Asp Asn Val Thr Asp Leu
  1             5             10
30

    <210> 63
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence
35

    <400> 63
Ser Leu Cys Gly Asn Gln Gly Arg Lys Met
  1             5             10
40

    <210> 64
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence
45

    <400> 64
Asn Met Glu Thr Thr Val Leu Ser Gly Ile
  1             5             10
50

    <210> 65
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence
55

    <400> 65
Asn Ile Ala Ile Thr Gly Val Ala Tyr Thr
  1             5             10
60

    <210> 66
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

    <400> 66
Gly Ile Arg Phe Asp Glu Trp Asp Glu Leu

```

	1	5	10
	<210> 67		
	<211> 10		
5	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<400> 67		
	Phe His Phe Leu Trp Glu Ser Ala Ala Ala		
10	1	5	10
	<210> 68		
	<211> 9		
	<212> PRT		
15	<213> Artificial Sequence		
	<400> 68		
	Phe Leu Trp Glu Ser Ala Ala Ala Cys		
20	1	5	

SEQUENCE INFORMATION

SEQ ID NO:1

5 atggctgagcctgggcacagccaccatctctccgccagagtcaggggaagaactgagaggcgcataccccggtgtggcg
 gctgctgctctgggctgggaccgccttccaggtagccagggaacgggaccggagcttcatgctgcaaagagtctgagt
 accactatgagtacacggcgtgtgacagcacgggttccaggtaggggtcgccgtgcccgcataccccgggctgtgcacc
 agcctgctgacccgtcaagggcaccgagtgctccttctcctgcaacgcggggagtttctggatatgaaggaccagtc
 atgtaagccatgcgctgagggccgctactcctcggcacaggcattcggtttgatgagtgaggatgagctgccccatggct
 10 ttgccagcctctcagccaacatggagctggatgacagtgctgctgagtcacccgggaactgtacttcgtccaagtgggtt
 ccccgggggcactacatcgctccaacacggacgaatgcacagccacactgatgtacggcgtcaacctgaagcaatctgg
 caccgttaacttcgaatactactatccagactccagcatcatcttctgagttttctggtcagaatgaccagtgccagccca
 atgacagatgactccaggtaggaagaccagagaaaggatgggaattccacagtggtggagctaaatcgaggcaataat
 gtccctctattggagaaccacagccttctcagtagtgaccaaagtagcccaagcctgtgctggtgagaacattgccataac
 15 aggggtggcctacacttcagaatgcttccctgcaaacctggcacgtatgcagacaagcagggtcctcttctgcaaac
 tttgcccagccaactcttattcaataaaggagaaaacttctgcccaccagtgtagccctgacaaatactcagagaaagga
 tcttcttctgtgaacgtgcgcccagcttgacagacaagattatttctacacacacacggcctgcgatgccaacgggaga
 gacacaactcatgtacaaatgggccaagccgaaaatctgtagcgaggacctgagggggcagtgaaagctgcctctg
 gtgtgaagaccactgcccaccctgcaaccaggtcttctcaaaaccaacaacagcacctgccagcctgcccataatggt
 20 tccactccaatggctcagactgtacccgtgcctgcaggagactgaacctgctgtgggatttgaaatacaaatggtggaa
 cacgctgcccacaaaatggaaacgaccgttctcagtggtgataacttcagtagcaaggcatgacaggctgggaggtgg
 ctgggtgatcacatttacacagctgtgtagcctcagacaatgacttcatgattctcactctggttgtgcccaggatttaga
 cctccgcagtcggtgatggcagacacagagaataaagggtggccagaatcacatttgtctttgagaccctctgttctgt
 gaactgtgagctctacttcatggtgggtgtgaattctaggaccaacactcctgtggagacgtggaagggttccaaaggca
 25 aacagtcctatactacatcattgaggagaactaccacagagcttcaacctgggccttccagaggaccacttttcatgag
 gcaagcaggaagtacaccaatgacgttgccaagatctactccatcaatgtcaccaatgttatgaatggcgtggcctccta
 ctgcccgtccctgtgcccaggaagcctctgatgtgggctcctcctgcacctcttgtcctgctggttactatattgaccgag
 attcaggaacctgcccactcctgccccctaacacaattctgaaagcccaccagccttatggtgtccaggcctgtgtgccc
 tgtggtccagggaaccaagaacaacaagatccactctctgtgtacaaatgatgacacctctcacgcaaacactccaaccag
 30 gactttcaactacaacttctccgctttggcaaacacgtcactcttctgtggaggccaagcttcaacttccaaagggttga
 aatactttccatcactttaccctcagctctctgtggaaacagggttaggaaaatgtctgtgtgcaccgacaatgtcactgac
 ctccggattcctgaggggtgagtcagggttctccaaatctatcacagcctacgtctgccaggcagtcacatccccccaga
 ggtgacaggctacaaggccggggttctcctcacagcctgtcagccttgtgtgacttattgggggtgacaacagatatga
 ctctggatggaatcacctccccagctgaacttttccacctggagtccttgggaataccggacgtgatcttcttttatagg
 35 tccaatgatgtgacccagtcctgcagttctgggagatcaaccaccatccgctcaggtgcagtcacagaaaactgtccc
 tggaaagtgtgctgctgccaggaaacgtgctcagatgggacctgtgatggctgcaacttccacttctgtgggagagcgcg
 ctgcttgcccgtctgtctcagtggtgactaccatgctatcgtcagcagctgtgtggctgggatccagaagactacttac
 gtgtggcgagaaccaagctatgctctggtggcatcttctgcccgtgagcagagagtcaccatctgcaaaaaccatagattt
 ctgggtgaaagtgggcatctctgcaggcacctgtactgccatcctgctcaccgtcttgacctgtacttttggaaaaaga
 40 atcaaaaactagagtacaagtactccaagctgggtgatgaatgctactctcaaggactgtgacctgccagcagctgacagc
 tgcgccatcatggaaggcgaggatgtagaggacgacctcatcttaccagcaagaagtactcttgggaagatcaaatc
 atttacctccaaggagactcctgatggatttgactcagtgccgtgaagacatcctcaggaggccagacatggacctgt

gaGAGGCACTGCCTGCCTCACCTGCCTCCTCACCTTGCCATAGCACCTTTGCAAGCCTGCGGCGATTGGGTGCCAGCATC
CTGCAACACCCACTGCTGGAAATCTCTTATTGTGGCCTTATCAGATGTTTGAATTTTCCAGATCTTTTTTATAGAGTACC
CAAACCTCCTTTCTGCTTGCTCAAACCTGCCAAATATACCCACACTTTGTTTGTAAAAaaAAAAAAAAAAAAAAAAA

5 **SEQ ID NO:2**

MAEPGHSHLSARVRGRTERRIPLRWRLLLWAGTAFQVTQGTGPELHACKESEYHYEYACDSTGSRWRVAVPHTPGLCT
SLPDEVKGTSCFSNAGEFLDMKQSCKPCAEGRYSLGTGIRFDEWDELPHGFASLSANMELDDSAESTGNCSTSSKNV
PRGDYIASNTDECTATLMYAVNLKQSGTVNFEYYPDSSIIFFVQNDQCQPNADDSRWMTTEKGFHSVELNRGNN
VLYWRRTAFPSVWTKVPVLRNIAITGVAYTSECFPCPKPGTYADKQSSFCCLCPANSYSNKGETSCHQCDPKYSEKG
10 SSSCNVRPACTDKDYFYTHTACDANGETQLMYKWKPKICSEDLEGAVKLPASGVKTHCPPCNPFGFKTNNSTCQPCPYG
SYNSGSDCTRCPCAGTEPAVGFEYKWWNTLPTNMETTSLGINSFEYKGMTGWEVAGDHIYTAAGASDNDFMILTLVVPGR
PPQVMADTENKEVARITFVFETLCSVNCELYFMVGVSRTNTPVETWKGSKGQSYTYIIIEENTTSFTWAFQRTTFHE
ASRKYTNDAKIYSINVTNMNGVASYCRPCALEASDVGSCTSCPAGYYIDRSGTCHSCPPNTILKAHQPYGVQACVP
CGPGTKNNKIHSCLYNDCTFSRNTPTRTFNYSALANTVTLAGGFSFTSKGLKYFHHFTLSLCGNQGRKMSVCTDNVTD
15 LRIPEGESGFSKISITAYVCQAVIIFFEVGTGYKAGVSQPVSLADRLIGVTTDMTLDGITSPAELFHLESIGIPDVIFFYR
SNDVTQSCSSGRSTTIRVRCSPQKTVPGSLLLPGTCDGTCGDNFHLWESAAACPLCSVADYHAIVSSCVAGIQKTTY
VWREPKLCSGGISLPEQRTVICKTIDFWLKVGISAGTCTAILLTVLTCYFWKKNQKLEYKYSKLVMNATLKDCLPAADS
CAIMEGEDVEDDLIFTSKSLFGKIKSFTSKRTPDGFDVPLKTS SGGPDMDL

20 **SEQ ID NO:3**

TTTTTTAATTTACAAACAAAGTGTGGGTATATTTGGCAGGTTTGAGGCAAGCAGAAAGGAGGGTTTGGGTAC
TCTATAAAAAAGATCTGAAATTCAAACATCTGATAAGGCCACAATGAAGAGATTTCCAGCAGTGGGTGTG
25 CAGGATGCTGGCACCCAAATCGCCGCACGTGCAAAGGTGCTATGCAAGGTGAGGAGGCAGGTGAGGCAGGC
AGTGCTCTCACAGGTCCATGTCTGGGCCCTCTGAGGATGTCTTCAGCGGCACGTGAGTCAAATCCATCAGGA
GTCTCTTGGAGGTAAATGATTTGATCTTCCCAAAGAGTGACTTCTTGCTGGTAAAGATGAGGTGCTCCTCT
ACATCCTCGCCTTCCATGATGGCGCAGTGTGAGCTGCTGGCAGGTACAGTCCCTTGAGAGTAGCATTATCA
CCAGCTTGGAGTACTTGTACTCTAGTTTTTGTATTCTTTTCCAAAGTAGCAGGTCAAGACGGTGAGCAGGA
30 TGGCAGTACAGGTGCCTGCAGAGATGCCACTTTTCAGCCAGAAATCTATGGTTTTGCAGATGGTACTCTCT
GCTCAGGCAGAGAAATGCCACCAGAGCATAGCTTGGGTTCTCGCCACACGTAAGTAGTCTTCTGGATCCCAG
CCACACAGCTGCTGACGATAGCATGGTAG

SEQ ID NO:4

35 YHAIYSSCVAGIQKTTYVWREPKLCSGGISLPEQRTVICKTIDFWLKVGISAGTCTAILLTVLTCYF
WKKNQKLEYKYSKLVMNATLKDCLPAADTAPSWKARM

【図面の簡単な説明】

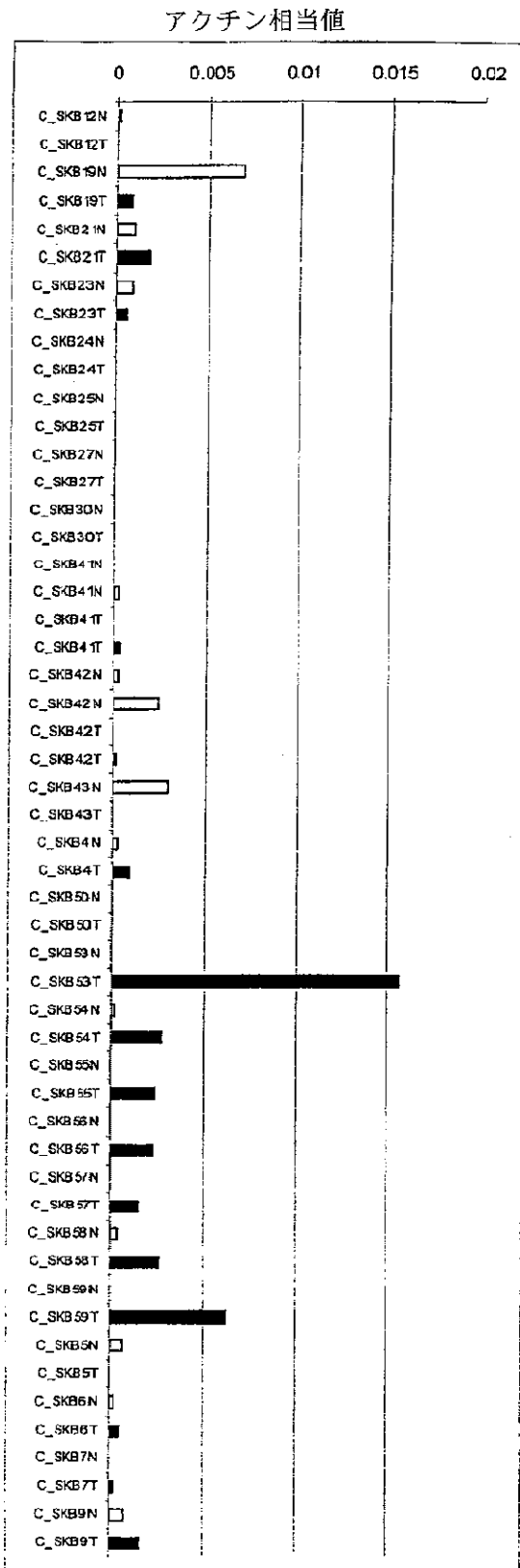
【図1】

図1は、対応する大腸の正常および腫瘍サンプルに関するリアルタイムPCRデータを示す。

【図2】

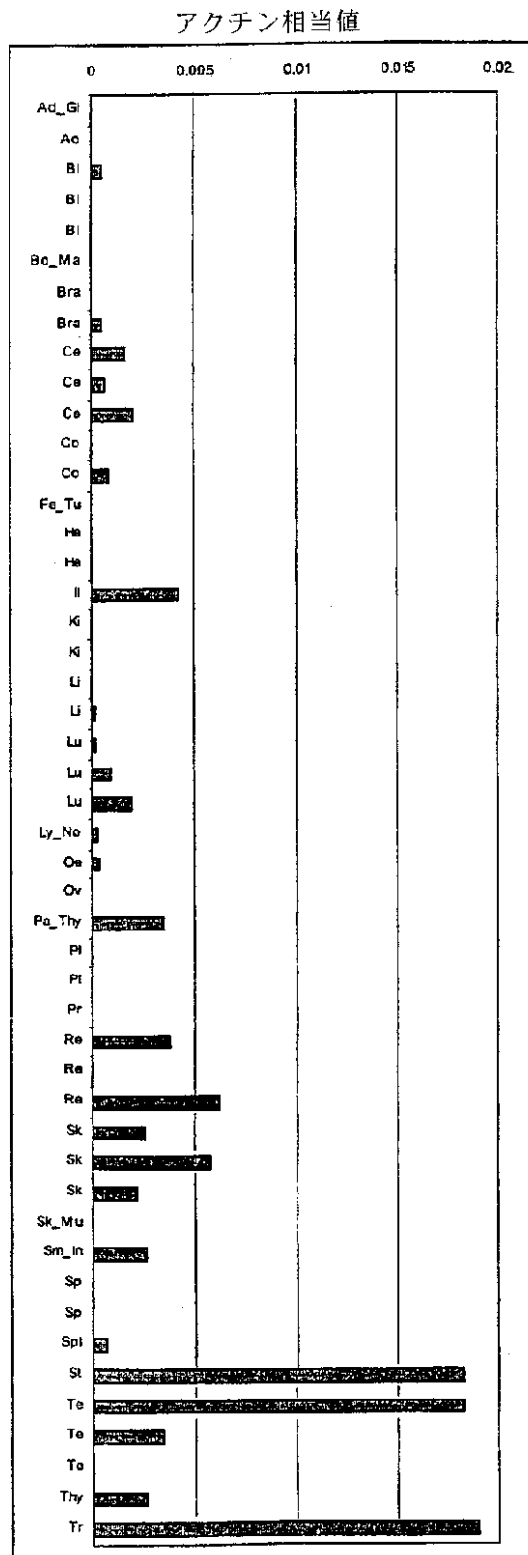
正常組織におけるCASB619のリアルタイムPCRデータを示す。

【図1】



対応する大腸の正常サンプル
および腫瘍サンプルに関する
リアルタイムPCRデータ

【図2】



正常組織における

CASB619のリアルタイムPCRデータ

記号説明

Ad_Gl:副腎、Ao:大動脈、Bl:膀胱、
 Bo_Ma:骨髓、Bra:脳、Ce:子宮頸部、
 Co:大腸、Fa_Tu:ファローピウス管、
 He:心臓、Il:回腸、Ki:腎臓、
 Li:肝臓、Lu:肺、Ly_No:リンパ節、
 Oe:食道、Ov:卵巣、Pa_Thy:上皮小体、
 Pl:胎盤、Pr:前立腺、Re:直腸、
 Sk:皮膚、Sk_Mu:骨格筋、Sp:脾臓、
 St:胃、Te:精巣、Thy:甲状腺、Tr:気管

【手続補正書】

【提出日】 平成13年10月9日（2001. 10. 9）

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項2】 アミノ酸配列が配列番号2に対して少なくとも95%の同一性を有するものである、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 配列番号2の単離されたポリペプチド。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫原性断片を含んでなるポリペプチドであって、（必要な場合には担体に結合しており）、配列番号2のポリペプチドを認識する免疫応答を引き起こし得るものである、上記ポリペプチド。

【請求項6】 ポリペプチドがより大きな融合タンパク質の一部である、請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項7】 担体タンパク質に化学的に結合された、請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項8】 請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項9】 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、または単離された該ポリヌクレ

オチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項10】 コード領域全体にわたって配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、または単離された該ポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項11】 配列番号1の全長にわたって配列番号1のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、または単離された該ポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 前記同一性が少なくとも95%である、請求項8～11のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項13】 以下の(a)～(c)から選択される単離されたポリヌクレオチド：

(a) 配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1のポリヌクレオチド；および

(c) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1の配列もしくはその断片を有する標識プローブを用いて適当なライブラリーをスクリーニングすることによって得られるポリヌクレオチドであって、配列番号2のタンパク質を認識する免疫応答を引き起こし得るタンパク質（必要な場合には担体に結合している）をコードしている該ポリヌクレオチド；

または単離された該ポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列。

【請求項14】 請求項8～13のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項15】 請求項14に記載の発現ベクターを含む組換え生存微生物。

【請求項16】 請求項15に記載の発現ベクターまたは請求項8～13のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項17】 請求項16に記載の宿主細胞を、請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドを産生させるのに十分な条件下で培養し、その培養培地から該ポリペプチドを回収することを含む、前記ポリペプチドの製造方法。

【請求項18】 有効量の請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドおよび製薬上許容される担体を含むワクチン。

【請求項19】 有効量の請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドおよび製薬上許容される担体を含むワクチン。

【請求項20】 請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドをin vitroで加えることにより改変したか、または請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現するようにin vitroで遺伝的に改変した、有効量の抗原提示細胞、および製薬上許容される担体を含むワクチン。

【請求項21】 TH-1誘導アジュバントをさらに含む、請求項18～20のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項22】 TH-1誘導アジュバントが、3D-MPL、QS21、QS21とコレステロールの混合物、およびCpGオリゴヌクレオチドを含むアジュバントの群から選択される、請求項21に記載のワクチン。

【請求項23】 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは免疫原性断片に対して免疫特異的な抗体。

【請求項24】 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドの機能を刺激または抑制する化合物を同定するためのスクリーニング法であって、

(a) 候補化合物と、上記ポリペプチド（または該ポリペプチドを担持している細胞もしくはその膜）またはその融合タンパク質との結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合させた標識により測定すること、

(b) 候補化合物と、上記ポリペプチド（または該ポリペプチドを担持している細胞もしくはその膜）またはその融合タンパク質と、の結合を、標識競合物質の存在下で測定すること、

(c) 候補化合物が上記ポリペプチドの活性化または抑制により生ずるシグナルをもたらすか否かを、該ポリペプチドを担持している細胞または細胞膜に適した検出系を用いて調べること、

(d) 候補化合物と、請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む溶液とを一緒にして混合物を調製し、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定して、該混合物の活性をスタンダードと比較すること、または

(e) 候補化合物が細胞における上記ポリペプチドをコードするmRNAおよび該ポリペプチドの産生に及ぼす効果を例えばELISAアッセイを用いて検出すること

、

よりなる群から選択される方法を含んでなるスクリーニング法。

【請求項25】 請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを哺乳動物の免疫系に由来する細胞と共にin vitroでインキュベートすることにより、請求項1～5のいずれか1項に記載の分子に対する免疫応答をin vitroで誘導すること、およびそれらの活性化免疫細胞を疾病の治療のために該哺乳動物に再注入することを含む、免疫学的予防または治療による被験体の処置方法。

【請求項26】 前記処置が卵巣癌または大腸癌に対するものである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項28】 治療上使用するための、以下の(a)～(c)のいずれかである化合物：

(a) 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニスト；

(b) 請求項8～13のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド；または

(c) 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現をモジュレートする核酸分子。

【請求項29】 被験体から得られたサンプル中の請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチドの存在または量を分析することを含む、該被験体における該ポリペプチドの発現または活性に関連した該被験体の疾病または該疾病への罹りやすさを診断する方法。

【請求項30】 被験体から得られたサンプル中の請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの存在または量を分析することを含む、該被験体における該ポリヌクレオチドの発現または活性に関連した該被験体の疾病または該疾病への罹りやすさを診断する方法。

【請求項31】 疾病が卵巣癌または大腸癌である請求項29に記載の方法。
。

【請求項32】 疾病が卵巣癌または大腸癌である請求項30に記載の方法。
。

【請求項33】 以下の(a)～(c)からなる群から選択される単離されたポリヌクレオチド：

(a) 配列番号3の全長にわたって配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(b) 配列番号3のポリヌクレオチドを含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(c) 配列番号3のポリヌクレオチド。

【請求項34】 請求項14に記載の発現ベクターまたは請求項15に記載の組換え生存微生物を含む生ワクチン組成物。

【請求項35】 癌腫の治療における医薬を製造するための請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項36】 大腸癌または卵巣癌の治療における医薬を製造するための請求項8～13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項37】 癌腫の治療における医薬を製造するための請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項38】 大腸癌または卵巣癌の治療における医薬を製造するための請求項1～7のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC 1/ EP 00/02478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 C07K16/30	C07K14/705 C12N15/11 A61K38/17 //A61P35/00 C12Q1/68 G01N33/68
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 C07K A61K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, STRAND, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 06548 A (LACROIX BRUNO ;DUCLERT AYMERIC (FR); GENSET (FR); DUMAS MILNE EDWA) 11 February 1999 (1999-02-11) see SEQ ID 51 claims	5-18,22, 27,29,33
X	"ak13d08.s1 Soares_parathyroid_tumor NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1405839 3', mRNA sequence" EMBL DATABASE ACCESSION NUMBER AA890726, 6 April 1998 (1998-04-06), XP002141255 the whole document --- -/--	5,8,13, 32
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 July 2000		13.07.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC./EP 00/02478

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"q016g05.x1 NCI CGAP Lu5 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1908728 3', mRNA sequence" EMBL DATABASE ACCESSION NUMBER AI301140, 4 December 1998 (1998-12-04), XP002141256 the whole document ---	5,8,13, 32
A	WO 95 17209 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ;MOMIN PATRICIA MARIE (BE); GARCON NATHA) 29 June 1995 (1995-06-29) the whole document ---	17-21
X,P	WO 99 54461 A (SCHMITT ARMIN ;SPECHT THOMAS (DE); DAHL EDGAR (DE); HINZMANN BERND) 28 October 1999 (1999-10-28) see SEQ IDs 11 and 173 claims ---	5-18,22, 27,29, 32,33
P,X	"we72g04.x1 Soares Dieckgraefe colon NHCD Homo sapiens cDNA cTone IMAGE:2346678 3', mRNA sequence" EMBL DATABASE ACCESSION NUMBER AI672868, 19 May 1999 (1999-05-19), XP002141254 the whole document ---	5,8,13
P,X	OHARA, O. ET AL.: "Homo sapiens mRNA for KIAA1324 protein, partial cds" EMBL DATABASE ACCESSION NUMBER AB037745, 14 March 2000 (2000-03-14), XP002141282 the whole document -& NAGASE, T. ET AL.: "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes.XVI. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro" DNA RES., vol. 7, February 2000 (2000-02), pages 65-73, XP000923011 -----	5,8,13, 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/02478

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 26
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
The (ant)agonist of claims 26 and 27(a) are not characterised enough as to allow a meaningful search.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 26

The (ant)agonist of claims 26 and 27(a) are not characterised enough as to allow a meaningful search.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC, EP 00/02478

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9906548 A	11-02-1999	AU 8554798 A EP 1000146 A	22-02-1999 17-05-2000
WO 9517209 A	29-06-1995	AT 177322 T AU 1316495 A AU 687494 B AU 1316695 A AU 705521 B AU 6803198 A AU 705519 B AU 6803298 A CA 2179779 A CN 1138298 A DE 69417063 D DE 69417063 T WO 9517210 A EP 0735898 A EP 0868918 A ES 2129801 T GR 3029750 T JP 9506887 T NZ 277802 A SG 49257 A SI 735898 T ZA 9410176 A	15-03-1999 10-07-1995 26-02-1998 10-07-1995 27-05-1999 09-07-1998 27-05-1999 09-07-1998 29-06-1995 18-12-1996 15-04-1999 28-10-1999 29-06-1995 09-10-1996 07-10-1998 16-06-1999 30-06-1999 08-07-1997 27-04-1998 18-05-1998 30-06-1999 17-11-1995
WO 9954461 A	28-10-1999	DE 19817948 A	21-10-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/47	16/18	4 C 0 8 6
	16/18	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15	1/19	
	1/19	1/21	
	1/21	C 1 2 P 21/02	C
	5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P	21/02	1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N 33/15	Z
	1/68	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	33/53	D
	33/50		M
	33/53	33/574	A
			Z
	33/574	37/00	1 0 2
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
	37/00	1 0 2	

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

(72)発明者 カッサート, ジャンーボル
ベルギー国 リキセンザール ビー
1330, ルー デ ランスティテュート
89, スミスクライン ビーチャム バイオ
ロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 コシェ, スィエリー
ベルギー国 リキセンザール ビー
1330, ルー デ ランスティテュート
89, スミスクライン ビーチャム バイオ
ロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ヴィナルシー デ バッソルス, カルロタ
ベルギー国 リキセンザール ビー
1330, ルー デ ランスティテュート
89, スミスクライン ビーチャム バイオ
ロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 DA12 DA13 DA14
DA36 DA77 DA80 FB02 FB03
FB07
4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 CA09
GA11 HA14 HA17
4B063 QA18 QA19 QQ53 QR56 QS35
4B064 AG31 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AB01 BA02 CA45
4C084 AA02 AA07 AA13
4C085 AA03 AA08 AA19 BA99 BB11
BB23 CC01 DD62 EE01 EE06
FF11 FF12 FF17
4C086 AA01 EA16 MA01 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA42
CA41 DA75 DA86 EA28 EA31
EA51 FA74

专利名称(译)	新規化合物		
公开(公告)号	JP2002539826A	公开(公告)日	2002-11-26
申请号	JP2000608741	申请日	2000-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	史克必成生物兴业ANONYME		
申请(专利权)人(译)	史克必成生物兴业ANONYME		
[标]发明人	ブルッククラウドインエルヴァイアマリー カッサートジャンボル コシェスイエリー ヴィナルシーデバツソルスカルロタ		
发明人	ブルック,クラウドイン,エルヴァイア,マリー カッサート,ジャン-ボル コシェ,スイエリー ヴィナルシー デ バツソルス,カルロタ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574 G01N37/00		
CPC分类号	C07K14/705 A01K2217/05 A61K38/00		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/00.H A61K39/39 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/574.A G01N33/574.Z G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.A C12N5 /00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045 /DA80 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063 /QR56 4B063/QS35 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C085/AA03 4C085/AA08 4C085 /AA19 4C085/BA99 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/CC01 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF11 4C085/FF12 4C085/FF17 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/NA14 4C086 /ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA42 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	1999007113 1999-03-26 GB 1999022858 1999-09-25 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了CASB619多肽和多核苷酸，以及通过重组技术产生这种多肽的方法。还公开了诊断CASB619多肽和多核苷酸的方法，以及用于预防和治疗癌症（特别是卵巢癌和结肠癌），自身免疫性疾病和相关病症的疫苗。

大腸腫瘍でCASB619を過剰発現している患者 (%)	大腸腫瘍における過剰発現の平均レベル (倍率)
16/24 (67%)	208