

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-271978

(P2008-271978A)

(43) 公開日 平成20年11月13日(2008.11.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4B063
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C085

審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 160 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-126447 (P2008-126447)
 (22) 出願日 平成20年5月13日 (2008.5.13)
 (62) 分割の表示 特願2002-586886 (P2002-586886) の分割
 原出願日 平成14年5月9日 (2002.5.9)
 (31) 優先権主張番号 09/852, 911
 (32) 優先日 平成13年5月9日 (2001.5.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/895, 814
 (32) 優先日 平成13年6月29日 (2001.6.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/012, 896
 (32) 優先日 平成13年12月10日 (2001.12.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 397069329
 コリクサ コーポレーション
 アメリカ合衆国 19808 デラウェア州, ウィルミントン, センターヴィルロード 2711 ザ ユナイテッド ステイツ コーポレーション, シーエスシー
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の治療及び診断のための組成物及び方法

(57) 【要約】

【課題】 癌、特に前立腺癌の治療及び診断のための組成物及び方法を提供する。

【解決手段】 1 又は複数の前立腺特異的ポリペプチド、その免疫原性部分、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞、及びそのようなポリペプチドを発現する細胞に特異的なT細胞、を含む組成物を提供する。

【選択図】 図1

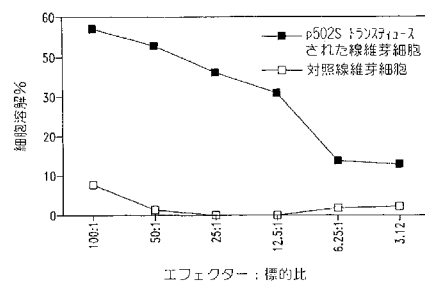


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号： 944-945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006-1007, 1010, 1013-1019, 1021, 1023-1027で提供される配列；

(b) 配列番号： 944-945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006-1007, 1010, 1013-1019, 1021, 1023-1027提供される配列の相補体；

(c) 配列番号： 944-945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006-1007, 1010, 1013-1019, 1021, 1023-1027で提供される配列の少なくとも20の連続した残基から成る配列；

(d) 配列番号： 944-945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006-1007, 1010, 1013-1019, 1021, 1023-1027で提供される配列に対して、高い緊縮条件下でハイブリダイズする配列；

(e) 配列番号： 944-945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006-1007, 1010, 1013-1019, 1021, 1023-1027の配列に対して少なくとも75%の同一性を有する配列；

(f) 配列番号： 944-945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006-1007, 1010, 1013-1019, 1021, 1023-1027の配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列；及び

(g) 配列番号： 944-945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006-1007, 1010, 1013-1019, 1021, 1023-1027で提供される配列の縮重変異体；

から成る群から選択された配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。 20

【請求項 2】

(a) 請求項 1 記載のポリヌクレオチドによりコードされる配列；

(b) 請求項 1 記載のポリヌクレオチドによりコードされる配列に対して少なくとも70%の同一性を有する配列；

(c) 請求項 1 記載のポリヌクレオチドによりコードされる配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列；

(d) 配列番号： 946-947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008-1009, 1011-1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033で提供される配列；

(e) 配列番号： 946-947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008-1009, 1011-1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033の配列に対して少なくとも70%の同一性を有する配列； 30

(f) 配列番号： 946-947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008-1009, 1011-1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033の配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列；

(g) 配列番号： 946-947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008-1009, 1011-1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033で提供される配列の少なくとも5の連続したアミノ酸から成る配列；

(h) 配列番号： 946-947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008-1009, 1011-1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033で提供される配列の少なくとも10の連続したアミノ酸から成る配列；及び 40

(i) 配列番号： 946-947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008-1009, 1011-1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033で提供される配列の少なくとも20の連続したアミノ酸から成る配列から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

発現制御配列に操作可能的に連結される請求項 1 記載のポリヌクレオチドを含んで成る発現ベクター。

【請求項 4】

請求項 3 記載の発現ベクターにより形質転換されるか又はトランスフェクトされた宿主細胞。

- 【請求項 5】
請求項 2 記載のポリペプチドに対して特異的に結合する単離された抗体、又はその抗原 - 結合フラグメント。
- 【請求項 6】
患者における癌の存在を検出するための方法であって、(a) 前記患者から生物学的サンプルを獲得し；
(b) 前記生物学的サンプルと、請求項 2 記載のポリペプチドに結合する結合剤とを接触せしめ；
(c) 前記結合剤に結合するポリペプチドの量を、前記サンプルにおいて検出し；そして
(d) 前記ポリペプチドの量を、前もって決定されたカット - オフ値に比較し、そしてそれから、患者における癌の存在を決定する段階を含んで成る方法。 10
- 【請求項 7】
請求項 2 記載の少なくとも 1 つのポリペプチドを含んで成る融合タンパク質。
- 【請求項 8】
配列番号：944-945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006-1007, 1010, 1013-1019, 1021, 1023-1027 で表される配列に対して、高い緊縮条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。
- 【請求項 9】
腫瘍タンパク質に対して特異的な T 細胞を刺激し、そして/又は拡張するための方法であって、 20
(a) 請求項 2 記載のポリペプチド；
(b) 請求項 1 記載のポリヌクレオチド；及び
(c) 請求項 1 記載のポリヌクレオチドを発現する抗原 - 提供細胞から成る群から選択された少なくとも 1 つの成分と T 細胞とを、T 細胞の刺激及び/又は拡張を可能にするのに十分な条件下で及び十分な時間、接触せしめることを含んで成る方法。
- 【請求項 10】
請求項 9 記載の方法に従って調製された T 細胞を含んで成る単離された T 細胞集団。
- 【請求項 11】
生理学的に許容できるキャリアー及び免疫刺激剤から成る群から選択された第 1 成分、 30
及び
(a) 請求項 2 記載のポリペプチド；
(b) 請求項 1 記載のポリヌクレオチド；
(c) 請求項 5 記載の抗体；
(d) 請求項 7 記載の融合タンパク質；
(e) 請求項 10 記載の T 細胞集団；及び
(f) 請求項 2 記載のポリペプチドを発現する抗原提供細胞から成る群から選択された第 2 成分を含んで成る組成物。
- 【請求項 12】
患者における免疫応答を刺激するための方法であって、請求項 11 記載の組成物を、前記患者に投与することを含んで成る方法。 40
- 【請求項 13】
患者における前立腺癌の処理方法であって、請求項 11 記載の組成物を、前記患者に投与することを含んで成る方法。
- 【請求項 14】
患者における癌の存在を決定するための方法であって、
(a) 前記患者から生物学的サンプルを獲得し；
(b) 前記生物学的サンプルと、請求項 8 記載のオリゴヌクレオチドとを接触せしめ；
(c) 前記オリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、前記サンプルにおいて検出し；そして 50

(d) 前記オリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、前もって決定されたカットオフ値に比較し、そしてそれから、前記患者における癌の存在を決定する段階を含んで成る方法。

【請求項 15】

請求項 8 記載の少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含んで成る診断用キット。

【請求項 16】

請求項 5 記載の少なくとも 1 つの抗体、及び受容体グループを含んで成る検出試薬を含んで成る診断用キット。

【請求項 17】

患者における前立腺癌を処置するための方法であって、

(a) (i) 請求項 2 記載のポリペプチド；(ii) 請求項 1 記載のポリヌクレオチド；及び(iii) 請求項 2 記載のポリペプチドを発現する抗原提供細胞から成る群から選択された少なくとも 1 つの成分と共に、患者から単離された $CD4^+$ 及び/又は $CD8^+$ T細胞を、T細胞が増殖するようインキュベートし；

(b) 有効量の前記増殖されたT細胞を、前記患者に投与し、そして、それにより、患者における癌の進行を阻害する段階を含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的に、癌、例えば前立腺癌の治療及び診断に関する。本発明はより特定には、前立腺 - 特異的タンパク質の少なくとも一部を含んで成るポリペプチド、及びそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。そのようなポリペプチド及びポリヌクレオチドは、医薬組成物、例えばワクチン、及び前立腺癌の診断及び処理のための他の組成物において有用である。

【背景技術】

【0002】

癌は世界中で有意な健康問題である。癌の検出及び治療の進歩が行われて来たが、ワクチン又は他の一般的に好結果をもたらす予防又は処理方法は入手できない。一般的に化学療法又は手術、及び放射線の組み合わせに基づかれる現在の治療は、多くの患者において不適切であることがわかっている。

前立腺癌は、男性問題での最も共通する形の癌であり、そして50歳以上の男性において30%の発生率が推定される。圧倒的な臨床学的証拠は、ヒト前立腺癌が骨に転移する性質を有し、そしてその疾病がアンドロゲン難治性状態にアンドロゲン依存性から不可避免的に進行し、高められた患者の死亡率を導くように思えることを示す。この一般的疾病は現在、アメリカ合衆国における男性間での癌死亡のうち第2の主要な原因である。

【0003】

疾病のための治療への相当な研究にもかかわらず、前立腺癌は処理するのに困難なまま存続する。通常、治療は手術及び/又は放射線治療法に基づかれているが、しかしそれらの方法は、有意な割合の患者において無効果である。2種のこれまで同定されている前立腺特異的タンパク質、すなわち前立腺特異的抗原(PSA)、及び前立腺(PSA)、及び前立腺ホスファターゼ(PAP)は、治療及び診断可能性を制限して来た。例えば、PSAレベルは、前立腺癌の存在と十分に必ずしも相互関係するものではなく、非前立腺患者、例えば良性前立腺過形成(BPH)の割合において陽性である。さらに、PSA測定は、前立腺体積と相互関係し、そして転移のレベルを示さない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

それらの及び他の癌についての治療への相当な研究にしてもかかわらず、前立腺癌は、効果的に診断し、そして処理するには困難のまま存続する。従って、そのような癌を検出し、そして処理するための改良された方法についての必要性が当業者に存在する。本発明

10

20

30

40

50

は、それらの必要性を満たし、そして他の関連する利点をさらに提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

1つの観点においては、本発明は、(a)配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 and 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027で提供される配列；

(b)配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 and 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027で提供される配列の相補体；

10

【0006】

(c)配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 及び 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618, 705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027で提供される配列の少なくとも20の連続した残基から成る配列；

20

(d)配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 及び 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027で提供される配列に対して、中位の緊縮条件下でハイブリダイズする配列；

【0007】

(e)配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 及び 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027の配列に対して少なくとも75%の同一性を有する配列；

30

(f)配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 及び 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027の配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列；及び

40

【0008】

(g)配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 及び 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027で提供される配列の縮重変異体；

から成る群から選択された配列を含んで成るポリヌクレオチド組成物を提供する。

【0009】

50

1つの好ましい態様においては、本発明のポリヌクレオチド組成物は、他の正常組織についてのレベルよりも、少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約5倍、及び最も好ましくは少なくとも約10倍、高いレベルで、試験される前立腺組織サンプルの少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約30%及び最も好ましくは少なくとも約50%で発現される。

もう1つの観点においては、本発明は、上記ポリヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド組成物を提供する。

【0010】

本発明はさらに、配列番号：112-114, 172, 176, 178, 327, 329, 331, 336, 339, 376-380, 383, 477-483, 496, 504, 505, 519, 520, 522, 525, 527, 532, 534, 537-551, 53-568, 573-586, 588-590, 592, 706-708, 775, 776, 778, 780, 781, 811, 814, 818, 826, 827, 853, 855, 858, 860-862, 866-877, 879, 883-893, 895, 897, 898, 909-915, 920-928, 932-934, 940, 941, 943, 946, 947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008, 1009, 1011, 1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033で示される配列から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド組成物を提供する。

一定の好ましい態様においては、本発明のポリペプチド及び/又はポリヌクレオチドは、免疫原性であり、すなわちそれらは、本明細書にさらに記載されるように、免疫応答、特に体液性及び/又は細胞性免疫応答を誘発することができる。

【0011】

本発明はさらに、開示されるポリペプチド及び/又はポリヌクレオチド配列のフラグメント、変異体及び/又は誘導体を提供し、ここで前記フラグメント、変異体及び/又は誘導体は好ましくは、112-114, 172, 176, 178, 327, 329, 331, 336, 339, 376-380, 383, 477-483, 496, 504, 505, 519, 520, 522, 525, 527, 532, 534, 537-551, 553-568, 573-586, 588-590, 592, 706-708, 775, 776, 778, 780, 781, 811, 814, 818, 826, 827, 853, 855, 858, 860-862, 866-877, 879, 883-893, 895, 897, 898, 909-915, 920-928, 932-934, 940, 941, 943, 946, 947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008, 1009, 1011, 1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033に示されるポリペプチド配列、又は

【0012】

配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 and 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033に示されるポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド配列の免疫原活性のレベルの少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%及びより好ましくは少なくとも約90%の免疫原活性のレベルを有する。

【0013】

本発明はさらに、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドを含んで成る発現ベクター、及びそのような発現ベクターにより形質転換されるか又はトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

他の観点においては、本発明は、上記のようなポリペプチド又はポリヌクレオチド、及び生理学的に許容できるキャリアーを含んで成る医薬組成物を提供する。

本発明の関連する関する観点においては、予防又は治療用途のための医薬組成物、例えばワクチン組成物が提供される。そのような組成物は一般的に、本発明の免疫原ポリペプチド又はポリヌクレオチド、及び免疫刺激剤、例えばアジュバント、並びに生理学的に許容できるキャリアーを含んで成る。

【0014】

本発明はさらに、(a)本発明のポリペプチド、又はそのフラグメントに対して特異的に結合する抗体又はその抗原-結合フラグメント；及び(b)生理学的に許容できるキャ

リヤーを含んで成る医薬組成物を提供する。

さらなる観点において、本発明は、(a) 上記のようなポリペプチドを発現する抗原提供細胞、及び(b) 医薬的に許容できるキャリアー又は賦形剤を含んで成る医薬組成物を提供する。典型的な抗原提供細胞は、樹状突起細胞、マクロファージ、単球、線維芽細胞及びB細胞を包含する。

関連する観点においては、(a) 上記のようなポリペプチドを発現する抗原提供細胞、及び(b) 免疫刺激剤を含んで成る医薬組成物が提供される。

【0015】

他の観点においては、本発明はさらに、上記のような少なくとも1つのポリペプチドを含んで成る融合タンパク質、及びそ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を、典型的には、生理学的に許容できるキャリアー及び/又は免疫刺激剤を含んで成る医薬組成物が提供される。

他の観点においては、本発明はさらに、上記のような少なくとも1つのポリペプチドを含んで成る融合タンパク質、及びそ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を、典型的には、生理学的に許容できるキャリアー及び/又は免疫刺激剤を含んで成る医薬組成物、例えばワクチン組成物の形で提供する。融合タンパク質は、上記のような複数の免疫原ポリペプチド又はそのタンパク質/変異体を含んで成り、そしてさらに、ポリペプチドの発現、精製及び/又は免疫原性を促進し、そして/又は増強するための1又は複数のポリペプチドセグメントを含んで成ることができる。

【0016】

さらなる観点においては、本発明は、患者における免疫応答性、好ましくはヒト患者におけるT細胞応答を刺激するための、本明細書に記載される医薬組成物を投与することを含んで成る方法を提供する。患者は、前立腺癌を有し、この場合、前記方法は疾病の処理を提供し、又はそのような疾病の危険性を有すると思われる患者は予防的に処理され得る。

さらなる観点においては、本発明は、上記のような医薬組成物を患者に投与することを含んで成る、患者における癌の進行を阻害するための方法を提供する。前記患者は前立腺癌を有し、この場合、前記方法は疾病の処理を提供し、又はそのような疾病の危険性を有すると思われる患者は予防的に処理され得る。

【0017】

他の観点においては、本発明はさらに、本発明のポリペプチドと特異的に反応するT細胞と生物学的サンプルとを接触せしめることを含んで成る、生物学的サンプルから腫瘍細胞を除去するための方法を提供し、ここで前記接触段階は、サンプルからポリペプチドを発現する細胞の除去を可能にするのに十分な条件下で及び十分な時間、行われる。

関連する観点においては、上記のように処理された生物学的サンプルを患者に投与することを含んで成る、患者における癌の進行を阻害するための方法が提供される。

【0018】

他の観点においては、本発明はさらに、(a) (i) 本明細書に開示されるポリペプチドの少なくとも免疫原性部分を含んで成るポリペプチド；(ii) そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び(iii) そのようなポリペプチドを発現する抗原提供細胞の1又は複数の成分と共に、患者から単離されたCD4⁺及び/又はCD8⁺ T細胞をインキュベートし；そして(b) 有効量の前記増殖されたT細胞を、前記患者に投与し、それにより、患者における癌の進行を阻害する段階を含んで成る、患者における癌の進行を阻害するための方法を提供する。増殖された細胞は、患者への投与の前、クローン化され得るが、しかし必ずしも必要ではない。

【0019】

さらなる観点においては、本発明は、患者における癌、好ましくは前立腺癌の存在又は不在を決定するための方法を提供し、ここで前記方法は、(a) 患者から得られた生物学的サンプルと、上記に示されるポリペプチドに結合する結合剤とを接触せしめ；(b) 前記結合剤に結合するポリペプチドの量を、前記サンプルにおいて検出し；そして(c) 前

10

20

30

40

50

記ポリペプチドの量を、前もって決定されたカット - オフ値に比較し、そしてそれから、患者における癌の存在又は不在を決定する段階を含んで成る。好ましくは態様においては、結合剤は、抗体、より好ましくはモノクローナル抗体である。

【0020】

他の観点においては、本発明は、患者における癌の進行をモニターするための方法も提供する。そのような方法は、(a)第1の点で患者から得られた生物学的サンプルと、上記のようなポリペプチドに結合する結合剤とを接触せしめ；(b)前記結合剤に結合するポリペプチドの量を、前記サンプルにおいて検出し；(c)続く点で患者から得られた生物学的サンプルを用いて、段階(a)及び(b)を反復し；そして(d)段階(c)において検出されたポリペプチドの量と、段階(b)において検出された量とを比較し、そしてそれから、患者における癌の進行をモニターする段階を含んで成る。

10

【0021】

他の観点においては、本発明は患者における癌の存在又は不在を決定するための方法を提供し、ここで前記方法は、(a)患者から得られた生物学的サンプルと、本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドとを接触せしめ；(b)前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチド、好ましくはmRNAのレベルをサンプルにおいて検出し；そして(c)前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドのレベルと前もって決定されたカット - オフ値とを比較し、そしてそれから、患者における癌の存在又は在を決定する段階を含んで成る。

【0022】

一定の態様においては、mRNAの量は、例えば本発明のポリヌクレオチド、又はそのようなポリヌクレオチドの補体にハイブリダイズする少なくとも1つのオリヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ鎖反応により検出される。他の態様においては、mRNAの量は、本発明のポリヌクレオチド又はそのようなポリヌクレオチドの補体にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ハイブリダイゼーション技法により検出される。

20

【0023】

関連する観点においては、患者における癌の進行をモニターするための方法が提供され、ここで前記方法は、(a)患者から得られた生物学的サンプルと、本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドとを接触せしめ；(b)前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、前記サンプルにおいて検出し；(c)続く点で患者から得られた生物学的サンプルを用いて、段階(a)及び(b)を反復し；そして(d)段階(c)において検出されるポリヌクレオチドの量と、段階(b)において検出される量とを比較し、そしてそれから、患者の癌の進行モニターする段階を含んで成る。

30

【0024】

さらなる観点においては、本発明は、上記のようなポリペプチドに結合する抗体、例えばモノクローナル抗体、及びそのような抗体を含んで成る診断キットを提供する。上記のような1又は複数のオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを含んで成る診断キットもまた提供される。

40

本発明のそれらの及び他の観点は、次の特定の記載に基づいて明らかに成るであろう。本明細書に開示されるすべての引例は、引用により本明細書中に組み込まれる。

【0025】

配列番号1は、F1 - 13についての決定されたcDNA配列である。

配列番号2は、F1 - 12についての決定された3'側cDNA配列である。

配列番号3は、F1 - 12についての決定された5'側cDNA配列である。

配列番号4は、F1 - 16についての決定された3'側cDNA配列である。

配列番号5は、H1 - 1についての決定された3'側cDNA配列である。

配列番号6は、H1 - 9についての決定された3'側cDNA配列である。

配列番号7は、H1 - 4についての決定された3'側cDNA配列である。

50

配列番号 8 は、J1 - 17 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 9 は、J1 - 17 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 10 は、L1 - 12 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。

【 0 0 2 6 】

配列番号 11 は、L1 - 12 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 12 は、N1 - 1862 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 13 は、N1 - 1862 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 14 は、J1 - 13 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 15 は、J1 - 13 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 16 は、J1 - 19 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 17 は、J1 - 19 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 18 は、J1 - 25 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 19 は、J1 - 25 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 20 は、J1 - 24 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。

10

【 0 0 2 7 】

配列番号 21 は、J1 - 24 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 22 は、K1 - 58 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 23 は、K1 - 58 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 24 は、K1 - 63 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 25 は、K1 - 63 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 26 は、L1 - 4 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 27 は、L1 - 4 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 28 は、L1 - 14 についての決定された 5' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 29 は、L1 - 14 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 30 は、J1 - 12 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。

20

【 0 0 2 8 】

配列番号 31 は、J1 - 16 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 32 は、J1 - 21 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 33 は、K1 - 48 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 34 は、K1 - 55 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 35 は、L1 - 2 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 36 は、L1 - 6 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 37 は、N1 - 1858 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 38 は、N1 - 1860 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 39 は、N1 - 1861 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。
 配列番号 40 は、N1 - 1864 についての決定された 3' 側 cDNA 配列である。

30

【 0 0 2 9 】

配列番号 41 は、P5 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 42 は、P8 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 43 は、P9 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 44 は、P18 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 45 は、P20 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 46 は、P29 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 47 は、P30 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 48 は、P34 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 49 は、P36 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 50 は、P38 についての決定された cDNA 配列である。

40

【 0 0 3 0 】

配列番号 51 は、P39 についての決定された cDNA 配列である。
 配列番号 52 は、P42 についての決定された cDNA 配列である。

50

配列番号53は、P47についての決定されたcDNA配列である。
配列番号54は、P49についての決定されたcDNA配列である。
配列番号55は、P50についての決定されたcDNA配列である。
配列番号56は、P53についての決定されたcDNA配列である。
配列番号57は、P55についての決定されたcDNA配列である。
配列番号58は、P60についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 3 1 】

配列番号59は、P64についての決定されたcDNA配列である。
配列番号60は、P65についての決定されたcDNA配列である。
配列番号61は、P73についての決定されたcDNA配列である。
配列番号62は、P75についての決定されたcDNA配列である。
配列番号63は、P76についての決定されたcDNA配列である。
配列番号64は、P79についての決定されたcDNA配列である。
配列番号65は、P84についての決定されたcDNA配列である。
配列番号66は、P68についての決定されたcDNA配列である。
配列番号67は、P80 (P704Pとしても言及される) についての決定されたcDNA配列である

10

配列番号68は、P82についての決定されたcDNA配列である。
配列番号69は、U1 - 3064についての決定されたcDNA配列である。
配列番号70は、U1 - 3065についての決定されたcDNA配列である。

20

【 0 0 3 2 】

配列番号71は、V1 - 3692についての決定されたcDNA配列である。
配列番号72は、1A - 3905についての決定されたcDNA配列である。
配列番号73は、V1 - 3686についての決定されたcDNA配列である。
配列番号74は、R1 - 2330についての決定されたcDNA配列である。
配列番号75は、1B - 3976についての決定されたcDNA配列である。
配列番号76は、V1 - 3679についての決定されたcDNA配列である。
配列番号77は、1G - 4736についての決定されたcDNA配列である。
配列番号78は、1G - 4738についての決定されたcDNA配列である。
配列番号79は、1G - 4741についての決定されたcDNA配列である。
配列番号80は、1G - 4744についての決定されたcDNA配列である。

30

【 0 0 3 3 】

配列番号81は、1G - 4734についての決定されたcDNA配列である。
配列番号82は、1H - 4774についての決定されたcDNA配列である。
配列番号83は、1H - 4781についての決定されたcDNA配列である。
配列番号84は、1H - 4785についての決定されたcDNA配列である。
配列番号85は、1H - 4787についての決定されたcDNA配列である。
配列番号86は、1H - 4796についての決定されたcDNA配列である。
配列番号87は、1I - 4807についての決定されたcDNA配列である。
配列番号88は、1I - 4810についての決定されたcDNA配列である。
配列番号89は、1I - 4811についての決定されたcDNA配列である。
配列番号90は、1J - 4876についての決定されたcDNA配列である。

40

【 0 0 3 4 】

配列番号91は、1K - 4884についての決定されたcDNA配列である。
配列番号92は、1K - 4896についての決定されたcDNA配列である。
配列番号93は、1G - 4761についての決定されたcDNA配列である。
配列番号94は、1G - 4762についての決定されたcDNA配列である。
配列番号95は、1H - 4766についての決定されたcDNA配列である。
配列番号96は、1H - 4770についての決定されたcDNA配列である。
配列番号97は、1H - 4771についての決定されたcDNA配列である。

50

配列番号98は、1H - 4772についての決定されたcDNA配列である。

配列番号99は、1D - 4297についての決定されたcDNA配列である。

配列番号100は、1D - 4309についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 3 5 】

配列番号101は、1D.1 - 4278についての決定されたcDNA配列である。

配列番号102は、1D - 4288についての決定されたcDNA配列である。

配列番号103は、1D - 4283についての決定されたcDNA配列である。

配列番号104は、1D - 4304についての決定されたcDNA配列である。

配列番号105は、1D - 4296についての決定されたcDNA配列である。

配列番号106は、1D - 4280についての決定されたcDNA配列である。

10

配列番号107は、F1 - 12 (P504Sとしても言及される) についての決定された十分な長さのcDNA配列である。

配列番号108は、F1 - 12についての予測されるアミノ酸配列である。

配列番号109は、J1 - 17についての決定された十分な長さのcDNA配列である。

配列番号110は、L1 - 12 (P501Sとしても言及される) についての決定された十分な長さのcDNA配列である。

【 0 0 3 6 】

配列番号111は、N1 - 1862 (P503Sとしても言及される) についての決定された十分な長さのcDNA配列である。

配列番号112は、J1 - 17についての予測されるアミノ酸配列である。

20

配列番号113は、L1 - 12 (P501Sとしても言及される) についての予測されるアミノ酸配列である。

配列番号114は、N1 - 1862 (P503Sとしても言及される) についての予測されるアミノ酸配列である。

配列番号115は、P89についての決定されたcDNA配列である。

配列番号116は、P90についての決定されたcDNA配列である。

配列番号117は、P92についての決定されたcDNA配列である。

配列番号118は、P95についての決定されたcDNA配列である。

配列番号119は、P98についての決定されたcDNA配列である。

配列番号120は、P102についての決定されたcDNA配列である。

30

【 0 0 3 7 】

配列番号121は、P110についての決定されたcDNA配列である。

配列番号122は、P111についての決定されたcDNA配列である。

配列番号123は、P114についての決定されたcDNA配列である。

配列番号124は、P115についての決定されたcDNA配列である。

配列番号125は、P116についての決定されたcDNA配列である。

配列番号126は、P124についての決定されたcDNA配列である。

配列番号127は、P126についての決定されたcDNA配列である。

配列番号128は、P130についての決定されたcDNA配列である。

配列番号129は、P133についての決定されたcDNA配列である。

配列番号130は、P138についての決定されたcDNA配列である。

40

【 0 0 3 8 】

配列番号131は、P143についての決定されたcDNA配列である。

配列番号132は、P151についての決定されたcDNA配列である。

配列番号133は、P156についての決定されたcDNA配列である。

配列番号134は、P157についての決定されたcDNA配列である。

配列番号135は、P166についての決定されたcDNA配列である。

配列番号136は、P176についての決定されたcDNA配列である。

配列番号137は、P178についての決定されたcDNA配列である。

配列番号138は、P179についての決定されたcDNA配列である。

50

配列番号139は、P185についての決定されたcDNA配列である。
配列番号140は、P192についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 3 9 】

配列番号141は、P201についての決定されたcDNA配列である。
配列番号142は、P204についての決定されたcDNA配列である。
配列番号143は、P208についての決定されたcDNA配列である。
配列番号144は、P211についての決定されたcDNA配列である。
配列番号145は、P213についての決定されたcDNA配列である。
配列番号146は、P219についての決定されたcDNA配列である。
配列番号147は、P237についての決定されたcDNA配列である。
配列番号148は、P239についての決定されたcDNA配列である。
配列番号149は、P248についての決定されたcDNA配列である。
配列番号150は、P251についての決定されたcDNA配列である。

10

【 0 0 4 0 】

配列番号151は、P255についての決定されたcDNA配列である。
配列番号152は、P256についての決定されたcDNA配列である。
配列番号153は、P259についての決定されたcDNA配列である。
配列番号154は、P260についての決定されたcDNA配列である。
配列番号155は、P263についての決定されたcDNA配列である。
配列番号156は、P264についての決定されたcDNA配列である。
配列番号157は、P266についての決定されたcDNA配列である。
配列番号158は、P270についての決定されたcDNA配列である。
配列番号159は、P272についての決定されたcDNA配列である。
配列番号160は、P278についての決定されたcDNA配列である。

20

【 0 0 4 1 】

配列番号161は、P105についての決定されたcDNA配列である。
配列番号162は、P107についての決定されたcDNA配列である。
配列番号163は、P137についての決定されたcDNA配列である。
配列番号164は、P194についての決定されたcDNA配列である。
配列番号165は、P195についての決定されたcDNA配列である。
配列番号166は、P196についての決定されたcDNA配列である。
配列番号167は、P220についての決定されたcDNA配列である。
配列番号168は、P234についての決定されたcDNA配列である。
配列番号169は、P235についての決定されたcDNA配列である。
配列番号170は、P243についての決定されたcDNA配列である。

30

【 0 0 4 2 】

配列番号171は、P703P-DE1についての決定されたcDNA配列である。
配列番号172は、P703P-DE1についての予測されるアミノ酸配列である。
配列番号173は、P703P-DE2についての決定されたcDNA配列である。
配列番号174は、P703P-DE6についての決定されたcDNA配列である。
配列番号175は、P703P-DE13についての決定されたcDNA配列である。
配列番号176は、P703P-DE13についての予測されるアミノ酸配列である。
配列番号177は、P703P-DE4についての決定されたcDNA配列である。
配列番号178は、P703P-DE14についての予測されるアミノ酸配列である。
配列番号179は、1G-4736についての決定された延長cDNA配列である。
配列番号180は、1G-4738についての決定された延長cDNA配列である。

40

【 0 0 4 3 】

配列番号181は、1G-4741についての決定された延長cDNA配列である。
配列番号182は、1G-4744についての決定された延長cDNA配列である。
配列番号183は、1G-4774についての決定された延長cDNA配列である。

50

配列番号184は、1G-4781についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号185は、1G-4785についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号186は、1G-4787についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号187は、1G-4796についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号188は、1G-4807についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号189は、1I-4810についての決定された3' cDNA配列である。
 配列番号190は、1I-4811についての決定された3' cDNA配列である。

【 0 0 4 4 】

配列番号191は、1J-4876についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号192は、1K-4844についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号193は、1K-4896についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号194は、1G-4761についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号195は、1G-4762についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号196は、1H-4766についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号197は、1H-4770についての決定された3' cDNA配列である。
 配列番号198は、1H-4771についての決定された3' cDNA配列である。
 配列番号199は、1H-4772についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号200は、1D-4309についての決定された延長cDNA配列である。

10

【 0 0 4 5 】

配列番号201は、1D.1-4278についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号202は、1D-4288についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号203は、1D-4283についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号204は、1D-4304についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号205は、1D-4296についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号206は、1D-4280についての決定された延長cDNA配列である。
 配列番号207は、10-d8fwdについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号208は、10-h10conについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号209は、11-C8rewについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号210は、7.g6fwdについての決定されたcDNA配列である。

20

【 0 0 4 6 】

配列番号211は、7.g6revについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号212は、8-b5fwdについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号213は、8-b5revについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号214は、8-b6fwdについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号215は、8-b6revについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号216は、8-d4fwdについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号217は、8-d9revについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号218は、8-g3fwdについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号219は、8-g3revについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号220は、8-h11revについての決定されたcDNA配列である。

30

40

【 0 0 4 7 】

配列番号221は、g-f12fwdについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号222は、g-f3revについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号223は、P509Sについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号224は、P510Sについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号225は、P703DE5についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号226は、9-A11についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号227は、8-C6についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号228は、8-H7についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号229は、JPTPN13についての決定されたcDNA配列である。

50

配列番号230は、JPTPN14についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 4 8 】

配列番号231は、JPTPN23についての決定されたcDNA配列である。

配列番号232は、JPTPN24についての決定されたcDNA配列である。

配列番号233は、JPTPN25についての決定されたcDNA配列である。

配列番号234は、JPTPN30についての決定されたcDNA配列である。

配列番号235は、JPTPN34についての決定されたcDNA配列である。

配列番号236は、JPTPN35についての決定されたcDNA配列である。

配列番号237は、JPTPN36についての決定されたcDNA配列である。

配列番号238は、JPTPN38についての決定されたcDNA配列である。

配列番号239は、JPTPN39についての決定されたcDNA配列である。

配列番号240は、JPTPN40についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 4 9 】

配列番号241は、JPTPN41についての決定されたcDNA配列である。

配列番号242は、JPTPN42についての決定されたcDNA配列である。

配列番号243は、JPTPN45についての決定されたcDNA配列である。

配列番号244は、JPTPN46についての決定されたcDNA配列である。

配列番号245は、JPTPN51についての決定されたcDNA配列である。

配列番号246は、JPTPN56についての決定されたcDNA配列である。

配列番号247は、JPTPN64についての決定されたcDNA配列である。

配列番号248は、JPTPN65についての決定されたcDNA配列である。

配列番号249は、JPTPN67についての決定されたcDNA配列である。

配列番号250は、JPTPN76についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 5 0 】

配列番号251は、JPTPN84についての決定されたcDNA配列である。

配列番号252は、JPTPN85についての決定されたcDNA配列である。

配列番号253は、JPTPN86についての決定されたcDNA配列である。

配列番号254は、JPTPN87についての決定されたcDNA配列である。

配列番号255は、JPTPN88についての決定されたcDNA配列である。

配列番号256は、JP1F1についての決定されたcDNA配列である。

配列番号257は、JP1F2についての決定されたcDNA配列である。

配列番号258は、JP1C2についての決定されたcDNA配列である。

配列番号259は、JP1B1についての決定されたcDNA配列である。

配列番号260は、JP1B2についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 5 1 】

配列番号261は、JP1D3についての決定されたcDNA配列である。

配列番号262は、JP1A4についての決定されたcDNA配列である。

配列番号263は、JP1F5についての決定されたcDNA配列である。

配列番号264は、JP1E6についての決定されたcDNA配列である。

配列番号265は、JP1D6についての決定されたcDNA配列である。

配列番号266は、JP1B1についての決定されたcDNA配列である。

配列番号267は、JP1A6についての決定されたcDNA配列である。

配列番号268は、JP1E8についての決定されたcDNA配列である。

配列番号269は、JP1D7についての決定されたcDNA配列である。

配列番号270は、JP1D9についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 5 2 】

配列番号271は、JP1C10についての決定されたcDNA配列である。

配列番号272は、JP1A9についての決定されたcDNA配列である。

配列番号273は、JP1F12についての決定されたcDNA配列である。

配列番号274は、JP1E12についての決定されたcDNA配列である。

10

20

30

40

50

配列番号275は、JP1D11についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号276は、JP1C11についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号277は、JP1C12についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号278は、JP1B12についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号279は、JP1A12についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号280は、JP8G2についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 5 3 】

配列番号281は、JP8H1についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号282は、JP8H2についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号283は、JP8A2についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号284は、JP8A4についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号285は、JP8C3についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号286は、JP8G4についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号287は、JP8B6についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号288は、JP8D6についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号289は、JP8F5についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号290は、JP8A8についての決定されたcDNA配列である。

10

【 0 0 5 4 】

配列番号291は、JP8C7についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号292は、JP8D7についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号293は、JP8D8についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号294は、JP8E7についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号295は、JP8F8についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号296は、JP8G8についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号297は、JP8B10についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号298は、JP8C10についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号299は、JP8E9についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号300は、JP8E10についての決定されたcDNA配列である。

20

【 0 0 5 5 】

配列番号301は、JP8F9についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号302は、JP8H9についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号303は、JP8C12についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号304は、JP8E11についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号305は、JP8E12についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号306は、ペプチドPS2#12についてのアミノ酸配列である。
 配列番号307は、P711Pについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号308は、P712Pについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号309は、CLONE23についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号310は、P774Pについての決定されたcDNA配列である。

30

【 0 0 5 6 】

配列番号311は、P775Pについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号312は、P715Pについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号313は、P710Pについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号314は、P767Pについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号315は、P768Pについての決定されたcDNA配列である。
 配列番号316-325は、前もって単離された遺伝子の決定されたcDNA配列である。
 配列番号326は、P703PDE5についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号327は、P703PDE5についての予測されるアミノ酸配列である。
 配列番号328は、P703P6.26についての決定されたcDNA配列である。
 配列番号329は、P703P6.26についての予測されるアミノ酸配列である。

40

50

配列番号330は、P703PX-23についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 5 7 】

配列番号331は、P703PX-23についての予測されるアミノ酸配列である。

配列番号332は、P509Sについての決定された十分な長さのcDNA配列である。

配列番号333は、P707P (11 - C9としても言及される) についての決定された延長cDNA配列である。

配列番号334は、P714Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号335は、P705P (9 - F3としても言及される) についての決定されたcDNA配列である。

配列番号336は、P705Pについての予測されるアミノ酸配列である。

10

配列番号337は、ペプチドP1S#10のアミノ酸配列である。

配列番号338は、ペプチドp5のアミノ酸配列である。

配列番号339は、P509Sについての予測されるアミノ酸配列である。

【 0 0 5 8 】

配列番号340は、P778Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号341は、P786Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号342は、P789Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号343は、ホモサピエンスMM46 mRNAに対する相同性を示すクローンのための決定されたcDNA配列である。

配列番号344は、ホモサピエンスTNF - 刺激されたABCタンパク質 (ABC50) mRNAに対する相同性を示すクローンのための決定されたcDNA配列である。

20

配列番号345は、E - カドヘリンに関してホモサピエンスmRNAに対する相同性を示すクローンのための決定されたcDNA配列である。

【 0 0 5 9 】

配列番号346は、ヒト核 - コードされたミトコンドリアセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT) に対する相同性を示すクローンのための決定されたcDNA配列である。

配列番号347は、ホモサピエンス天然耐性 - 関連マクロファージタンパク質 2 (NRAMP2) に対する相同性を示すクローンのための決定されたcDNA配列である。

配列番号348は、ホモサピエンスホスホグルコムターゼ - 関連タンパク質 (PGMRP) に対する相同性を示すクローンのための決定されたcDNA配列である。

30

配列番号349は、プロテオソームサブユニットp40に関してヒトmRNAに対する相同性を示すクローンのための決定されたcDNA配列である。

配列番号350は、P777Pについての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 6 0 】

配列番号351は、P779Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号352は、P790Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号353は、P784Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号354は、P776Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号355は、P780Pについての決定されたcDNA配列である。

40

配列番号356は、P544Sについての決定されたcDNA配列である。

配列番号357は、P745Sについての決定されたcDNA配列である。

配列番号358は、P782Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号359は、P783Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号360は、未知の17984についての決定されたcDNA配列である。

【 0 0 6 1 】

配列番号361は、P787Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号362は、P788Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号363は、未知の17994についての決定されたcDNA配列である。

配列番号364は、P781Pについての決定されたcDNA配列である。

50

配列番号365は、P785Pについての決定されたcDNA配列である。

配列番号366 - 375は、B305Dのスプライス変異体についての決定されたcDNA配列である。

配列番号376は、配列番号366によりコードされる予測されるアミノ酸配列配列である。

配列番号377は、配列番号372によりコードされる予測されるアミノ酸配列配列である。

【 0 0 6 2 】

配列番号378は、配列番号378によりコードされる予測されるアミノ酸配列配列である。

配列番号379は、配列番号374によりコードされる予測されるアミノ酸配列配列である。

配列番号380は、配列番号375によりコードされる予測されるアミノ酸配列配列である。

配列番号381は、B716Pについての決定されたcDNA配列である。

10

配列番号382は、P711Pについての決定された十分な長さのcDNA配列である。

【 0 0 6 3 】

配列番号383は、P711Pについての予測されるアミノ酸配列である。

配列番号384は、P1000CについてのcDNA配列である。

配列番号385は、CGI-82についてのcDNA配列である。

配列番号386は、23320についてのcDNA配列である。

配列番号387は、CGI-69についてのcDNA配列である。

配列番号388は、L-イジトール-2-デヒドロゲナーゼについてのcDNA配列である。

配列番号389は、23379についてのcDNA配列である。

20

配列番号390は、23381についてのcDNA配列である。

【 0 0 6 4 】

配列番号391は、KIAA0122についてのcDNA配列である。

配列番号392は、23399についてのcDNA配列である。

配列番号393は、前もって同定された遺伝子についてのcDNA配列である。

配列番号394は、HCLBPについてのcDNA配列である。

配列番号395は、トランスグルタミナーゼについてのcDNA配列である。

配列番号396は、前もって同定された遺伝子についてのcDNA配列である。

配列番号397は、PAPについてのcDNA配列である。

配列番号398は、Ets転写因子PDEFPPについてのcDNA配列である。

30

配列番号399は、hTGRについてのcDNA配列である。

配列番号400は、KIAA0295についてのcDNA配列である。

【 0 0 6 5 】

配列番号401は、22545についてのcDNA配列である。

配列番号402は、22547についてのcDNA配列である。

配列番号404は、22550についてのcDNA配列である。

配列番号405は、22551についてのcDNA配列である。

配列番号406は、22552についてのcDNA配列である。

配列番号407は、22553 (P1020Cとしても言及される) についてのcDNA配列である。

配列番号408は、22558についてのcDNA配列である。

40

配列番号409は、22562についてのcDNA配列である。

配列番号410は、22565についてのcDNA配列である。

配列番号408は、22558についてのcDNA配列である。

配列番号409は、22562についてのcDNA配列である。

配列番号410は、22565についてのcDNA配列である。

【 0 0 6 6 】

配列番号411は、22567についてのcDNA配列である。

配列番号412は、22568についてのcDNA配列である。

配列番号413は、22570についてのcDNA配列である。

配列番号414は、22571についてのcDNA配列である。

50

配列番号415は、22572についてのcDNA配列である。
配列番号416は、22573についてのcDNA配列である。
配列番号417は、22573についてのcDNA配列である。
配列番号418は、22575についてのcDNA配列である。
配列番号419は、22580についてのcDNA配列である。
配列番号420は、22581についてのcDNA配列である。

【 0 0 6 7 】

配列番号421は、22582についてのcDNA配列である。
配列番号422は、22583についてのcDNA配列である。
配列番号423は、22584についてのcDNA配列である。
配列番号434は、22585についてのcDNA配列である。
配列番号425は、22586についてのcDNA配列である。
配列番号426は、22587についてのcDNA配列である。
配列番号427は、22588についてのcDNA配列である。
配列番号428は、22589についてのcDNA配列である。
配列番号429は、22590についてのcDNA配列である。
配列番号430は、22591についてのcDNA配列である。

10

【 0 0 6 8 】

配列番号431は、22592についてのcDNA配列である。
配列番号432は、22593についてのcDNA配列である。
配列番号433は、22594についてのcDNA配列である。
配列番号434は、22595についてのcDNA配列である。
配列番号435は、22596についてのcDNA配列である。
配列番号436は、22847についてのcDNA配列である。
配列番号437は、22848についてのcDNA配列である。
配列番号438は、22849についてのcDNA配列である。
配列番号439は、22851についてのcDNA配列である。
配列番号440は、22852についてのcDNA配列である。

20

【 0 0 6 9 】

配列番号441は、22853についてのcDNA配列である。
配列番号442は、22854についてのcDNA配列である。
配列番号443は、22855についてのcDNA配列である。
配列番号444は、22856についてのcDNA配列である。
配列番号445は、22857についてのcDNA配列である。
配列番号446は、23601についてのcDNA配列である。
配列番号447は、23602についてのcDNA配列である。
配列番号448は、23605についてのcDNA配列である。
配列番号449は、23606についてのcDNA配列である。
配列番号450は、23612についてのcDNA配列である。

30

【 0 0 7 0 】

配列番号451は、23614についてのcDNA配列である。
配列番号452は、23618についてのcDNA配列である。
配列番号453は、23622についてのcDNA配列である。
配列番号454は、葉酸ヒドロラーゼについてのcDNA配列である。
配列番号455は、LIMタンパク質についてのcDNA配列である。
配列番号456は、既知の遺伝子についてのcDNA配列である。
配列番号457は、既知の遺伝子についてのcDNA配列である。
配列番号458は、前もって同定された遺伝子についてのcDNA配列である。
配列番号459は、23045についてのcDNA配列である。
配列番号460は、23032についてのcDNA配列である。

40

50

【 0 0 7 1 】

配列番号461は、クローン23054についてのcDNA配列である。

配列番号462-467は、既知の遺伝子についてのcDNA配列である。

配列番号468-471は、P710PについてのcDNA配列である。

配列番号472は、P1001CについてのcDNA配列である。

配列番号473は、P775P (27505としても言及される) の第1のスプライス変異体についての決定されたcDNA配列である。

配列番号474は、P775P (19947としても言及される) の第2のスプライス変異体についての決定されたcDNA配列である。

配列番号475は、P775P (19941としても言及される) の第3のスプライス変異体についての決定されたcDNA配列である。

10

【 0 0 7 2 】

配列番号476は、P775P (19937としても言及される) の第4のスプライス変異体についての決定されたcDNA配列である。

配列番号477は、配列番号474によりコードされる第1の予測されるアミノ酸配列である。

配列番号478は、配列番号474によりコードされる第2の予測されるアミノ酸配列である。

配列番号479は、配列番号475によりコードされる予測されるアミノ酸配列である。

配列番号480は、配列番号473によりコードされる第1の予測されるアミノ酸配列である。

20

【 0 0 7 3 】

配列番号481は、配列番号473によりコードされる第2の予測されるアミノ酸配列である。

配列番号482は、配列番号473によりコードされる第3の予測されるアミノ酸配列である。

配列番号483は、配列番号473によりコードされる第4の予測されるアミノ酸配列である。

配列番号484は、M. tuberculosis抗原Ra12の最初の30個のアミノ酸である。

配列番号485は、PCRプライマー-AW025である。

30

配列番号486は、PCRプライマー-AW003である。

配列番号487は、PCRプライマー-AW027である。

配列番号488は、PCRプライマー-AW026である。

配列番号489-501は、エピトープマッピング研究に使用されるペプチドである。

【 0 0 7 4 】

配列番号502は、抗 - P503Sモノクローナル抗体20D4のための相補性決定領域の決定されたcDNA配列である。

配列番号503は、抗 - P503Sモノクローナル抗体Ja1のための相補性決定領域の決定されたcDNA配列である。

配列番号504 & 505は、エピトープマッピング研究に使用されるペプチドである。

40

配列番号506は、抗 - P703Pモノクローナル抗体8H2のための相補性決定領域の決定されたcDNA配列である。

配列番号507は、抗 - P703Pモノクローナル抗体7H8のための相補性決定領域の決定されたcDNA配列である。

配列番号508は、抗 - P703Pモノクローナル抗体2D4のための相補性決定領域の決定されたcDNA配列である。

【 0 0 7 5 】

配列番号509 - 522は、エピトープマッピング研究に使用されるペプチドである。

配列番号523は、P703Pに対する抗体を生ぜしめるために使用されるP703Pの成熟形である。

50

配列番号524は、P703Pの推定上の十分な長さのcDNA配列である。

配列番号525は、配列番号524によりコードされる推定上のアミノ酸配列である。

配列番号526は、P790Pの十分な長さのcDNA配列である。

配列番号527は、P790Pの予測されるアミノ酸配列である。

配列番号528 & 529は、PCRプライマーである。

配列番号530は、配列番号366のスプライス変異体のcDNA配列である。

【 0 0 7 6 】

配列番号531は、配列番号530の読み取り枠のcDNA配列である。

配列番号532は、配列番号531の配列によりコードされる予測されるアミノ酸である。

配列番号533は、P775Pの推定上のORFのDNA配列である。

配列番号534は、配列番号533によりコードされる予測されるアミノ酸配列である。

配列番号535は、P510Sのための第1の十分な長さのcDNA配列である。

配列番号536は、P510Sのための第2の十分な長さのcDNA配列である。

配列番号537は、配列番号535によりコードされる予測されるアミノ酸配列である。

配列番号538は、配列番号536によりコードされる予測されるアミノ酸配列である。

配列番号539は、ペプチドP501S - 370である。

配列番号540は、ペプチドP501S - 376である。

【 0 0 7 7 】

配列番号541 - 551は、P501Sのエピトープである。

配列番号552は、P712Pのための延長されたcDNA配列である。

配列番号553 - 568は、配列番号552内の予測される読み取り枠によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号569は、P776Pのための延長されたcDNA配列である。

配列番号570は、コンチグ6として言及されるP776Pのスプライス変異体のための決定されたcDNA配列である。

配列番号571は、コンチグ7として言及されるP776Pのスプライス変異体のための決定されたcDNA配列である。

配列番号572は、コンチグ14として言及されるP776Pのスプライス変異体のための決定されたcDNA配列である。

【 0 0 7 8 】

配列番号573は、配列番号570の第1の予測されるORFによりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号574は、配列番号570の第2の予測されるORFによりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号575は、配列番号571の予測されるORFによりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号576 - 586は、配列番号569の予測されるORFによりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号587は、P767P及びP777Pの配列のDNAコンセンサス配列である。

配列番号588 - 590は、配列番号587の予測されるORFによりコードされるアミノ酸配列である。

【 0 0 7 9 】

配列番号591は、P1020Cのための延長されたcDNA配列である。

配列番号592は、配列番号P1020Cの配列によりコードされる予測されるアミノ酸配列である。

配列番号593は、50748として言及されるP775Pのスプライス変異体である。

配列番号594は、50717として言及されるP775Pのスプライス変異体である。

配列番号595は、45985として言及されるP775Pのスプライス変異体である。

配列番号596は、38769として言及されるP775Pのスプライス変異体である。

配列番号597は、37922として言及されるP775Pのスプライス変異体である。

10

20

30

40

50

配列番号598は、49274として言及されるP510Sのスプライス変異体である。
 配列番号599は、39487として言及されるP510Sのスプライス変異体である。
 配列番号600は、5167.16として言及されるP504Sのスプライス変異体である。

【 0 0 8 0 】

配列番号601は、5167.1として言及されるP504Sのスプライス変異体である。
 配列番号602は、5163.46として言及されるP504Sのスプライス変異体である。
 配列番号603は、5163.42として言及されるP504Sのスプライス変異体である。
 配列番号604は、5163.34として言及されるP504Sのスプライス変異体である。
 配列番号605は、5163.17として言及されるP504Sのスプライス変異体である。
 配列番号606は、10640として言及されるP501Sのスプライス変異体である。
 配列番号601 - 615は、PCRプライマーの配列である。
 配列番号616は、P703P及びPSAの融合体の決定されたcDNA配列である。
 配列番号617は、P703P及びPSAの融合体のアミノ酸配列である。
 配列番号618 - 689は、前立腺 - 特異的クローンの決定されたcDNA配列である。
 配列番号690は、遺伝子DD3のcDNA配列である。
 配列番号691 - 697は、前立腺 - 特異的クローンの決定されたcDNA配列である。
 配列番号698は、P714Pのための延長されたcDNA配列である。
 配列番号699 - 701は、P704Pのスプライス変異体のためのcDNA配列である。

10

【 0 0 8 1 】

配列番号702は、P553S - 14として言及されるP553Sのスプライスされた変異体のcDNA配列である。
 配列番号703は、P553S - 12として言及されるP553Sのスプライスされた変異体のcDNA配列である。
 配列番号704は、P553S - 10として言及されるP553Sのスプライスされた変異体のcDNA配列である。
 配列番号705は、P553S - 6として言及されるP553Sのスプライスされた変異体のcDNA配列である。
 配列番号706は、配列番号705によりコードされるアミノ酸配列である。
 配列番号707は、配列番号702によりコードされるアミノ酸配列である。
 配列番号708は、配列番号702によりコードされる第2のアミノ酸配列である。
 配列番号709 - 772は、前立腺 - 特異的クローンの決定されたcDNA配列である。
 配列番号773は、前立腺 - 特異的トランスグルタミナーゼ遺伝子 (P558Sとしても言及される) のための第1の十分な長さのcDNA配列である。

20

30

【 0 0 8 2 】

配列番号774は、前立腺 - 特異的トランスグルタミナーゼ遺伝子のための第2の十分な長さのcDNA配列である。
 配列番号775は、配列番号773の配列によりコードされるアミノ酸配列である。
 配列番号776は、配列番号774の配列によりコードされるアミノ酸配列である。
 配列番号777は、P788Pのための十分な長さのcDNA配列である。
 配列番号778は、配列番号777の配列によりコードされるアミノ酸配列である。
 配列番号779は、P788Pの多形変異体のための決定されたcDNA配列である。
 配列番号780は、配列番号779の配列によりコードされるアミノ酸配列である。
 配列番号781は、P703Pからのペプチド4のアミノ酸配列である。
 配列番号782は、P703Pからのペプチド4をコードするcDNA配列である。
 配列番号783 - 798は、P703PのエピトープをコードするcDNA配列である。

40

【 0 0 8 3 】

配列番号799 - 814は、P703Pのエピトープのアミノ酸配列である。
 配列番号815及び816は、PCRプライマーである。
 配列番号817は、E. コリにおいて発現されるP788PのN - 末端部分をコードするcDNA配列である。

50

配列番号818は、E. コリにおいて発現されるP788PのN - 末端部分のアミノ酸配列である。

配列番号819は、M. ツベルクロシス抗原Ra12のアミノ酸配列である。

配列番号820及び821は、PCRプライマーである。

配列番号822は、Ra12 - P510S - C構造体のためのcDNA配列である。

配列番号823は、P510S - C構造体のためのcDNA配列である。

【 0 0 8 4 】

配列番号824は、P510S - E3構造体のためのcDNA配列である。

配列番号825は、Ra12 - P510S - C構造体のためのアミノ酸配列である。

配列番号826は、P510S - C構造体のためのアミノ酸配列である。

10

配列番号827は、P510S - E3構造体のためのアミノ酸配列である。

配列番号828 - 833は、PCRプライマーである。

配列番号834は、Ra12 - P775P - ORF3構造体のためのcDNA配列である。

配列番号835は、Ra12 - P775P - ORF3構造体のためのアミノ酸配列である。

配列番号836及び837は、PCRプライマーである。

配列番号838は、P703P His 標識融合タンパク質のための決定されたアミノ酸配列である。

【 0 0 8 5 】

配列番号839は、P703P His 標識融合タンパク質のための決定されたcDNA配列である。

配列番号840及び841は、PCRプライマーである。

20

配列番号842は、P705P His 標識融合タンパク質のための決定されたアミノ酸配列である。

配列番号843は、P705P His 標識融合タンパク質のための決定されたcDNA配列である。

配列番号844及び845は、PCRプライマーである。

配列番号846は、P711P His 標識融合タンパク質のための決定されたアミノ酸配列である。

配列番号847は、P711P His 標識融合タンパク質のための決定されたcDNA配列である。

【 0 0 8 6 】

配列番号848は、M. ツベルクロシス抗原Ra12のアミノ酸配列である。

配列番号849及び850は、PCRプライマーである。

30

配列番号851は、Ra12 - P501S - E2構造体のための決定されたcDNA配列である。

配列番号852は、Ra12 - P501S - E2構造体のための決定されたアミノ酸配列である。

配列番号853は、P501Sのエピトープのためのアミノ酸配列である。

配列番号854は、配列番号853をコードするDNA配列である。

配列番号855は、P501Sのエピトープのためのアミノ酸配列である。

配列番号856は、配列番号855をコードするDNA配列である。

配列番号857は、エピトープマッピング研究に使用されるペプチドである。

配列番号858は、P501Sのエピトープのためのアミノ酸配列である。

【 0 0 8 7 】

配列番号859は、配列番号858をコードするDNA配列である。

40

配列番号860 - 862は、P501SのCD4エピトープのアミノ酸配列である。

配列番号863 - 865は、配列番号860 - 862の配列をコードするDNA配列である。

配列番号866 - 877は、P703Pの推定上のCTLエピトープのためのアミノ酸配列である。

配列番号878は、P789Pのための十分な長さのcDNA配列である。

配列番号879は、配列番号878によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号880は、コンチグ6として言及されるP776Pのスプライス変異体のための決定された十分な長さのcDNA配列である。

配列番号881 - 882は、コンチグ7として言及されるP776Pのスプライス変異体のための決定された十分な長さのcDNA配列である。

配列番号883 - 887は、配列番号880によりコードされるアミノ酸配列である。

50

配列番号888 - 893は、コンチグ7として言及されるP776Pのサブライズ変異体によりコードされるアミノ酸配列である。

【 0 0 8 8 】

配列番号894は、ヒトトランスメンブランプロテアーゼセリン2のための十分な長さのcDNA配列である。

配列番号895は、配列番号894によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号896は、ヒトトランスメンブランプロテアーゼセリン2の最初の209個のアミノ酸をコードするcDNA配列である。

配列番号897は、ヒトトランスメンブランプロテアーゼセリン2の最初の209個のアミノ酸である。

配列番号898は、P501Sのペプチド296 - 322のアミノ酸配列である。

配列番号899 - 902は、PCRプライマーである。

配列番号903は、P501S - 特異的T細胞クローン4E5のためのT細胞受容体のVb鎖の決定されたcDNA配列である。

【 0 0 8 9 】

配列番号904は、P501S - 特異的T細胞クローン4E5のためのT細胞受容体のVa鎖の決定されたcDNA配列である。

配列番号905は、配列番号903によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号906は、配列番号904によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号907は、停止コドンを含むP768Pのための十分な長さの読み取り枠である。

配列番号908は、停止コドンを有さないP768Pのための十分な長さの読み取り枠である。

配列番号909は、配列番号908によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号910 - 915は、P768Pの予測されるドメインのためのアミノ酸配列である。

【 0 0 9 0 】

配列番号916は、P835Pの十分な長さのcDNAである。

配列番号917は、前もって同定されたクローンFLJ13581のcDNA配列である。

配列番号918は、停止コドンを含むP835Pのための読み取り枠のcDNA配列である。

配列番号919は、停止コドンを有さないP835Pのための読み取り枠のcDNA配列である。

配列番号920は、P835Pのための十分な長さのアミノ酸配列である。

配列番号921 - 928は、P835Pの細胞外及び細胞内ドメインのアミノ酸配列である。

【 0 0 9 1 】

配列番号929は、P1000Cのための十分な長さのcDNA配列である。

配列番号930は、停止コドンを含むP1000Cのための読み取り枠のcDNA配列である。

配列番号931は、停止コドンを有さないP1000Cのための読み取り枠のcDNA配列である。

配列番号932は、P1000Cのための十分な長さのアミノ酸配列である。

配列番号933は、配列番号932のアミノ酸1 - 100である。

配列番号934は、配列番号932のアミノ酸100 - 492である。

配列番号935 - 937は、PCRプライマーである。

配列番号938は、発現された十分な長さのP767Pコード領域のcDNA配列である。

配列番号939は、発現された端が切られたP767Pコード領域のcDNA配列である。

配列番号940は、配列番号939によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号941は、配列番号938によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号942は、P703PのCD4エピトープのDNA配列である。

配列番号943は、P703PのCD4エピトープのアミノ酸配列である。

【 0 0 9 2 】

配列番号944及び945は、P780Pの2種の選択的サブライズ形のcDNA配列である。

配列番号946及び947は、それぞれ配列番号944及び945によりコードされるアミノ酸配列である。

配列番号948は、P705についての補正されたcDNA配列である。

配列番号949 - 956は、P790Pペプチドのアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

配列番号957 - 966は、P775Pペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号967は、P554Sについての拡張されたcDNA配列である。

配列番号968は、P554Sについてのアミノ酸配列である。

配列番号969 - 976は、P501SのエピトープをコードするcDNA配列である。

配列番号977 - 984は、P501Sのエピトープのアミノ酸配列である。

配列番号985 - 987は、P501Sのペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号988 - 990は、P703Pのペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号991は、P703PのCD4⁺ T細胞エピトープをコードするcDNAである。

配列番号992は、P703 (配列番号991によりコードされる) のCD4⁺ T細胞エピトープのアミノ酸配列である。

10

【0093】

配列番号993は、P3を含むP706Pクローン8 - B6についてのcDNA配列を表す。

配列番号994は、P4を含むP706Pクローン8 - B6についてのcDNA配列を表す。

配列番号995は、P706Pクローン8B6.P4コンチグについてのcDNA配列を表す。

配列番号996は、P706P EST 1386 - 1902についてのcDNA配列を表す。

配列番号997は、P706P EST 4927 - 6088についてのcDNA配列を表す。

配列番号998は、P713PクローンPT4410A4.2についてのcDNA配列を表す。

配列番号999 - 1002は、前立腺分泌タンパク質 (PSP) をコードする4種のエキソンを表す。

配列番号1003は、PSPについての十分な長さのアミノ酸配列を表す。

20

配列番号1004は、クローンP1Eについての拡張されたcDNA配列を表す。

配列番号1005は、配列番号1004によりコードされるオープンリーディングフレームのアミノ酸配列を表す。

【0094】

配列番号1006は、発現構造体P510.seqのコード領域のDNA配列を表す。

配列番号1007は、発現構造体MAPS - P510S.seqのコード領域のDNA配列を表す。

配列番号1008は、配列番号1007のDNA配列によりコードされるタンパク質配列を表す。

配列番号1009は、配列番号1006のDNA配列によりコードされるタンパク質配列を表す。

配列番号1010は、Trx-P501S融合構造体についてのコード領域のDNA配列を表す。

配列番号1011は、配列番号1010のDNA配列によりコードされるTrx-P501S融合タンパク質についてのアミノ酸配列を表す。

30

配列番号1012は、クローン2H2-1A12により認識される最小P501Sエピトープについてのアミノ酸配列を表す。

配列番号1013は、クローン2H2-1A12により認識される最小P501Sエピトープについてのアミノ酸配列を表す。配列番号1014は、前方向プライマー-hPAPF1についてのプライマー配列に対応する。

【0095】

配列番号1015は、逆方向プライマー-hPAPRV1についてのプライマー配列に対応する。

配列番号1016は、前方向プライマー-FOPP2F1についてのプライマー配列に対応する。

配列番号1017は、逆方向プライマー-FOPPF1についてのプライマー配列に対応する。

40

配列番号1018は、前方向プライマー-FOPP2RV1についてのプライマー配列に対応する。

配列番号1019は、FOPP2としても言及される、FOPP及びhPAPの融合についてのDNA配列を表す。

配列番号1020は、FOPP2としても言及される、FOPP及びhPAPの融合についてのアミノ酸配列を表す。

配列番号1021は、クローン1H1-1A6により認識されるP501S最小CD8⁺ T細胞エピトープについてのDNA配列を表す。

配列番号1022は、クローン1H1-1A6により認識されるP501S最小CD8⁺ T細胞エピトープについてのアミノ酸配列を表す。

【0096】

50

配列番号1023は、プライマー-PDM-930についての配列を表す。

配列番号1024は、プライマー-PDM-165についての配列を表す。

配列番号1025は、プライマー-PDM-929についての配列を表す。

配列番号1026は、P501S Dタンパク質（アミノ酸316 - 553）をコードするDNA配列を表す。

配列番号1027は、P501S Cタンパク質（アミノ酸257 - 553）をコードするDNA配列を表す。

配列番号1028は、P501S Dタンパク質（アミノ酸316 - 553）をコードするアミノ酸配列を表す。

【 0 0 9 7 】

配列番号1029は、P501S Cタンパク質（アミノ酸257 - 553）をコードするアミノ酸配列を表す。

配列番号1030は、患者の血清により認識されるP703Pエピトープについてのアミノ酸を表す。

配列番号1031は、患者の血清により認識されるP703Pエピトープについてのアミノ酸を表す。

配列番号1032は、患者の血清により認識されるP703Pエピトープについてのアミノ酸を表す。

配列番号1033は、患者の血清により認識されるP703Pエピトープについてのアミノ酸を表す。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 9 8 】

本明細書において言及され、そして/又は出願データシートに列挙される、アメリカ特許、アメリカ特許出願公開、アメリカ特許出願、外国特許、外国特許出願及び非特許公開は、引用により本明細書に完全に組込まれる。

本発明は、一般的に、癌、特に前立腺癌の治療及び診断のための組成物及びそれらの用途に向けられる。さらに下記に記載されるように、本発明の典型的な組物は、ポリペプチド、特に免疫原性ポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、抗体及び他の結合剤、抗原提供細胞（APC）及び免疫系細胞（例えば、T細胞）を含むが、但しそれだけには限定されない。

【 0 0 9 9 】

本発明の実施は、特にことわらない限り、ウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学及び組換えDNA技法の従来の方法を使用し、それらの多くは、例示目的のために下記に記載される。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えばSambrook, など. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis など. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)を参照のこと。

本明細書に引用されるすべての出版物、特許及び特許出願は、引用により本明細書に組み込まれる。

本明細書及び特許請求の範囲において使用される場合、単数形は、特にことわらない限り、複数形も包含する。

【 0 1 0 0 】

ポリペプチド組成物 :

本明細書において使用される場合、用語“ポリペプチド”とは、その従来の意味で、すなわちアミノ酸の配列として使用される。ポリペプチドは、特定の長さの生成物に限定されず；従って、ペプチド、オリゴペプチド及びタンパク質はポリペプチドの定義内に包含

10

20

30

40

50

され、そしてそのような用語は、特にことわらない限り、本明細書においては、交換可能的に使用され得る。この用語は、ポリペプチドの後 - 発現修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化及び同様のもの、並びに当業界において知られている他の修飾（天然に存在し、及び天然に存在しない）を言及せず、又は排除する。ポリペプチドは、完全なタンパク質又はその副配列であり得る。本発明において興味ある特定のポリペプチドは、エピトープを含んで成るアミノ酸副配列、すなわちポリペプチドの免疫原性質を実質的に担当し、そして免疫応答を誘発できる抗原決定基である。

【0101】

本発明の特に典型的なポリペプチドは、配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 及び 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027のいずれか1つに示されるポリヌクレオチド配列、又は配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 及び 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027のいずれか1つに示されるポリヌクレオチド配列に対して、

10

20

【0102】

中位の緊縮条件下で、又は他方では、高い緊縮条件下でハイブリダイズする配列によりコードされるそれらのポリペプチドを含んで成る。特定の態様においては、本発明のポリペプチドは、配列番号：112-114, 172, 176, 178, 327, 329, 331, 336, 339, 376-380, 383, 477-483, 496, 504, 505, 519, 520, 522, 525, 527, 532, 534, 537-551, 553-568, 573-586, 588-590, 592, 706-708, 775, 776, 778, 780, 781, 811, 814, 818, 826, 827, 853, 855, 858, 860-862, 866-877, 879, 883-893, 895, 897, 898, 909-915, 920-928, 932-934, 941, 943, 946, 947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008, 1009, 1011, 1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033のいずれか1つに示されるようなアミノ酸配列を含んで成る。

30

【0103】

本発明のポリペプチドは時々、それらの同定が、前立腺組織サンプルにおけるそれらの高められた発現レベルに少なくとも一部、基づかれている表示として、前立腺 - 特異的タンパク質又は前立腺 - 特異的ポリペプチドとして本明細書において定義される。従って、“前立腺 - 特異的ポリペプチド”又は“前立腺 - 特異的タンパク質”は一般的に、本明細書において提供される代表的アッセイを用い決定される場合、他の正常な組織における発現のレベルよりも、少なくとも2倍、及び好ましくは少なくとも5倍、高いレベルで、前立腺組織サンプルの実質的な割合で、例えば試験される前立腺組織サンプルの好ましくは約20%以上、より好ましくは約30%以上、及び最も好ましくは約50%以上で発現される、本発明のポリペプチド配列、又はそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を言及する。腫瘍細胞における発現のその高められたレベルに基づいての本発明の前立腺 - 特異的ポリペプチド配列は、下記にさらに記載されるように、診断マーカー及び治療標的物として特に使用される。

40

【0104】

一定の好ましい態様においては、本発明のポリペプチドは、免疫原性であり、すなわち、それらは前立腺癌を有する患者からの抗血清及び/又はT-細胞と、イムノアッセイ（例えばELISA又はT-細胞刺激アッセイ）内で検出可能的に反応する。免疫原活性についてのスクリーニングは、当業者に良く知られている技法を用いて行われ得る。例えば、そのようなスクリーニングは、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されるそれらの方法を用いて行われ得る。1つの典

50

型的な例においては、ポリペプチドが、固体支持体上に固定され、そして固定されたポリペプチドへの血清内の抗体の結合を可能にするために、患者の血清と接触せしめられ得る。次に、未結合の血清が除去され、そして結合された抗体が、例えば¹²⁵I - ラベルされたタンパク質Aを用いて検出される。

【0105】

当業者により認識されるように、本明細書に開示されるポリペプチドの免疫原性部分はまた、本発明により包含される。“免疫原性部分”とは、本明細書において使用される場合、ポリペプチドを認識するB - 細胞及び/又はT - 細胞表面抗原受容体とそれ自体、免疫学的に反応する（すなわち、特異的に結合する）、本発明の免疫原性ポリペプチドのフラグメントである。免疫原性部分は一般的に、良く知られている技法、例えばPaul, Fundamental Immunology, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993) 及びそこに引用される文献に要約されるそれらの技法を用いて同定され得る。

10

【0106】

そのような技法は、抗原 - 特異的抗体、抗血清及び/又はT - 細胞系又はクローンと反応する能力についてのポリペプチドのスクリーニングを包含する。本明細書において使用される場合、抗血清及び抗体は、それらが抗原に対して特異的に結合する場合（すなわち、それらがELISA又は他のイムノアッセイにおいてタンパク質と反応し、そして関係ないタンパク質と検出できるほど反応しない場合）、“抗原 - 特異的”である。そのような抗血清及び抗体は、本明細書に記載されるようにして、及び良く知られている技法を用いて調製され得る。

20

【0107】

1つの好ましい態様においては、本発明のポリペプチドの免疫原性部分は、十分な長さのポリペプチドの反応性よりも実質的に低くないレベルで抗血清及び/又はT - 細胞と反応する部分である（例えば、ELISA及び/又はT - 細胞反応アッセイにおいて）。好ましくは、免疫性部分の免疫原活性のレベルは、十分な長さのポリペプチドについての免疫原性の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%及び最も好ましくは約90%以上である。多くの場合、例えば約100%又は150%、もしくはそれ以上の免疫原活性を有する、その対応する十分な長さのポリペプチドの免疫原活性よりも高いレベルの免疫原活性を有する好ましい免疫原性部分が同定されるであろう。

【0108】

一定の他の態様においては、典型的な免疫原性部分は、N - 末端リーダー配列及び/又はトランスメンブランドメインが欠失されているペプチドを包含することができる。他の典型的な免疫原性部分は、成熟タンパク質に対して、小さなN - 及び/又はC - 末端欠失（例えば、1 ~ 30個のアミノ酸、好ましくは5 ~ 15個のアミノ酸）を含むであろう。

30

もう1つの態様においては、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチド、特に本明細書に開示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はその免疫性フラグメント又は変異体に対して生成されたT細胞及び/又は抗体と免疫学的に反応する1又は複数のポリペプチドを含んで成ることができる。

【0109】

本発明のもう1つの態様においては、本明細書に記載される1又は複数のポリペプチドと免疫学的に反応するT細胞及び/又は抗体を誘発することができる1又は複数のポリペプチド、又は本明細書に開示されるポリヌクレオチド、又はその免疫原性フラグメント又は変異体に含まれる連続した核酸配列、又は中位 ~ 高い緊縮の条件下で1又は複数のそれらの核酸配列に対してハイブリダイズする1又は複数の核酸配列によりコードされる1又は複数のポリペプチドを含んで成るポリペプチドが提供される。

40

【0110】

もう1つの観点においては、本発明は、本明細書に示されるポリペプチド組成物の少なくとも約5, 10, 15, 20, 25, 50又は100個、又はそれ以上の、例えばすべて中間の長さのアミノ酸、例えば配列番号: 112, 172, 176, 178, 327, 329, 331, 336, 339, 376-380, 383, 477-483, 496, 504, 505, 519, 520, 522, 525, 527, 532, 534, 537-551, 553-568

50

, 573-586, 588-590, 592, 706-708, 775, 776, 778, 780, 781, 811, 814, 818, 826, 827, 853, 855, 858, 860-862, 866-877, 879, 883-893, 895, 897, 898, 909-915, 920-928, 932-934, 940, 941, 943, 946, 947, 949-966, 968, 977-990, 992, 1003, 1005, 1008, 1009, 1011, 1012, 1020, 1022, 1028-1029, 及び1030-1033で示されるそれらのもの、又は配列番号：1-111, 115-171, 173-175, 177, 179-305, 307-315, 326, 328, 330, 332-335, 340-375, 381, 382 及び 384-476, 524, 526, 530, 531, 533, 535, 536, 552, 569-572, 587, 591, 593-606, 618-705, 709-774, 777, 789, 817, 823, 824, 878, 880-882, 894, 896, 907, 908, 916-919, 929-931, 938, 939, 942, 944, 945, 948, 967, 969-976, 991, 993-1002, 1004, 1006, 1007, 1010, 1013-1019, 1021, 及び1023-1027の配列で示されるポリヌクレオチド配列によりコードされるそれらのものを含んで成るポリペプチドフラグメントを提供する。

10

【0111】

もう一つの観点においては、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチド組成物の変異体を提供する。一般的に本発明により包含されるポリペプチド変異体は典型的には、本明細書に示されるポリペプチド配列に対して、その長さにそって、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%又はそれ以上の同一性（下記のようにして決定される）を示すであろう。

1つの好ましい態様においては、本発明により提供されるポリペプチドフラグメント及び変異体は、本明細書に特異的に示される十分な長さのポリペプチドと反応する抗体及び/又はT-細胞と免疫学的に反応する。

20

【0112】

もう一つの好ましい態様においては、本発明により提供されるポリペプチドフラグメント及び変異体は、本明細書に特異的に示される十分な長さのポリペプチドにより示されるレベルの少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%及び最も好ましくは少なくとも約90%又はそれ以上の免疫原活性のレベルを示す。

ポリペプチド“変異体”とは、本明細書において使用される場合、1又は複数の置換、欠失、付加及び/又は挿入により、本明細書に特異的に開示されるポリペプチドとは典型的に異なるポリペプチドである。そのような変異体は、天然に存在することができ、又は例えば本発明の上記1又は複数のポリペプチド配列の修飾、及び当業界において良く知られている多くの技法のいずれかを用いての、本明細書に記載されるようなそれらの免疫原活性の評価により合成的に生成され得る。

30

【0113】

例えば、本発明のポリペプチドの1つの典型的な変異体は、1又は複数の部分、例えばN-末端リーダー配列又はトランスメンブランドメインが除去されているそれらのものを包含する。他の典型的な変異体は、小さな部分（例えば、1~30個のアミノ酸、好ましくは5~15個のアミノ酸）が成熟タンパク質のN-及び/又はC-末端から除去されている変異体を包含する。

【0114】

多くの場合、変異体は保存性置換を含むであろう。“保存性置換”は、ペプチド化学の当業者が実質的に変更されていないポリペプチドの二次構造及び水治療性質を予測できるように、1つのアミノ酸が、類似する性質を有するもう1つのアミノ酸により置換されている置換である。上記に記載されるように、修飾は、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの構造体において行われ得、そしてさらに、所望する特性、例えば免疫原特性を有する変異体又は誘導体ポリペプチドをコードする機能的分子を得ることができる。本発明のポリペプチドの同等の、又はさらに改良された免疫原性変異体又はその一部を創造するためにポリペプチドのアミノ酸配列を変更することが所望される場合、当業者は典型的には、表1に従って、コードするDNA配列の1又は複数のコドンを変更するであろう。

40

【0115】

例えば、一定のアミノ酸は、基質分子上の抗体の抗原-結合領域又は結合部位との相互作用結合能力の測定できる損失を伴わないで、タンパク質構造における他のアミノ酸に

50

より置換され得る。それは、タンパク質の生物学的機能的活性を定義するタンパク質の相互作用能力及び性質であるので、一定のアミノ酸配列置換は、タンパク質配列及びもちろん、その基本的なDNAコード配列において行われ得、そしてそれにもかかわらず、同様の性質を有するタンパク質を得ることができる。従って、種の変更は、それらの生物学的有用性又は活性の測定できる損失を伴わないで、開示される組成物のペプチド配列、又は前記ペプチドをコードする、対応するDNA配列において行われ得る。

【 0 1 1 6 】

【表 1】

10

アミノ酸	コドン							
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
システイン	Cys	C	UGC	UGU				
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU				
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
リシン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	Met	M	AUG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				

20

30

40

【 0 1 1 7 】

そのような変更を行う場合、アミノ酸の水治療指数が考慮され得る。タンパク質に対して相互反応性生物学的機能を付与する場合のその水治療指数の重要性は、当業界において一般的に理解されている (Kyte and Doolittle, 1982; 引用により本明細書に組み込まれ

50

る)。アミノ酸の相対的水治療特性が、他の分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原及び同様のものとタンパク質との相互作用を定義する、得られるタンパク質の二次構造に寄与することが認められる。個々のアミノ酸は、疎水性及び電荷特徴に基づいて水治療指数を割り当てられている (Kyte and Doolittle, 1982)。それらの値は次の通りである；イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；トレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタメート (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リシン (-3.9)；及びアルギニン (-4.5)。

10

【0118】

一定のアミノ酸が、類似する水治療指数又は評点を有する他のアミノ酸により置換され得、そしてさらに、類似する生物学的活性を有するタンパク質をもたら、すなわち、生物学的機能的に同等のタンパク質をさらに得ることができると知られている。そのような変更を行う場合、水治療指数が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内のそれらの置換が特に好ましく、そして ± 0.5 以内のそれらの置換がさらにより特別には好ましい。同様のアミノ酸の置換は、親水性に基づいて効果的に行われ得ることはまた、当業界において理解されている。アメリカ特許第4,554,101号 (引用により本明細書中に特別に組み込まれる)は、その隣接するアミノ酸の親水性により支配されるように、タンパク質の最高の局部平均親水性は、タンパク質の生物学的性質と相互関係することを言及する。

20

【0119】

アメリカ特許第4,554,101号に記載されるように、次の親水性値が、アミノ酸残基に割り当てられて来た：アルギン (+3.0)；リシン (+3.0)；アスパラギン (+3.0 ± 1)；グルタメート (+3.0 ± 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；トレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 ± 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；トリプトファン (-3.4)。アミノ酸が、類似する親水性値を有するもう1つのアミノ酸により置換され得、そしてさらに、生物学的に同等のもの及び特に、免疫学的に同等のタンパク質を得ることができるとは理解されている。そのような変更においては、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内のそれらの置換が好ましく、そして ± 0.5 以内の置換がさらにより特別には、好ましい。

30

【0120】

上記で概略されるように、従ってアミノ酸置換は一般的に、アミノ酸側鎖置換基、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、サイズ及び同様のものの相対的類似性に基づかれている。種々の前記特性を考慮しての典型的な置換は、当業者に良く知られており、そしてアルギニン及びリシン；グルタメート及びアスパラギン；セリン及びトレオニン；グルタミン及びアスパラギン；及びバリン、ロイシン及びイソロイシンを包含する。

40

【0121】

さらに、いずれかのポリヌクレオチドが、インピボでの安定性を高めるために、さらに修飾され得る。可能な修飾は、5'及び/又は3'末端でのフランキング配列の付加；主鎖におけるホスホジエステラーゼ連鎖よりもむしろホスホチオエート又は2'-O-メチルの使用；及び/又は非従来の塩基、例えばイノシン、キユエオシン、ワイプトシン、及びアセチル-メチル、チオ-及び他の修飾された形のアデニン、シチジン、グアニン、チミン及びウリジンの封入を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0122】

アミノ酸置換はさらに、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性及び/又は両性性質における類似性に基づいて行われ得る。例えば、負に荷電されたアミノ酸は、アスパラギン酸及びグルタミンを包含し；正に荷電されたアミノ酸はリシン及びアルギニンを包含し；そし

50

て類似する親水性値を有する荷電されていない極性ヘッド基を有するアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン及びバリン；グリシン及びアラニン；アスパラギン及びグルタミン；及びセリン、トレオニン、フェニルアラニン及びチロシンを包含する。

【0123】

保存性変化を提供することができる他のグループのアミノ酸は、次のものを包含する：(1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; 及び(5) phe, tyr, trp, his。変異体はまた、又は他方では、非保存性変化を含むことができる。好ましい態様においては、変異体のポリペプチドは、5個又はそれよりも少ないアミノ酸の置換、欠失又は付加により、生来の配列とは異なる。変異体はまた(又は他方では)、例えばポリペプチドの免疫原性、二次構造及び水治療性質に最少の影響を及ぼすアミノ酸の欠失又は付加により修飾され得る。

10

【0124】

上記に示されるように、ポリペプチドは、タンパク質の移行を、同時翻訳的に又は後翻訳的に方向づける、タンパク質のN-末端でのシグナル(又はリーダー)配列を含んで成ることができる。前記ポリペプチドはまた、ポリペプチド(例えば、ポリ-His)の合成、精製又は同定の容易さのために、又は固体支持体へのポリペプチドの結合を増強するために、リンカー又は他の配列に接合され得る。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域に接合され得る。

20

【0125】

ポリペプチド配列を比較する場合、2つの配列は、それらの2種の配列におけるアミノ酸の配列が、下記のように、最大の対応性について一列整列される場合、同じであるなら、“同一”であると言われる。2種の配列間の比較は典型的には、配列類似性の局部領域を同定し、そして比較するために、比較窓にわたって配列を比較することによって行われる。“比較窓”とは、本明細書において使用される場合、少なくとも約20、通常30~約70、40~約50個の連続した位置のセグメントを言及し、ここで1つの配列が、2種の配列が最適に一列整列された後、同じ数の連続位置の対照配列に比較され得る。

【0126】

比較のための配列の最適な一列整列は、デフォルトパラメーターを用いて、生物情報化学ソフトウェアのLasergene組みにおけるMegalinプログラム(DNASTAR, Inc., Madison, WI)を用いて行われ得る。このプログラムは、次の文献に記載されるいくつかの一列整列スキームを具体化する：Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80:726-730。

30

40

【0127】

他方では、比較のための配列の最適な一列整列は、Smith and Waterman (1981) Add. APL Math 2: 482の局部同一アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の同一性一列整列アルゴリズムにより、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性方法についての調査により、それらのアルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)におけるGAP, BESTFIT, BLAST, FASTA及びTFASTA)のコンピューター処理された実行により、又は調査により行われ得る。

50

【0128】

%配列同一性及び配列類似性を決定するために適切であるアルゴリズムの1つの好ましい例は、それぞれ、Altschulなど., (1977) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402及びAltschulなど., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410に記載されるBLST及びBLAST2.0アルゴリズムである。BLAST及びBLAST2.0は、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドについての%配列同一性を決定するために、本明細書に記載されるパラメーターと共に使用される。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information を通して入手できる。

【0129】

アミノ酸配列に関しては、評点マトリックスが、累積評点を計算するために使用され得る。個々の方向におけるワードヒット (word hits) の拡張は、次の場合に停止される：累積一列整列評価が、その最大の達成された値から量X、低下する場合；累積評点が、1又は複数の負の評点残基一列整列の蓄積のために、ゼロ又はそれ以下に進行する場合；又はいずれかの配列の末端に達する場合。BLASTアルゴリズムパラメーターW, T及びXは、一列整列の感度及び速度を決定する。

10

【0130】

1つの好ましいアプローチにおいては、“配列同一性の%”は、少なくとも20の位置の比較窓にわたって、2種の最適に一列整列された配列を比較することによって決定され、ここで比較窓におけるポリペプチド配列の部分は、2種の配列の最適な一列整列に関して、対照配列 (付加又は欠失を含まない) に比較して、20%又はそれ以下、通常5 - 15%又は10~12%の付加又は欠失 (すなわち、ギャップ) を含んで成ることができる。百分率は、同一のアミノ酸残基が、適合される位置の数を得るために、両配列に存在する位置の数を決定し、対照配列における位置の合計数により前記適合された位置の数を割り算し、そして配列同一性の%を得るために、前記結果に100を掛け算することによって計算される。

20

【0131】

他の例示的態様においては、ポリペプチドは、本明細書に記載されるような複数のポリペプチドを含んで成るか、又は本明細書に記載されるような少なくとも1つのポリペプチド及び未関係の配列、例えば既知の腫瘍タンパク質を含んで成る融合ポリペプチドであり得る。融合パートナーは例えば、Tヘルパーエピトープ (免疫学的融合パートナー)、好ましくはヒトにより認識されるTヘルパーエピトープの供給を助けることができ、又は生来の組換えタンパク質よりも高い収でのタンパク質 (発現エンハンサー) の発現を助けることができる。一定の好ましい融合パートナーは、免疫学的及び発現増強融合パートナーである。他の融合パートナーは、ポリペプチドの融解性を高めるために、又は所望する細胞内区画へのポリペプチドの標的化を可能にするために、選択され得る。さらに融合パートナーは、ポリペプチド精製を促進する親和性標識を包含する。

30

【0132】

融合ポリペプチドは一般的に、化学的接合を包含する標準の技法を用いて調製され得る。好ましくは、融合ポリペプチドは、発現システムにおいて、融合されていないポリペプチドに対して、高められたレベルの生成を可能にする組換えポリペプチドとして発現される。手短には、ポリペプチド成分をコードするDNA配列は、別々にアセンブリーされ、そして適切な発現ベクター中に連結される。1つのポリペプチド成分をコードするDNA配列の3'末端が、配列の読み取り枠が整合して存在するよう、第2のポリペプチド成分をコードするDNA配列の5'末端に、ペプチドリンカーを伴って又はそれを伴わないで連結される。これは、両成分ポリペプチドの生物学的活性を保持する単一の融合ポリペプチド中への翻訳を可能にする。

40

【0133】

ポリペプチドリンカー配列は、個々のポリペプチドがその二次及び三次構造に折りたたむことを確保するための十分な距離、第1及び第2ポリペプチド成分を分離するために使用され得る。そのようなポリペプチドリンカー配列は、当業界において良く知られている

50

標準の技法を用いて、融合ポリペプチド中に導入される。適切なペプチドリinker配列は、次の要因に基づいて選択され得る：(1)柔軟な延長されたコンホメーションを採用するためのそれらの能力；(2)第1及び第2ポリペプチド上の機能的エピトープと相互作用する二次構造を採用するそれらの無能性；及び(3)ポリペプチド機能的エピトープと反応する疎水性又荷電された残基の欠失。

【0134】

好ましいペプチドリinker配列は、Gly, Asn及びSer残基を含む。他の類似する中性アミノ酸、例えばThr及びAlaがまた、リinker配列に使用され得る。リinkerとして有用に使用され得るアミノ酸配列は、Marateaなど., Gene 40: 39-4, 1985; Murphyなど., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA83: 8258 - 8262, 1988; アメリカ特許第4,935,233号及びアメリカ特許第4,751,180号に開示されるそれらの配列を包含する。リinker配列は一般的に、1~約50個の長さのアミノ酸であり得る。リinker配列は、第1及び第2ポリペプチドが、機能的ドメインを分離し、そして立体的障害を妨げるために使用され得る非必須N-末端アミノ領域を有する場合、必要とされない。

10

【0135】

連続されたDNA配列は、適切な転写又は翻訳調節要素に操作可能的に連結され。DNAの発現を担当する調節要素は、第1ポリペプチドをコードするDNAの5'側のみに位置する。同様に、翻訳及び転写終結シグナルを終結するために必要とれる停止コドンは、第2ポリペプチドをコードするDNA配列の3'側のみに存在する。

融合ポリペプチドは、未関連の免疫原タンパク質、例えば再現応答を誘発できる免疫原タンパク質と共に、本明細書に記載されるようなポリペプチドを含んで成る。そのようなタンパク質の例は、破傷風、結核及び肝炎タンパク質を包含する(例えば、Stouteなど., New Engl. J. Med., 336: 86-91, 1997を参照のこと)。

20

【0136】

1つの好ましい態様においては、免疫学的融合パートナーは、マイコバクテリウムsp., 例えばマイコバクテリウム・ツベルキロシス(Mycobacterium tuberculosis) - 由来のRa12フラグメントから誘導される。異種ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列の発現及び/又は免疫原性の増強へのそれらの使用のためのRa12組成物及び方法は、アメリカ特許出願60/158,585号(その開示は引用により本明細書に組み込まれる)に記載される。手短には、Ra12は、マイコバクテリウム・ツベルキロシスMTB32A核酸の副配列であるポリヌクレオチド領域を言及する。MT32Aは、M.ツベルキロシスのビルレント及び非ビルレント株における遺伝子によコードされる、32KDの分子量のセリンプロレアーゼである。

30

【0137】

MTB32Aのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は記載されている(例えば、アメリカ特許出願60/158,585号;また、Skeikyなど., infection and Immun. (1999 67: 3998-4007 (引用により本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。MTB32Aコード配列のC-末端フラグメントは、高レベルで発現し、そして精製工程を通して可溶性ポリペプチドとして存続する。さらに、Ra12は、それが融合される異種免疫原ポリペプチドの免疫原性を増強することができる。1つの好ましいRa12融合ポリペプチドは、MTB32Aのアミノ酸残基192~323に対応する14kDのC-末端フラグメントを含んで成る。他の好ましいRa12ポリヌクレオチドは一般的に、Ra12ポリペプチドの一部をコードする、少なくとも約15個の連続したヌクレオチド、少なくとも約30個のヌクレオチド、少なくとも約60個のヌクレオチド、少なくとも約100個のヌクレオチド、少なくとも約200個のヌクレオチド、又は少なくとも約300個のヌクレオチドを含んで成る。

40

【0138】

Ra12ポリヌクレオチドは、生来の配列(すなわち、Ra12ポリペプチド又はその一部をコードする内因性配列)を含んで成り、又はそのような配列の変異体を含んで成ることができる。Ra12ポリヌクレオチド変異体は、コードされる融合ポリペプチドの生物学的活性が、生来のRa12ポリペプチドを含んで成る融合ポリペプチドに対して、実質的に低められないように、1又は複数の置換、付加、欠失及び/又は挿入を含むことができる。変異体は

50

好ましくは、生来のRa12ポリペプチド又はその一部をコードするポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも約70%の同一性、より好ましくは少なくとも約80%の同一性及び最も好ましくは少なくとも約90%の同一性を示す。

【0139】

他の好ましい態様においては、免疫学的融合パートナーは、タンパク質D、すなわちグラム陰性細菌ヘモフィラス・インフルエンザBから誘導される(WO91/18926号)。好ましくは、タンパク質D誘導体はタンパク質のほぼ1/3(例えば、最初のN-末端の100~110個のアミノ酸)を含んで成り、そしてタンパク質D誘導体は脂質化され得る。一定の好ましい態様においては、リポタンパク質D融合パートナーの最初の109個の残基は、追加の外因性T-細胞エピートプを有するポリペプチドを供給するために、及びE.コリにおける発現レベルを高めるために(従って、発現エンハンサーとして機能する)、N-末端上に包含される。脂質末端は、抗原提供細胞への抗原の最適な提供を確保する。他の融合パートナーは、インフルエンザウィルスからの非構造タンパク質、NS1(ヘマグルチニン)を含む。典型的には、N-末端の8個のアミノ酸が使用され得るが、但し、T-ヘルパーエピートプを含む異なったフラグメントも使用され得る。

10

【0140】

もう一つの態様においては、免疫学的融合パートナーは、LYTAとして知られているタンパク質、又はその一部(好ましくは、C-末端部分)である。LYTAは、アミダーゼLYTA(LytA遺伝子によりコードされる; Gene 43: 265-292, 1986)として知られているN-アセチル-L-アラニンアミダーゼを合成する、ストレプトコカス・プネウモニアエ(Streptococcus pneumoniae)から誘導される。LYTAは、ペプチドグリカン主鎖における一定の結合を特異的に分解する自己溶菌酵素である。

20

【0141】

LYTAタンパク質のC-末端ドメインは、コリン又はコリン類似体、例えばDEAEに対する親和性を担当できる。この性質は、融合タンパク質の発現のために有用であるE.コリC-LYTA発現プラスミドの生成のために開発されて来た。アミノ末端でC-LYTAフラグメントを含むハイブリッドタンパク質の精製は記載されている(Biotechnology 10: 795-798, 1992を参照のこと)。好ましい態様においては、LYTAの反復体部分は、融合ポリペプチド中に組み込まれ得る。反復体部分は、残基178で開始するC-末端領域に見出される。特に好ましい部分は、残基188-305を組み込む。

30

【0142】

さらにもう一つの例示的な態様は、融合ポリペプチド及びそれらをコードするポリヌクレオチドを包含する。ここで融合パートナーは、アメリカ特許第5,633,234号に記載されるように、エンドソーム/リソソーム区画にポリペプチドを方向づけることができる標的化シグナルを含んで成る。本発明の免疫原ポリペプチドは、この標的化シグナルとともに融合される場合、MHCクラスII分子とより効果的に会合し、そしてそれにより、ポリペプチドに対して特異的なCD4⁺T-細胞の増強されたインビボ刺激を提供する。

【0143】

本発明のポリペプチドは、種々の良く知られた合成及び/又は組換え技法のいずれかを用いて調製され、その後者は、下記にさらに記載される。一般的に約150個よりも少ないアミノ酸のポリペプチド、その一部及び他の変異体は、当業者に良く知られている技法を用いて、合成手段により生成され得る。一つの例示的な例においては、そのようなポリペプチドは、市販の固相技法、例えばMerrifield固相合成方法(ここで、アミノ酸は、成長するアミノ酸鎖に連続的に付加される)のいずれかを用いて合成される。Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2146, 1963を参照のこと。ポリペプチドの自動化された合成のための装置は、供給者、例えばPerkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA) から市販されており、そして製造業者の説明書に従って操作され得る。

40

【0144】

一般的に、本発明のポリペプチド組成物(融合ポリペプチドを含む)が単離される。“単離された”ポリペプチドは、その元の環境から除去されるポリペプチドである。例えば

50

、天然に存在するタンパク質又はポリペプチドは、それが天然のシステムにおける同時存在する材料のいくつか又はすべてから分離される場合、単離される。好ましくは、そのようなポリペプチドはまた、精製され、例えば少なくとも約90%の純度、より好ましくは少なくとも約95%の純度、及び最も好ましくは少なくとも約99%の純度である。

【0145】

ポリヌクレオチド組成物

本発明は、他の面において、ポリヌクレオチド組成物を提供する。用語「DNA」および「ポリヌクレオチド」は、粒子の種の全ゲノムDNAを含まない単離されたDNA分子を意味するために本質的に互換的に使用される。「単離された」は、本明細書において使用するとき、ポリヌクレオチドが他のコーディング配列から実質的に離れていること、および無関係のコーディングDNAの大きい部分、例えば、染色体フラグメントまたは他の機能的遺伝子またはポリペプチドコーディング領域を含有しないことを意味する。もちろん、これは本来単離されたDNA分子を意味し、そして人間の手によりセグメントに後に付加された遺伝子またはコーディング領域を排除しない。

10

【0146】

当業者は理解するように、本発明のポリヌクレオチド組成物は、ゲノム配列、余分のゲノムおよびプラスミドコード化配列およびタンパク質、ポリペプチド、ペプチドおよびその他を発現するか、あるいは発現するように適合可能な、より小さい操作された遺伝子セグメントを包含することができる。このようなセグメントは自然に単離されるか、あるいは人間の手によりより合成的に修飾することができる。

20

【0147】

また、当業者は認識するように、本発明のポリヌクレオチドは一本鎖（コーディングまたはアンチセンス）または二本鎖であることができ、そしてDNA（ゲノム、cDNAまたは合成的）またはRNA分子であることができる。RNA分子は、イントロンを含有しかつ1対1の方法でDNA分子に対応するHnRNA、およびイントロンを含有しないmRNA分子を包含することができる。追加のコーディングまたは非コーディング配列は、本発明のポリヌクレオチド内に存在することができるが、存在することは不必要であり、そしてポリヌクレオチドは、他の分子および/または支持物質に結合することができるが、結合することは不必要である。

30

【0148】

ポリヌクレオチドは天然配列（すなわち、本発明のポリペプチド/タンパク質またはその一部分をコードする内因性配列）を含んでなることができるか、あるいはこのような配列の変異型、好ましくは免疫原性変異型をコードする配列を含んでなることができる。

【0149】

したがって、本発明の他の面によれば、配列番号1~111、115~171、173~175、177、179~305、307~315、326、328、330、332~335、340~375、381~382および384~476、524、526、530、531、533、535、536、552、569~572、587、591、593~606、618~705、709~774、777、789、817、823、824、878、880~882、894、896、907、908、916~919、929~931、938、939、942、944、945、948、967、969-976、991、993-1002、1004、1006、1007、1010、1013-1019、1021、及び1023-1027のいずれか1つに記載されるポリヌクレオチド配列のいくつかまたはすべて、

40

【0150】

配列番号1~111、115~171、173~175、177、179~305、307~315、326、328、330、332~335、340~375、381~382および384~476、524、526、530、531、533、535、536、552、569~572、587、591、593~606、618~705、709~774、777、789、817、823、824、878、880~882、894、896、907、908、916~919、929~931、938、939、942、944、945、948、967、969-976、991、993-1002、1004、1006、1007、1010、1013-1019、1021、及び1023-1027のいずれか1つに記載されるポリヌクレオチド配列の相補体、および

【0151】

配列番号1~111、115~171、173~175、177、179~305、307~315、326、328、330、33

50

2 ~ 335、340 ~ 375、381 ~ 382および384 ~ 476、524、526、530、531、533、535、536、552、569 ~ 572、587、591、593 ~ 606、618 ~ 705、709 ~ 774、777、789、817、823、824、878、880 ~ 882、894、896、907、908、916 ~ 919、929 ~ 931、938、939、942、944、945、948、967、969-976、991、993-1002、1004、1006、1007、1010、1013-1019、1021、及び1023-1027のいずれか1つに記載されるポリヌクレオチド配列のデジェネレート変異型を含んでなるポリヌクレオチド組成物が提供される。ある好ましい態様において、本明細書に記載するポリヌクレオチド配列は、前述したように、免疫原性ポリヌクレオチドをコードする。

【0152】

他の関係する態様において、本発明は、配列番号1 ~ 111、115 ~ 171、173 ~ 175、177、179 ~ 305、307 ~ 315、326、328、330、332 ~ 335、340 ~ 375、381 ~ 382および384 ~ 476、524、526、530、531、533、535、536、552、569 ~ 572、587、591、593 ~ 606、618 ~ 705、709 ~ 774、777、789、817、823、824、878、880 ~ 882、894、896、907、908、916 ~ 919、929 ~ 931、938、939、942、944、945、948、967、969-976、991、993-1002、1004、1006、1007、1010、1013-1019、1021、及び1023-1027で本明細書に開示する配列に対して実質的の同一性を有するポリヌクレオチド変異型、例えば、本明細書に記載する方法（例えば、後述するように、標準パラメータを使用してBLAST分析）を使用して本発明のポリヌクレオチドと比較して少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%またはそれより高い配列同一性を有するポリヌクレオチド変異型を提供する。当業者は認識するように、コドンデジェネラシー、アミノ酸類似性、リーディングフレームの位置決定およびその他を考慮することによって、これらの値を適当に調節して、2つのヌクレオチド配列によりコードされる対応する同一性を決定することができる。

【0153】

典型的には、ポリヌクレオチド変異型は、好ましくは詳しく本明細書に記載するポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドに関して、変異型ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの免疫原性が実質的に減少しないように、1またはそれ以上の置換、付加、欠失および/または挿入を含有するであろう。用語「変異型」は、また、異種由来の相同的遺伝子を包含することを理解すべきである。

【0154】

追加の態様において、本発明は、本明細書に開示する配列の1またはそれ以上に対して同一であるか、あるいは相補的である配列の種々の長さの隣接ストレッチを含んでなるポリヌクレオチドフラグメントを提供する。例えば、本明細書に開示する配列の1またはそれ以上の少なくとも10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500または1000またはそれより長い隣接ヌクレオチドならびにそれらの間のすべての中間的長さのものを含んでなるポリヌクレオチドが本発明により提供される。容易に理解されるように、「中間的長さのもの」は、これに関して、記載値間の任意の長さ、例えば、16、17、18、19、およびその他；30、31、32、およびその他；50、51、53、およびその他；100、101、102、103、およびその他；150、151、152、153、およびその他を意味し、200 ~ 500；500 ~ 1,000、およびその他のすべての整数を包含する。

【0155】

本発明の他の態様において、中 ~ 高いストリンジェンシイの条件下に本発明において提供されるポリヌクレオチド、またはそのフラグメント、またはその相補的配列に対してハイブリダイゼーションすることができるポリヌクレオチド組成物が提供される。ハイブリダイゼーション技術は分子生物学の分野においてよく知られている。

【0156】

例示の目的で、本発明のポリヌクレオチドと他のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するために適当な中程度のストリンジェント条件は、下記の条件を包含する：5 × SSC、0.5% SDS、1.0mMのEDTA (pH8.0) の溶液中の前洗浄；50 ~ 60、5 × SSCにおける一夜のハイブリダイゼーション；次いで0.1% SDSを含有する2 ×、0.5 × および0.2

10

20

30

40

50

×SSCの各々を使用する65 において20分間の洗浄。当業者は理解するように、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシイは、例えば、ハイブリダイゼーション溶液の塩含量および/またはハイブリダイゼーションを実行する温度を変更することによって、容易に操作することができる。例えば、他の態様において、適当な高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は前述の条件を包含するが、ただしハイブリダイゼーションの温度は、例えば、60~65 または65~70 に増加する。

【0157】

ある好ましい態様において、前述のポリヌクレオチド、例えば、ポリヌクレオチド変異型、フラグメントおよびハイブリダイゼーション配列は、本明細書に詳しく記載するポリペプチド配列と免疫学的に交差反応するポリペプチドをコードする。他の好ましい態様において、このようなポリヌクレオチドは、本明細書に詳しく記載するポリペプチド配列についての免疫原活性レベルの少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約90%の免疫原活性レベルを有するポリペプチドをコードする。

10

【0158】

本発明のポリヌクレオチド、またはそれらのフラグメントは、コーディング配列それ自体の長さを無視して、他のDNA配列、例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコーディングセグメント、およびその他と組み合わせ、それらの全体の長さをかなり変化させることができる。したがって、ほとんど任意の長さの核酸フラグメントを使用することができ、全長さは調製の容易さおよび意図する組換えDNAプロトコルにおける使用により制限されることが考えられる。例えば

20

【0159】

ポリヌクレオチド配列を比較するとき、2つの配列中のヌクレオチド配列が、後述するように、最大対応で整列する場合、2つの配列中のヌクレオチド配列は「同一」と言われる。典型的には、2つの配列間の比較は、比較ウィンドウ上で配列を比較して配列類似性の局所的領域を同定し、比較することによって行なわれる。「比較ウィンドウ」は、本明細書において使用するとき、少なくとも約20、通常30~約75、好ましくは40~約50の隣接位置のセグメントを意味し、ここで2つの配列間が最適に整列された後、配列を同数の隣接位置の参照配列と比較することができる。

30

【0160】

比較のための配列の最適な整列は、バイオインフォーマティクスソフトウェアのレーザージーン (Lasergene) 組中のメガリン (Megalign) プログラム (DNASTR, Inc.、ウイスコンシン州マディソン) に従いデフォルトパラメーターを使用して実行することができる。このプログラムは下記の文献に記載されているいくつかの整列スキームに具体化される: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (編者) Atlas of Protein Sequence and Structures, National Biomedical Research Foundation, ワシントンD.C. Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345 - 358 ;

40

【0161】

Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626 - 645 Methods in Enzymology Vol. 183, Academic Press, Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ; Higgins, D.G. および Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5 : 151 - 153 ; Myers, E.W. および Muller W. (1988) CABIOS 4 : 11 - 17 ; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11 : 105 ; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4 : 406 - 425 ; Sneath, P.H.A. および Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, カリフォルニア州サンフランシスコ ; Wilbur, W.J. および Lipman, D.J. (1983) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80 : 726 - 730.

【0162】

50

選択的に、比較のための配列の最適な整列は、SmithおよびWaterman (1981) *Add. APL. Math* 2: 482の局所的同一性アルゴリズム、NeedlemanおよびWunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443の局所的同一性アルゴリズム、PearsonおよびLipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444の類似性の方法のサーチ、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行 (GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group (GCG)、575 Science Dr.、ウイソコンシン州マディソン)、または検査により実行することができる。

【0163】

配列同一性および配列類似性の百分率を決定するために適当なアルゴリズムの1つの好ましい例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Altschul他 (1977) *Nucl. Acids Res.* 25: 3389 - 3402およびAltschul他 (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0を、例えば、本明細書に記載するパラメータとともにを使用して、本発明のポリヌクレオチドについての配列類似性の百分率を決定することができる。BLAST分析を実行するソフトウェアは、ナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーション (National Center for Biological Information) を通じて公衆用に入手可能である。

【0164】

1つの例示的例において、例えば、ヌクレオチド配列、パラメーターM (1対の合致する残基についての報酬スコア; 常に > 0) およびN (不一致残基についてのペナルティスコア; 常に < 0) を使用して、累積スコアを計算することができる。各方向におけるワードのヒットのエクステンションは下記の場合に中止される: 1またはそれ以上の負のスコアの残基の整列の蓄積のために、累積がゼロ以下になる場合; またはいずれかの配列の末端に到達する場合。BLASTアルゴリズムパラメーターはW、TおよびXは整列の感度および速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列について) は下記の値をデフォルトとして使用する: 11のワード長さ、および10のエクステンション (E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス (HenikoffおよびHenikoff (1989) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89: 10915参照) 整列、50の (B)、10のエクステンション (E)、M = 5、N = - 4および両方の鎖の比較。

【0165】

好ましくは、「配列同一性の百分率」は、少なくとも20の位置の比較ウィンドウ上で2つの最適に整列された配列を比較することによって決定され、ここで2つの配列間の最適な整列についての参照配列 (これらは付加または欠失を含まない) に比較して、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列の一部は20%以下、通常5~15、または10~12%の付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含むことができる。同一核酸塩基が両方の配列の中に存在する位置の数を決定して合致した位置の数を確定し、合致した位置の数を参照配列中の位置の全数 (すなわち、ウィンドウサイズ) で割り、100を掛けて配列同一性の百分率を決定することによって、百分率を計算する。

【0166】

当業者は認識するように、遺伝暗号のデジェネラシーの結果として、本明細書に記載するようにポリペプチドをコードする多数のヌクレオチド配列が存在する。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、任意の天然遺伝子のヌクレオチド配列に対して最小の相同性を支持する。それにもかかわらず、コドン使用頻度の差のために変化するポリヌクレオチドは、本発明により特別に意図される。さらに、本発明において提供されるポリヌクレオチド配列を含んでなる遺伝子のアレレは本発明の範囲内に入る。アレレは、ヌクレオチドの1またはそれ以上の突然変異、例えば、欠失、付加および/または置換の結果として、変更された内因性遺伝子である。生ずるmRNAおよびタンパク質は変更された構造または機能を有することができるが、有することは不必要である。アレレは標準2つの配列間 (例えば、ハイブリダイゼーション、増幅および/またはデータベースの配列の比較により同定することができる)。

【0167】

したがって、本発明の他の態様において、本明細書に記載するポリペプチドの免疫原性変異型および/または誘導体を調製するために、突然変異誘発アプローチ、例えば、部位特異的突然変異誘発を使用する。このアプローチにより、ポリペプチドをコードする根元的ポリヌクレオチドの突然変異誘発により、ポリペプチド配列中の特異的修飾を行うことができる。これらの技術は、例えば、1またはそれ以上のヌクレオチド配列をポリヌクレオチドの中に導入することによって、前述の考えの1またはそれ以上を組み込んだ、配列の変異型を調製し、試験する簡単なアプローチを提供する。

【0168】

部位特異的突然変異誘発により、所望の突然変異のDNA配列をコードする特異的ポリヌクレオチド配列、ならびに十分な数の調節ヌクレオチドを使用して突然変異を産生して、
10
トラバースされる欠失結合部の両側に安定な二重らせんを形成することができる。選択したポリヌクレオチド配列において突然変異を使用して、ポリヌクレオチドそれ自体の性質を改良し、変更し、減少し、修飾し、またはそうでなければ変化させ、コード化されたポリペプチドの性質、活性、組成、安定性、または一次配列を変更することができる。

【0169】

本発明のある態様において、本発明は、コード化されたポリペプチドの1またはそれ以上の性質、例えば、ポリペプチドワクチンの免疫原性を変更するために、開示されたポリヌクレオチド配列の突然変異誘発を意図する。部位特異的突然変異誘発の技術はこの分野においてよく知られており、そしてポリペプチドおよびポリヌクレオチドの両方の変異型の調製に広く使用される。例えば、部位特異的突然変異誘発はDNA分子の特定の部分を
20
変更するためにしばしば使用される。このような態様において、典型的には約14～約23ヌクレオチドを含んでなるか、あるいはそのような長さのプライマーを使用し、配列の結合の両側の約5～約10残基が変更される。

【0170】

当業者は理解するように、部位特異的突然変異誘発技術において、一本鎖および二本鎖の両方の形態で存在するファージベクターがしばしば使用されてきている。典型的には、部位特異的突然変異誘発において有効なベクターはM13ファージのようなベクターを包含する。これらのファージは容易に商業的に入手可能であり、そしてそれらの使用は一般にこの分野においてよく知られている。また、問題の遺伝子をプラスミドからファージに転移させる工程を排除する二本鎖プラスミドが部位特異的突然変異誘発において日常的に使用される。
30

【0171】

本発明に従う部位特異的突然変異誘発は、まず一本鎖ベクターを獲得するか、あるいは所望のペプチドをコードするDNA配列をその配列の中に含む二本鎖ベクターの2つの鎖を溶融分離することによって実行される。所望の突然変異した配列を支持するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般に合成的に、調製された。次いでこのプライマーを一本鎖ベクターとアニールし、DNA重合酵素、例えば、大腸菌 (*E. coli*) ポリメラーゼIクレノーフラグメントに暴露して、突然変異を支持する鎖の合成を完結する。こうして、ヘテロ二本鎖が形成され、ここで1つの鎖はオリジナル非突然変異化配列をコードし、そして第2鎖は所望の突然変異を支持する。次いで、このヘテロ二本鎖を使用して適当な細胞、例えば、大腸菌 (*E. coli*) 細胞を形質転換し、突然変異した配列配置を支持する組換えベクターを含むクローンを選択する。
40

【0172】

選択したペプチドをコードするDNAセグメントを部位特異的突然変異誘発により調製する方法は、潜在的に有効な種を産生する手段を提供し、ペプチド配列変異型およびそれらをコードするDNA配列を得ることができる他の方法が存在するので、その方法に限定されない。例えば、所望のペプチド配列をコードする組換えベクターを突然変異誘発因子、例えば、ヒドキシルアミンで処理して配列変異型を得る。これらの方法およびプロトコルに関する特定の詳述は下記の教示の中に見出される：Maloy他、1994；Segal、1976；ProkopおよびBajpai、1991；Kuby1994；およびManiatis他、1982、各々はその目的で引用するこ
50

とによって本明細書の一部とされる。

【0173】

本明細書において使用するとき、用語「オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発手順」は、その初期濃度に関して特定の核酸分子の濃度を増加させるか、あるいは検出可能なシグナル、例えば、増幅の濃度を増加させる、鋳型依存的プロセスおよびベクター仲介増殖を意味する。本明細書において使用するとき、用語「オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発手順」は、プライマー分子の鋳型依存的エクステンションを包含するプロセスを意味する。

【0174】

鋳型依存的プロセスという用語は、RNAまたはDNA分子の核酸合成を意味し、ここで核酸の新しく合成された鎖の配列は相補的塩基対合のよく知られているルールにより支配された（例えば、Watson、1987参照）。典型的には、ベクター仲介法はDNAまたはRNA分子の中への核酸フラグメントの導入、ベクターのクロナル増幅、および増幅された核酸フラグメントの回収を包含する。このような方法の例は米国特許第4,237,224号により提供され、これはその全体において引用することによって特別に本明細書の一部とされる。

【0175】

本発明のポリペプチド変異型を製造する他のアプローチにおいて、米国特許第5,837,458号に記載されているように、リカーシブ配列組換えを使用することができる。このアプローチにおいて、組換えおよびスクリーニングまたは選択の反復サイクルを実行して、例えば、免疫原性活性が増強される、本発明の個々のポリヌクレオチド変異型を「進化」させる。

【0176】

本発明の他の態様において、本発明において提供されるポリヌクレオチド配列は核酸ハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして好都合に使用することができる。それ自体、本明細書に開示する15ヌクレオチド長さの隣接配列と同一であるか、あるいはそれに対して相補的である少なくとも約15隣接ヌクレオチドの配列領域を含んでなる核酸セグメントは特定の実用性を有すると考えられる。また、より長い隣接する同一または相補的配列、例えば、約20、30、40、50、100、200、500、1000（すべての中間長さを包含する）およびなおさらに全長までの配列はある態様において使用されるであろう。

【0177】

このような核酸プローブは、問題の配列に対して特異的にハイブリダイゼーションする能力を有するために、所定の試料中の相補的配列の存在を検出するとき使用することができる。しかしながら、他の使用、例えば、突然変異体種プライマー、または他の遺伝学的構築物の製造において使用するプライマーを調製するための配列情報の使用がまた考えられる。

【0178】

本明細書に記載するポリヌクレオチド配列に対して同一であるか、あるいはそれに対して相補的である、10~14、15~20、30、50、またはさらに100~200ヌクレオチドまたはその他（その上中間長さを包含する）の隣接ヌクレオチドストレッチから成る配列領域を有するポリヌクレオチド分子は、例えば、サザンおよびノザンプロットング、において使用するハイブリダイゼーションプローブとして特に意図される。

【0179】

これは、多様な細胞型およびまた種々の細菌細胞の両方の中の遺伝子産物、またはそのフラグメントの分析を可能とする。フラグメントの全サイズ、ならびに1またはそれ以上の相補的ストレッチのサイズは究極的には意図する使用または特定の核酸セグメントの適用に依存するであろう。より小さいフラグメントは一般にハイブリダイゼーション態様において使用され、ここで隣接相補的領域の長さは、例えば、約15~約100ヌクレオチドの間で、変化することができるが、検出しようとする長さの相補的配列に従い、より大きい隣接相補的ストレッチを使用することができる。

【0180】

約15~25ヌクレオチド長さのハイブリダイゼーションプローブを使用して、安定でありかつ選択的である二重らせん分子を形成することができる。しかしながら、ハイブリッドの安定性および選択性を増加し、これにより得られた特定のハイブリッド分子の品質および程度を改良するために、15塩基長さより大きいストレッチにわたって隣接相補的配列を有する分子は一般に好ましい。一般に、15~25隣接ヌクレオチド、所望ならば、これより長い遺伝子相補的ストレッチを有する核酸分子を設計することが好ましいであろう。

【0181】

ハイブリダイゼーションプローブは本明細書に記載する任意の配列の任意の部分から選択することができる。必要であるすべては、本明細書に記載する配列を概観するか、あるいは配列の任意の部分に対して、プローブまたはプライマーとして利用しようとする、約15~25ヌクレオチド長さから全長までの配列を概観することである。プローブおよびプライマーの配列の選択は種々の因子により支配されることがある。例えば、全配列の末端に向かってプライマーを使用することができる。

10

【0182】

小さいポリヌクレオチドセグメントまたはフラグメントは、例えば、自動化オリゴヌクレオチド合成装置を使用して普通に実施されているように、フラグメントを直接的に合成することによって、容易に調製することができる。また、フラグメントは、核酸複製技術、例えば、米国特許第4,683,202号（引用することによって本明細書の一部とされる）のPCR™技術を適用することによって、選択した配列を組換え体産生のために組換えベクターの中に導入することによって、そして分子生物学の当業者に一般に知られている他の組換えDNA技術により、得ることができる。

20

【0183】

本発明のヌクレオチド配列は、問題の全遺伝子または遺伝子フラグメントの相補的ストレッチを有する二重らせん分子を選択的に形成する能力を有するために、使用することができる。もくろむ適用に依存して、典型的にはハイブリダイゼーションの条件を変化させて、ターゲット配列に対するプローブの選択性の程度を変化させる。高い感度を必要とする適用のために、典型的には相対的ストリンジェントの条件を使用してハイブリッドを形成する、例えば、約50 ~ 約70 の温度における塩濃度を約0.02M ~ 約0.15Mとすることによって、例えば、相対的に低い塩および/または高い温度の条件を選択する。このような選択的条件は、存在する場合、プローブと鋳型またはターゲット鎖との間のわずかのミスマッチを許容し、そして関係する配列の単離に特に適当であろう。

30

【0184】

もちろん、いくつかの適用について、例えば、根元的鋳型に対してハイブリダイゼーションした突然変異体プライマー鎖を使用して突然変異体を調製しようとする場合、ヘテロ二本鎖の形成を可能とするために、典型的には低いストリンジェント（減少したストリンジェンシイ）のハイブリダイゼーション条件を必要とするであろう。これらの環境において、約20 ~ 約55 の範囲の温度において、約0.15M ~ 約0.9Mの塩の条件のような塩条件を使用することができる。

40

【0185】

これにより、交差ハイブリダイゼーション性種を対照ハイブリダイゼーションに関する正のハイブリダイゼーションシグナルとして容易に同定することができる。いずれの場合においても、温度の増加と同一方法でハイブリッド二重らせんを脱安定化する働きをする、増加する量のホルムアミドの添加により、条件をいっそうストリンジェントすることができることが一般に理解される。こうして、ハイブリダイゼーション条件は容易に操作することができる、こうして一般に所望の結果に依存して選択された方法であろう。

【0186】

本発明の他の態様によれば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド組成物が提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチドはタンパク質合成の有効な、ターゲットドインヒビターであること証明され、結局、疾患に寄与するタンパク質の

50

合成を阻害することによって疾患を治療することができる、療法的アプローチを提供する。タンパク質合成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効率は十分に確立されている。例えば、ポリガラクトウロナーゼおよびムスカリン2型アセチルコリンレセプターの合成は、それらのそれぞれのmRNA配列に対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドにより阻害される（米国特許第5,739,119号および米国特許第5,759,829号）。

【0187】

さらに、アンチセンス阻害の例は、核タンパク質サイクリン、同義薬剤耐性遺伝子（MDG1）、ICAM-1、E-セレクトイン、STK-1、線条体GABA_AレセプターおよびヒトEGFを使用して証明された（Jaskulski他、Science 1988 Jun 10；240（4858）：1544-6；VasanthakumarおよびAhmed、Cancer Commun. 1989；1（4）225-32；Peris他、Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15；57（2）：310-20；米国特許第5,801,154号；米国特許第5,789,573号；米国特許第5,718,709号および米国特許第5,610,288号）。また、種々の異常な細胞増殖、例えば、癌を阻害しかつ治療するために使用できるアンチセンス構築物が記載された（米国特許第5,747,470号；米国特許第5,591,317号および米国特許第5,783,683号）。

10

【0188】

したがって、ある態様において、本発明は、本明細書に記載するポリヌクレオチド配列に特異的に結合することができる任意の配列のすべて、または一部分、またはそれらの補体を含んでなるオリゴヌクレオチド配列を提供する。1つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはDNAまたはその誘導体を含んでなる。他の態様において、オリゴヌクレオチドはRNAまたはその誘導体を含んでなる。第3態様において、オリゴヌクレオチドはホスホリボチオエート化修飾バックボーンを含んでなる修飾DNAである。第4態様において、オリゴヌクレオチド配列はペプチド核酸またはその誘導体を含んでなる。

20

【0189】

各場合において、好ましい組成物は、本明細書に記載するポリヌクレオチドの1またはそれ以上の部分に対して相補的である、より好ましくは実質的相補的である、なおより好ましくは完全に相補的である配列領域を含んでなる。所定の遺伝子配列に対して特異的なアンチセンス組成物の選択は、選択したターゲット配列の分析および二次構造、T_m、結合エネルギー、および相対安定性に基づく。宿主細胞におけるターゲットmRNAに対する特異的結合を減少または阻害する二量体、ヘアピン、または他の二次構造を形成する相対不能性に基づいて、アンチセンス組成物を選択することができる。

30

【0190】

mRNAの高度に好ましいターゲット領域は、AUG翻訳開始コドンまたはその付近における領域、およびmRNAの5'領域に対して実質的に相補的である配列である。これらの二次構造の分析およびターゲット部位の選択の考察は、例えば、OLIGOプライマー分析のソフトウェアおよび/またはBLASTN2.0.5アルゴリズムソフトウェアのバージョン4（Altschul他、Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1；25（17）：3389-402）を使用して、実行することができる。

【0191】

また、MPG（27残基）と呼ぶ、短いペプチドベクターを使用してアンチセンスデリバリー法の使用が考えられる。MPGペプチドは、HIV gp41の融合配列に由来する疎水性ドメイン、およびSV40 T-抗原の核局在化配列からの親水性ドメインを含有する（Morris他、Nucleic Acids Res. 1997 Jul 15；25（14）：2730-6）。MPGペプチドのいくつかの分子はアンチセンスオリゴヌクレオチドを被覆し、そして比較的高い効率（90%）で1時間よりも短い時間で培養した哺乳動物細胞の中へ送達されることができる。さらに、MPGとの相互作用はヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの安定性および原形質膜を横切る能力の両方を強く増加させることが証明された。

40

【0192】

本発明の他の態様によれば、腫瘍細胞中の本発明の腫瘍ポリペプチドおよびタンパク質の発現を阻害するリボザイム分子の設計および調製において、本明細書に記載するポリヌクレオチド組成物を使用する。リボザイムは、部位特異的融合において核酸を切断するRN

50

A - タンパク質複合体である。リボザイムはエンドヌクレアーゼ活性を有する特異的触媒ドメインを有する (KimおよびCech、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987 Dec ; 84 (24) : 8788 - 92 ; ForsterおよびSymons、Cell 1987 Apr 24 ; 49 (2) : 211 - 20) 。

【 0 1 9 3 】

例えば、多数のリボザイムは、高度の特異性で、ホスホエステル転移反応を促進し、しばしばオリゴヌクレオチド基質中のいくつかのホスホエステルのただ1つを切断する (Cech他、Cell 1981 Dec;27(3 Pt 2):487 - 96 ; MichelおよびWesthof、J. Mol. Biol. 1990 Dec 5 ; 216 (3) : 585 - 610 ; Reinhold - HurekおよびShup、Nature 1992 May 14 ; 357 (63 74) : 173 - 6) 。この特異性は、化学反応前に、基質が特異的塩基対合相互作用を介してリボザイムの内部のガイド配列 (「 IGS 」) に結合するという要件に寄与する。

10

【 0 1 9 4 】

天然に存在する酵素RNAの6つの基本的変種が現在知られている。各々は生理学的条件下にトランスでRNAホスホジエステル結合の加水分解を触媒することができる (こうして他のRNA分子を切断することができる) 。一般に、酵素核酸は最初にターゲットRNAに結合することによって作用する。このような結合は酵素核酸のターゲット結合部分を通して起こり、ここで結合部分はターゲットRNAを切断する作用する分子の酵素部分に密接に近接して保持される。

【 0 1 9 5 】

こうして、酵素核酸はまず相補的塩基対合を通してターゲットRNAを認識し、それに結合し、いったん正しい部位に結合すると、ターゲットRNAを酵素的に切断する作用をする。このようなターゲットRNAの戦略的切断は、コード化タンパク質の合成を指令するその能力を破壊する。酵素核酸がそのRNAターゲットに結合し、それを切断した後、それはそのRNAから解放され、他のターゲットを探索し、反復的に新しいターゲットに結合し、それを切断することができる。

20

【 0 1 9 6 】

リボザイムの酵素的性質は多数の技術、例えば、アンチセンス技術 (ここで核酸分子は核酸ターゲットに単に結合し、その翻訳をブロックする) より有利である。なぜなら、療法的治療を行うために必要なリボザイムの濃度はアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度よりも低いからである。この利点は酵素的に作用するリボザイムの能力を反映する。こうして、単ーリボザイム分子はターゲットRNAの多数の分子を切断することができる。

30

【 0 1 9 7 】

さらに、リボザイムは高度に特異的なインヒビターであり、障害の特異性はターゲットRNAに結合する塩基対合メカニズムに依存するばかりでなく、かつまたターゲットRNAの切断のメカニズムに依存する。切断部位付近における、単ーミスマッチ、または塩基置換は、リボザイムの触媒活性を完全に排除することができる。アンチセンス分子における同様なミスマッチはそれらの作用を妨害しない (Woolf他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992 Aug 15 ; 89 (16) : 7305 - 9) 。こうして、リボザイムの作用の特異性は、同一RNA部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドのそれより大きい。

【 0 1 9 8 】

酵素核酸分子は、ハンマーヘッド、ヘアピン、肝炎 ウイルス、グラフィイントロンまたはRNアーゼP RNA (RNAガイド配列とアソシエートした) またはニューロスボラ (Neurospora) VS RNAのモチーフで形成することができる。ハンマーヘッドのモチーフの例は、Rossi他、Nucleic Acids Res. 1992 Sep 11 ; 20 (17) : 4559 - 65により記載された。ヘアピンのモチーフの例は下記の文献に記載された : Hample他の欧州特許出願公開No. EP 0360 257、HampleおよびTritz、Biochemistry 1989 Jun 13 ; 28 (12) : 4929 - 33 ; Hample他、Nucleic Acids Res. 1990 Jan 25 ; 18 (2) : 299 - 304および米国特許第5,631,359号。

40

【 0 1 9 9 】

肝炎 ウイルスのモチーフの例は、PerrottaおよびBeen、Biochemistry 1992 Dec 1 ; 31 (47) : 11843 - 52に記載された ; RNアーゼPのモチーフの例はGuerrier - Takada他、Cell 1983 Dec ; 35 (3 Pt 2) : 849 - 57に記載された ; ニューロスボラ (Neurospora) VS R

50

NAのモチーフは下記の文献に記載された：SavilleおよびCollins、Cell 1990 May 18；61（4）：685 - 96；SavilleおよびCollins、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991 Oct 1；88（19）：8826 - 30；CollinsおよびOlive、Biochemistry 1993 Mar 23；32（11）：2795 - 9；そしてグループIイントロンの例は米国特許第4,987,071号に記載された。

【0200】

本発明の酵素核酸分子において重要であるすべては、それがターゲット遺伝子のRNA領域の1またはそれ以上に対して相補的である特異的基質結合部位を有すること、およびそれが分子にRNA切断活性を付与する基質結合部位内またはそれを取り囲むヌクレオチド配列を有することである。こうして、リボザイム構築物は本明細書に記載する特定のモチーフに限定する必要はない。

10

【0201】

リボザイムは、国際特許出願公開No. WO 93 / 23569および国際特許出願公開No. WO 94 / 02595（各々は特別に引用することによって本明細書の一部とされる）に記載されているように設計し、そして合成して、記載するように、in vitroおよびin vivoにおいて試験することができる。また、このようなリボザイムはデリバリーのために最適化することができる。特定の例が提供されるが、当業者は認識するように、他の種における同等のRNAターゲットを必要に応じて利用することができる。

【0202】

リボザイム結合性アームの長さを変更するか、あるいは血清リボヌクレアーゼによるリボザイムの分解を防止する修飾（下記の文献を参照のこと：国際特許出願公開No. WO 92 / 07065；国際特許出願公開No. WO 93 / 15187；国際特許出願公開No. WO 91 / 03162；欧州特許出願公開No. 92110298；米国特許第5,334,711号；および国際特許出願公開No. WO 94 / 13688、これらには酵素RNA分子の糖部分に行うことができる種々の化学的修飾が記載されている）、および細胞におけるリボザイムの効能を増強する修飾を有し、かつ幹II塩基が除去されてRNA合成時間が短縮されかつかつ化学的要件が減少されたりリボザイムを化学的に合成することによって、リボザイム活性を最適化することができる。

20

【0203】

Sullivan他（国際特許出願公開No. WO 94 / 02595）は、酵素RNA分子の一般的デリバリー法を記載している。リボザイムはこの分野において知られている種々の方法により細胞に投与することができるが、このような方法は下記のものを含むが、これらに限定されない：リボソーム中の包膜、イオントホレシス、または他のベヒクル、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生物分解性ナノカプセル、および生物接着性微小球の中への組込み。いくつかの適用のために、リボザイムは前述のベヒクルを使用するか、または使用しないで細胞または組織にex vivoで直接送達することができる。

30

【0204】

選択的に、RNA / ベヒクルの組み合わせは直接的吸入、直接的注射またはカテーテル、注入ポンプまたはステントの使用により局所的に送達することができる。他の送達経路は下記のものを含むが、これらに限定されない：血管内、筋肉内、皮下または関節注射、エアゾル吸入、経口（錠剤または丸剤の形態）、局所的、全身的、眼、腹腔内および / またはくも膜下デリバリー。リボザイムのデリバリーおよび投与のいっそう詳述な説明は、国際特許出願公開No. WO 94 / 02595および国際特許出願公開No. WO 93 / 23569（各々は特別に引用することによって本明細書の一部とされる）に記載されている。

40

【0205】

細胞内に高い濃度の1またはそれ以上のリボザイムを蓄積する他の手段は、リボザイムをコードする配列をDNA発現ベクターの中に組込むことである。リボザイム配列の転写は、真核RNAポリメラーゼI（pol I）、RNAポリメラーゼII（pol II）、またはRNAポリメラーゼIII（pol III）のためのプロモーターから推進される。pol IIまたはpol IIIプロモーターからの転写物はすべての細胞において高いレベルで発現されるであろう；所定の細胞型における所定のpol IIプロモーターのレベルは、付近に存在する遺伝子調節配列（エンハンサー、サイレンサー、およびその他）の特質に依存するであろう。

50

【0206】

また、原核RNAポリメラーゼプロモーターを使用することができるが、ただし原核RNAポリメラーゼ酵素は適当な細胞において発現される。このようなプロモーターから発現されたりボザイムは、哺乳動物細胞において機能することが示された。このような転写単位は哺乳動物細胞の中への導入のための種々のベクターの中に組み込むことができ、このようなベクターは下記のを包含するが、これらに限定されない：プラスミドDNAベクター、ウイルスDNAベクター（例えば、アデノウイルスまたはアデノ関連ウイルスのベクター）、またはウイルスRNAベクター（例えば、レトロウイルス、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルスのベクター）。

【0207】

本発明の他の態様において、ペプチド核酸（PNA）組成物が提供される。PNAはヌクレオ塩基がプソイドペプチドバックボーンに結合されているDNA模擬物である（GoodおよびNielsen、*Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997 7（4）431 - 37）。PNAは伝統的にRNAまたはDNA配列が使用されてきている多数の方法において利用することができる。しばしばPNA配列は対応するRNAまたはDNAよりも技術においてよりよく実行し、RNAまたはDNAに対して固有でない実用性を有する。

【0208】

調製方法、特性、および使用法を包含するPNAの概観は、Corey、*Trends in Biotechnol* 1997 Jun ; 15（6）：224 - 9に記載されている。それ自体、ある態様において、ACE mRNA配列の1またはそれ以上の部分に対して相補的であるPNA配列を調製し、このようなPNA組成物を使用して、ACE特異的mRNAの翻訳を調節し、変更し、減少し、または軽減し、これによりこのようなPNA組成物が投与された宿主細胞におけるACE活性レベルを変更することができる。

【0209】

PNAはDNAの正常のホスホジエステルバックボーンを置換する2 - アミノエチル - グリシン連鎖を有する（Nielsen他、*Science* 1991 Dec 6 ; 254（5037）：1497 - 500 ; Hanvey他、*Science* 1992 Nov 27 ; 258（5087）：1481 - 5 ; HyrupおよびNielsen、*Bioorg Med Chem* . 1996 Jan ; 4（1）：5 - 23）。この化学は3つの重要な結果を有する：第1に、DNAまたはホスホロチオエートオリゴヌクレオチドと対照的に、PNAは中性分子である；第2に、PNAはアキラルであり、立体選択的合成を開発する必要性を回避する；そして、第3に、PNA合成は固相ペプチド合成のために標準BocまたはFmocプロトコルを使用するが、修飾された Merrifield法を包含する他の方法が使用されてきている。

【0210】

PNAモノマーまたはレディーメイドオリゴマーは、パーセプティブ・バイオシステム（PerSeptive Biosystems、マサチューセッツ州ファーマンガム）から商業的に入手可能である。BocまたはFmocプロトコルによるPNA合成は、マニュアルまたは自動化プロトコルを使用して簡単である（Norton他、*Bioorg Med Chem.* 1995 Apr ; 3（4）：437 - 45）。マニュアルプロトコルは、化学的に修飾されたPNAの産生または密接に関係するPNAファミリーの同時合成を使用する。

【0211】

ペプチド合成におけるように、特定のPNA合成の成功は選択した配列の性質に依存するであろう。例えば、理論的にはPNAはヌクレオチド塩基の任意の組み合わせを組み込むことができるが、隣接プリンの存在は産物における1またはそれ以上の欠失に導くことができる。この困難を期待して、隣接プリンを有するPNAの産生において、非効率的に付加されると推測される残基のカップリングを反復すべきであることが示唆される。次いで、RNAを逆相高圧液体クロマトグラフィーにより精製して、産物の収率および純度をペプチド合成間に観測されたものに類似させる。

【0212】

所定の適用のためのPNAの修飾は、固相合成間のアミノ酸のカップリングまたはカルボン酸基を含有する化合物の暴露されたN末端アミンへの結合により、達成することができ

10

20

30

40

50

る。選択的に、PNAは合成後に導入されたリシンまたはシステインへのカップリングにより修飾することができる。PNAを修飾できる容易さは、よりすぐれた溶解度または特定の機能の要件のための最適化を促進する。いったん合成されると、PNAの同一性およびそれらの誘導体は質量分析により確認することができる。

【0213】

いくつかの研究が実行され、これらの研究においてPNAの修飾が利用されてきている（例えば、Norton他、*Bioorg Med Chem.* 1995 Apr ; 3 (4) : 437 - 45 ; Petersen他、*J. Pept. Sci.* 1995 May - Jun ; 1 (3) : 175 - 83 ; Orum他、*Biotechniques* 1995 Sep ; 19 (3) : 472 - 80 ; Footer他、*Biochemistry* 1996 Aug 20 ; 35 (33) : 10673 - 9 ; Griffith他、*Nucleic Acids Res.* 1995 Aug 11 ; 23 (15) : 3003 - 8 ; Pardridge他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 Jun 6 ; 92 (12) : 5592 - 6 ; Boffa他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 Mar 14 ; 92 (6) : 1901 - 5 ; Gambacorti - Passerini他、*Blood* 1996 Aug 15 ; 88 (4) : 1411 - 7 ; Armitage他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 197 Nov 11 ; 94 (23) : 12320 - 5 ; Seeger他、*Biotechniques* 1997 Sep ; 23 (3) : 512 - 7)。米国特許第5,700,922号において、キメラ分子および診断、生物におけるタンパク質の修飾、および治療剤に対して感受性な症状の治療におけるそれらの使用が論じられている。

10

【0214】

PNAのアンチセンス結合性を特性決定する方法は、Rose、*Anal. Chem.* 1993 Dec 15 ; 65 (24) : 3545 - 9、およびJensen他、*Biochemistry* 1997 Apr 22 ; 36 (16) : 5072 - 7において論じられている。Roseは、毛管ゲル電気泳動を使用して、RNAのそれらの相補的オリゴヌクレオチドに対する結合を決定し、相対的結合の反応速度および化学量を測定している。同様な型の測定は、Jensen他によりBIAcore™を使用して実施された。

20

記載されかつ当業者にとって明らかなPNAの他の用途は下記の用途を包含する：DNA鎖の侵入、アンチセンス阻害、突然変異の分析、転写のエンハンサー、核酸の精製、転写活性遺伝子の単離、転写因子結合のブロッキング、ゲノム切断、バイオセンサー、in situハイブリダイゼーション、およびその他。

【0215】

ポリヌクレオチドの同定、特性決定および発現

本発明のポリヌクレオチド組成物は、種々の十分に確立された技術により同定し、調製し、および/または操作することができる（下記の文献を参照のこと：Sambrook他、*Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989、および他の同様な参考文献）。例えば、ポリヌクレオチドは、いっそう詳述に後述するように、cDNAのマイクロアレイを腫瘍関連発現についてスクリーニングすることによって、同定することができる（すなわち、本明細書において提供される代表的アッセイを使用して測定して、正常組織におけるよりも腫瘍において少なくとも2倍大きい発現）。

30

【0216】

このようなスクリーニングは、例えば、アフィメトリックス・インコーポレーテッド（Affymetrix, Inc.、カリフォルニア州サンタクララ）のマイクロアレイ技術を製造業者の使用説明書に従い使用して（かつ本質的に下記の文献に記載されているように、Schna他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 10614 - 10619、1996およびHeller他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 2150 - 2155、1997）実行することができる。選択的に、ポリヌクレオチドは本明細書に記載するタンパク質を発現する細胞、例えば、腫瘍細胞から調製したcDNAから増幅することができる。

40

【0217】

試料の中に存在する問題のターゲット配列を増幅するために、多数の鋳型依存的プロセスが入手可能である。最もよく知られている増幅方法の1つは、米国特許第4,683,195号、米国特許第4,683,202号および米国特許第4,800,159号（それらの各々はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる）に詳細に記載されているポリメラーゼ連鎖反応（PCR™）である。簡単に述べると、PCR™において、ターゲット配列の反対の相補

50

的鎖上の領域に対して相補的である2つのプライマー配列を調製する。

【0218】

過剰のデオキシヌクレオチド三リン酸を、DNAポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）と一緒に、反応混合物に添加する。ターゲット配列が試料の中に存在する場合、プライマーはターゲットに結合し、ポリメラーゼはヌクレオチド上への付加によりターゲット配列に沿ってプライマーを伸長させる。反応混合物の上昇および低下により、伸長されたプライマーはターゲットから解離して反応生成物を形成し、過剰のプライマーはターゲットおよび反応生成物に結合し、このプロセスを反復する。好ましくは、逆転写およびPCRTM増幅手順を実行して、増幅されたmRNAを定量する。ポリメラーゼ連鎖反応法はこの分野においてよく知られている。

10

【0219】

多数の他の鋳型依存的プロセスの多くはPCRTM増幅技術の変法であり、この分野において既知でありかつ容易に入手可能である。例示的に、いくつかのこのような方法は下記のものを含む：リガーゼ連鎖反応（LCRと呼ばれる）、例えば、欧州特許出願公開No. 320,308および米国特許第4,883,750号に記載されている；Qベータレプリカーゼ、PCT国際特許出願公開No. PCT/US87/00880に記載されている；鎖置換増幅（SDA）および修復連鎖反応（RCR）。なお他の増幅法は英国特許出願第2,202,328号およびPCT国際特許出願公開No. PCT/US89/01025に記載されている。

【0220】

他の核酸増幅手順は、転写に基づく増幅系（TAS）（PCT国際特許出願公開No. WO 88/10315）、例えば、核酸配列に基づく増幅（NASBA）および38Rを含む。欧州特許出願公開No. 329,822には、一本鎖RNA（「ssRNA」）、ssDNA、および二本鎖DNA（dsDNA）のサイクル的合成を含む、核酸増幅法が記載されている。PCT国際特許出願公開No. WO 89/06700には、ターゲット一本鎖DNA（「ssDNA」）に対するプロモーター/プライマー配列のハイブリダイゼーションに基づく核酸配列の増幅スキーム、および引き続く配列の多数のRNAコピーの転写が記載されている。他の増幅法、例えば、「RACE」（Frohman、1990）および「ワンサイデッドPCR」（Ohara、1989）は当業者によく知られている。

20

【0221】

本発明のポリヌクレオチドの増幅された部分を使用して、よく知られている技術に従い適当なライブラリー（例えば、腫瘍cDNAライブラリー）から全長遺伝子を単離することができる。このような技術において、増幅に適当な1またはそれ以上のポリヌクレオチドのプロープまたはプライマーを使用して、ライブラリー（cDNAまたはゲノム）をスクリーニングする。好ましくは、より大きい分子を含むように、ライブラリーをサイズで選択する。また、ランダムプライムライブラリーは遺伝子の5'および上流領域を同定するために好ましいことがある。ゲノムライブラリーはイントロンを獲得し、5'配列を伸長するために好ましい。

30

【0222】

ハイブリダイゼーション技術のために、よく知られている技術を使用して部分的配列を標識化することができる（例えば、ニックトランスレーションまたは³²Pを使用する末端標識化により）。次いで、変性された細菌コロニーを含有するフィルター（またはファージブランクを含有する菌叢）を標識化プロープとハイブリダイゼーションさせることによって、細菌またはバクテリオファージを一般にスクリーニングする（下記の文献を参照のこと：Sambrook他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989）。ハイブリダイゼーションするクローニングまたはブランクを選択し、拡張し、DNAをそれ以上の分析のために単離する。

40

【0223】

例えば、部分的配列からのプライマーおよびベクターからのプライマーを使用するPCRにより、cDNAクローンを分析して追加の配列を定量することができる。制限地図および部分的配列を発生させて、1またはそれ以上のオーバーラップするクローンを同定することができる。次いで、標準技術を使用して完全な配列を決定することができ、このような技

50

術は1系列の欠失クローンの発生を包含する。次いで、生ずるオーバーラップする配列を単一の隣接配列に組立てることができる。よく知られている技術に従い、適当なフラグメントを結合することによって、全長のcDNA分子を発生させることができる。

【0224】

選択的に、部分的cDNA配列から全長のコーディング配列を得るために、増幅技術、例えば、前述の技術は有効であることがある。1つのこのような増幅技術は逆PCRであり (Triglia他、Nucleic Acids Res. 16: 8186、1998参照)、これは遺伝子の既知領域においてフラグメントを発生させるために制限酵素を使用する。次いで分子内結合によりフラグメントを環化し、既知領域に由来する分岐プライマーを使用するPCRのための鋳型として使用する。選択的アプローチにおいて、リンカー配列に対するプライマーおよび既知領域に対して特異的なプライマーを使用する増幅により、部分的配列に隣接する配列を取出すことができる。典型的には、同一リンカープライマーおよび既知領域に対して特異的な第2プライマーを使用して増幅の第2ラウンドに、増幅された配列を付す。

10

【0225】

この手順に対する変法は、既知配列から反対方向のエクステンションを開始する2つのプライマーを使用し、WO 96/38591に記載されている。他のこのような技術は、「cDNA末端の急速増幅」またはRACEとして知られている。この技術は既知配列の5'および3'に存在する配列を同定するために内部のプライマーおよび外部のプライマーの使用を包含し、これらのプライマーはポリA領域またはベクター配列に対してハイブリダイゼーションする。追加の技術は捕捉PCR (Lagerstrom他、PCR Methods Applic. 1: 1119 - 19、1991) およびウォーキングPCR (Parker他、Nucl. Acids Res. 19: 3055 - 60、1991) を包含する。また、増幅を用いる他の方法を使用して全長のcDNA配列を得ることができる。

20

【0226】

ある場合において、発現された配列タグ (EST) データベース、例えば、遺伝子バンク (GenBank) から入手可能である配列の中に提供された配列の分析により、全長のcDNA配列を得ることが可能である。一般に、オーバーラップするESTについての検索はよく知られているプログラム (例えば、NCBI BLAST検索) に従い実行することができ、そしてこのようなESTを使用して隣接する全長の配列を発生させることができる。また、全長のDNA配列はゲノムフラグメントの分析により得ることができる。

30

【0227】

本発明の他の態様において、本発明のポリヌクレオチド、またはその融合タンパク質または機能的同等物をコードするポリヌクレオチド配列またはそれらのフラグメントを組換えDNA分子において使用して、適当な宿主細胞中のポリペプチドの発現を指令することができる。遺伝暗号の固有のデジェネラシーのために、実質的に同一または機能的同等のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を産生し、これらの配列を使用して所定のポリペプチドのクローニングし、発現させることができる。

【0228】

当業者は理解するように、ある場合において、天然に存在しないコドンをもつポリペプチドエンコーディングヌクレオチド配列を産生することが好都合であることがある。例えば、特定の原核または真核宿主が好むコドンを選択して、タンパク質の発現速度を増加させるか、あるいは所望の性質、例えば、天然に存在する配列から発生した転写物のそれより長い半減期をもつ組換えRNA転写物を産生することができる。

40

【0229】

その上、本発明のポリヌクレオチド配列は一般にこの分野において知られている方法を使用して操作して、種々の反応のためのポリペプチドエンコーディング配列を変更することができ、このような変更は遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を修飾する変更を包含するが、これらに限定されない。例えば、ランダムフラグメント化によるDNAシャフリングおよび遺伝子フラグメントのPCR組立ておよび合成オリゴヌクレオチドを使用して、ヌクレオチド配列を操作することができる。さらに、部位特異的突然変異誘発を使用して新しい制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変更し、コドン

50

優先を変化させ、スプライス変異型を産生し、または突然変異を導入し、およびその他をすることができる。

【0230】

本発明の他の態様において、天然の、修飾された、または組換えの核酸配列を異種配列に結合して、融合タンパク質をコードするようにすることができる。例えば、ポリペプチド活性のインヒビターについてペプチドライブラリーをスクリーニングするために、商業的に入手可能な抗体が認識することができるキメラタンパク質をコードすることは有効であることがある。また、ポリペプチドをコードする配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含有するように、融合タンパク質を操作し、こうして異種部分から離れた位置において、ポリペプチドを切断し、精製することができる。

10

【0231】

この分野においてよく知られている化学的方法を使用して、所望のポリペプチドをコードする配列を全体的にまたは部分的に合成することができる（下記の文献を参照のこと：Caruthers、M.H.他（1980）Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215 - 223；Horn他（1980）Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225 - 232）。選択的に、ポリペプチドのアミノ酸配列、またはそのを合成する化学的方法を使用して、タンパク質それ自体を製造することができる。例えば、種々の固相技術（Roberge、J.T.他（1995）Science 269：202 - 204）を使用してペプチド合成を実行することができ、そして例えば、ABI 431Aペプチド合成装置（Perkin Elmer、カリフォルニア州パロアルト）を使用して、自動化合成を達成することができる。

20

【0232】

新しく合成されたペプチドは、調製用高性能液体クロマトグラフィー（例えば、Creighton、T.（1983）Proteins, Structures and Molecular Principles、WH Freeman and Co.、New York、N. Y.）またはこの分野において入手可能な他の匹敵する技術により、実質的精製することができる。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定（例えば、エドマン分解法）により確認することができる。さらに、ポリペプチドのアミノ酸配列、またはその任意の部分直接的合成間に変更し、および/または化学的方法に従い他のタンパク質からの配列、またはその任意の部分と組合わせて、変異型ポリペプチドを産生することができる。

【0233】

所望のポリペプチドを発現させるために、ポリペプチド、または機能的同等物をコードするヌクレオチド配列を適当な発現ベクター、例えば、挿入されたコーディング配列の転写および翻訳のために必要な因子を含有するベクターの中に挿入することができる。この分野においてよく知られている方法を使用して、問題のポリペプチドをコードする配列および適当な転写および翻訳の制御因子を含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝的組換えを包含する。このような技術は、例えば、下記の文献に記載されている：Sambrook、J.他（1989）Molecular Cloning：A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、Plainview、N. Y.、およびAusubel、F.M.他（1989）Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、N. Y.。

30

40

【0234】

ポリヌクレオチド配列を含有させかつ発現させるために、種々の発現ベクター/宿主系を利用することができる。これらの下記のものを含むが、これらに限定されない：微生物、例えば、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染された昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）または細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）で形質転換された植物細胞；または動物細胞系。

【0235】

50

発現ベクターの中に存在する「制御因子」または「調節配列」は、ベクターの非翻訳領域 - エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域 - これらは宿主細胞タンパク質と相互作用して転写および翻訳を行う - である。このような因子は、それらの強度および特異的を変化させることができる。利用するベクター系および宿主に依存して、任意の数の転写および翻訳の因子（構成的および誘導可能なプロモーターを包含する）を使用することができる。例えば、細菌系においてクローニングするとき、誘導可能なプロモーター、例えば、PBLUESCRIPTファージミド（Stratagene、カリフォルニア州ラジョラ）のハイブリッドlacZプロモーターまたはPSPORT1プラスミド（Gibco BRL、マリランド州ガイサーバーグ）およびその他を使用することができる。

【0236】

哺乳動物細胞系において、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルスからのプロモーターは一般に好ましい。ポリペプチドをコードする配列の多数のコピーを含有する細胞系統を発生させることが必要である場合、SV40またはEBVに基づくベクターを適当な選択可能なマーカーとともに好都合に使用することができる。

【0237】

細菌系において、発現されたポリペプチドに意図する使用に依存して、任意の数の発現ベクターを選択することができる。例えば、大量を必要とするとき、例えば、抗体を誘導するために、精製が容易である融合タンパク質の高いレベルの発現を指令するベクターを使用することができる。このようなベクターは下記のものを含めるが、これらに限定されない：多機能大腸菌（*E. coli*）クローニングおよび発現ベクター、例えば、BLUESCRIPT（Stratagene）、ここで問題のポリペプチドをコードする配列をベクターの中に - ガラクトシダーゼのアミノ末端のMetおよび引き続く7残基の配列とインフレームで結合してハイブリッドタンパク質を産生することができる；pINベクター（Van Heeke, G.およびS. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 5503 - 5509)；およびその他。

【0238】

また、pGEXベクター（Promega、ウイスコンシン州マディソン）を使用して、外来ポリペプチドをグルタチオン - S - トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現させることができる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン - アガロースビーズへの吸着により溶解細胞から精製し、次いで遊離グルタチオンの存在下に溶解することができる。このような系において作られたタンパク質は、ヘパリン、トロンピン、または因子XAプロテアーゼ切断部位を含むように設計して、問題のクローニングされたポリペプチドをGST部分から任意に解放させることができる。

【0239】

酵母、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）において、構成的または誘導可能なプロモーター、例えば、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHを含有する多数のベクターを使用することができる。概観については、下記の文献を参照のこと：Ausubel他（前掲）およびGrant他（1987）*Methods Enzymol.* 153: 516 - 544。

【0240】

植物発現ベクターを使用する場合、ポリペプチドをコードする配列の発現は多数のプロモーターにより推進可能である。例えば、ウイルスプロモーター、例えば、CaMVの35Sおよび19Sプロモーターを単独で、またはTMVからのオメガリーダー配列と組合せてを使用することができる（Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6: 307 - 311）。選択的に、植物プロモーター、例えば、RUBISCOの小さいサブユニットまたは熱ショックプロモーターを使用することができる（Coruzzi, G.他（1984）*EMBO J.* 3: 1671 - 1680；Borglie, R.他（1984）*Science* 224: 838 - 843；およびWinter, J.他（1991）*Results Probl. Cell Differ.* 17: 85 - 105）。これらの構築物は、直接的DNA形質転換または病原体仲介トランスフェクションにより、植物細胞の中に導入することができる。

【0241】

このような技術は一般的に入手可能な概観の中に記載されている（例えば、下記

10

20

30

40

50

の文献を参照のこと：Hobbs、S.またはMurry、L.E.、McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill、New York、N. Y. ; pp. 191 - 196)。

また、昆虫系を使用して問題のポリペプチドを発現させることができる。例えば、1つのこのような系において、オートグラフィア・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) をベクターとして使用して、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞またはトリコプルシア・ラーバエ (*Trichoplusia larvae*) における外来遺伝子を発現させる。

【0242】

ポリペプチドをコードする配列をウイルスの非必須領域、例えば、ポリヘドリン遺伝子の中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの条件下に配置することができる。ポリペプチドエンコーディング配列の首尾よい挿入はポリヘドリン遺伝子を不活性化し、コートタンパク質を欠如する組換えウイルスを産生する。次いで、例えば、問題のポリペプチドを発現することができるスポドプテラ・フルギペルダ (*S. frugiperda*) 細胞またはトリコプルシア・ラーバエ (*Trichoplusia larvae*) を感染するために、組換えウイルスを使用することができる (Engelhard, E.K.他 (1994) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 91: 3224 - 3227)。

10

【0243】

哺乳動物宿主細胞において、一般に多数のウイルスに基づく系が入手可能である。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合において、後期プロモーターおよび三部分リーダー配列から成るアデノウイルス転写/翻訳複合体の中に、問題のポリペプチドをコードする配列を結合することができる。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域中の挿入を使用して、感染した宿主細胞においてポリペプチドを発現することができる生存可能なウイルスを得ることができる (Logan、J.およびShenk、T. (1984) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 81: 3655 - 3659)。さらに、転写エンハンサー、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーを使用して、哺乳動物宿主細胞における発現を増加させることができる。

20

【0244】

また、特異的開始シグナルを使用して、問題のポリペプチドをコードする配列のいっそう効率よい翻訳を達成することができる。このようなシグナルはATG開始コドンおよび隣接する配列を含む。ポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクターの中に挿入する場合、追加の転写または翻訳シグナルは不必要であることがある。

30

【0245】

しかしながら、コーディング配列のみ、またはその一部分を挿入する場合、ATG開始コドンを含む外因的翻訳制御シグナルを準備すべきである。さらに、開始コドンはインサート全体の翻訳を保証するために正しいリーディングフレームであるべきである。外因的翻訳因子および開始コドンは、天然および合成の種々の由来であることができる。使用する特定の細胞系に適当であるエンハンサー、例えば、文献に記載されているものを含めることによって、発現効率を増強することができる (Scharf、D.他 (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 125 - 162)。

【0246】

さらに、挿入された配列の発現をモジュレートするか、あるいは所望の方式で発現されたタンパク質をプロセッシングする能力について、宿主株を選択することができる。このようなポリペプチドの修飾は、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化を包含するが、これらに限定されない。また、タンパク質の「プレプロ」形態を切断する翻訳後のプロセッシングを使用して、正しい挿入、フォールディングおよび/または機能を促進することができる。このような後 - 翻訳活性のために特異的な細胞機構および特徴的なメカニズムを有する、異なる宿主細胞、例えば、CHO、COS、HeLa、MDCK、HEK293、およびW138を選択して、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを保証することができる。

40

【0247】

50

組換えタンパク質の長期間の、高い収率の産生のために、安定な発現が一般に好ましい。例えば、発現ベクターを使用して問題のポリヌクレオチドを安定に発現する細胞系統を形質転換することができ、ここで発現ベクターはウイルスの複製起点および/または内因性発現因子、および同一または別のベクター上の選択可能なマーカー遺伝子を含むことができる。ベクターの導入後、細胞を濃縮培地中で1~2日間増殖させた後、培地を選択培地に交換することができる。選択可能なマーカーの目的は選択に対する耐性を与えることであり、その存在は導入された配列を首尾よく発現する細胞の増殖および回収を可能とする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンを細胞型に対して適当な組織培養技術により増殖させることができる。

【0248】

任意の数の選択系を使用して、形質転換された細胞系統を回収することができる。これらは下記のを包含するが、これらに限定されない：単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子 (Wigler 他 (1997) Cell 11: 223 - 32) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (Lowy, I. 他 (1990) Cell 22: 817 - 23) (これらはそれぞれ tk .sup. - または aprt .sup. - 細胞において使用することができる)。

【0249】

また、抗代謝物質、抗生物質または除草剤耐性を選択基準として使用することができる；例えば、dhfr、これはメトトレキセートに対する耐性を与える (Wigler, M. 他 (1980) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 77: 3567 - 70)；npt、これはアミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を与える (Colbere - Garapin, F. 他 (1981) J. Mol. Biol. 150: 1 - 140)；およびalsまたはpat、これはそれぞれクロルスルフロンおよびホスフィンオトリシニアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を与える (Murry, 前掲)。

【0250】

追加の選択可能な遺伝子が記載されてきている、例えば、trpB、これはトリプトファンの代わりにインドールを細胞が利用できるようにする、またはhisD、これはヒスチジンの代わりにヒスチノールを細胞が利用できるようにする (Hartman, S.C. および R.C. Mulligan (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 85: 804 - 51)。可視マーカーの使用は、アントシアニン、ベータ-グルクロニダーゼおよびその基質GUS、およびルシフェラーゼおよびその基質ルシフェリンのようなマーカーとともに普及されるようになり、形質転換体を同定するばかりでなく、かつまた特異的ベクター系に帰する一時的または安定なタンパク質の発言を定量するために広く使用されている (Rhodes, C.A. 他 (1995) Methods Mol. Biol. 55: 121 - 131)。

【0251】

マーカー遺伝子の存在/非存在は問題の遺伝子がまた存在することを示唆するが、その存在および発現を確認することが必要である。例えば、ポリペプチドをコードする配列がマーカー遺伝子配列内に挿入される場合、配列を含む組換え細胞はマーカー遺伝子の機能の非存在により同定することができる。選択的に、ポリペプチドをコードする配列と縦列でマーカー遺伝子を単一プロモーターの制御下に配置することができる。通常、誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は縦列遺伝子の発現をその上示す。

【0252】

選択的に、所望のポリヌクレオチド配列を含むかつそれを発現する宿主細胞は、この分野において知られている種々の手順により同定することができる。これらの手順は下記のを包含するが、これらに限定されない：DNA-DNAまたはDNA-RNAのハイブリダイゼーションおよびタンパク質のバイオアッセイまたはイムノアッセイ技術、これらは、例えば、核酸またはタンパク質を検出しおよび/または定量する、膜、溶液、またはチップに基づく技術を包含する。

【0253】

生産物に対して特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用する、ポリヌクレオチドコード化生産物の発現を検出しかつ測定する、種々のプロトコルはこの分野において知られている。例は酵素結合イムノアッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (R

10

20

30

40

50

IA)、および蛍光活性化免疫吸着アッセイ (FACS) を包含する。所定のポリペプチド上の2つの非妨害性エピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を利用する、2部位のモノクローナルに基づくイムノアッセイはいくつかの用途について好ましいことがあるが、競合結合アッセイを使用することもできる。これらおよび他のアッセイは、なかでも、下記の文献に記載されている: Hampton, R. 他 (1990) *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, ミネソタ州セントポール、および Maddox, D.E. 他 (1983) *J. Exp. Med.* 158: 1211 - 1216。

【0254】

広範な種類の標識および結合技術はこの分野において知られており、そして種々の核酸およびアミノ酸のアッセイにおいて使用することができる。ポリヌクレオチドに係る配列を検出する標識化ハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプローブは、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化または標識化ヌクレオチドを使用するPCR増幅を包含する。選択的に、配列、またはその任意の部分をもRNAプローブの産生のためのベクターの中にクローニングすることができる。

【0255】

このようなベクターはこの分野において知られており、商業的に入手可能であり、そして適当なRNAポリメラーゼ、例えば、T7、T3、またはSP6および標識化ヌクレオチドの添加により *in vitro* でRNAプローブを合成するために使用することができる。これらの手順は種々の商業的に入手可能なキットを使用して実施することができる。使用できる適当なリポーター分子または標識は、ラジオヌクレオチド、酵素、蛍光、化学発光、または色素形成因子、ならびに基質、コファクター、インヒビター、磁気粒子、およびその他を包含する。

【0256】

細胞培養物からのタンパク質の発現および回収に適当な条件下に、問題のポリヌクレオチド配列で形質転換した宿主細胞を培養することができる。組換え細胞が産生するタンパク質は、使用する配列および/またはベクターに依存して分泌されるか、あるいは細胞内に含有されることができる。当業者は理解するように、原核または真核細胞膜を通すコード化ペプチドの分泌を指令するシグナル配列を含有するように、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを設計することができる。他の組換え構築物を使用して、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチドに、問題のポリペプチドをコードする配列を結合することができる。

【0257】

このような精製促進ドメインは下記のものを含むが、これらに限定されない: 金属キレート化ペプチド、例えば、固定化金属上の精製を可能とするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上の精製を可能とするプロテインAドメイン、およびFLAGエクステンション/アフィニティー精製系において使用するドメイン (Immunex Corp., ワシントン州シアトル)。精製促進するために、精製ドメインとコード化ポリペプチドとの間に切断可能なリンカー配列、例えば、因子XAまたはエンテロキナーゼ (*In vitro* gen、カリフォルニア州サンディエゴ) に含めることができる。

【0258】

1つのこのような発現ベクターは、問題のポリペプチドと、チオレドキシニンまたはエンテロキナーゼ切断部位に先行する6ヒスチジン残基をコードする核酸とを含有する融合タンパク質を発現させる。ヒスチジン残基はPorath, J. 他 (1992) *Prot. Exp. Purif.* 3: 263 - 281に記載されているようにIMIAC (固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー) 上の精製を促進するが、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質から所望のポリペプチドを精製する手段を提供する。融合タンパク質を含有するベクターは、Kroll, D. J. 他 (1993)、*DNA Cell Biol.* 12: 441 - 453に記載されている。

【0259】

組換え産生方法に加えて、本発明のポリペプチド、およびそのフラグメントは固相技術を使用して直接的ペプチド合成により製造することができる (Merrifield J. (1963) *J.*

10

20

30

40

50

Am. Chem. Soc. 85 : 2149 - 2154)。タンパク質合成はマニュアル技術または自動化により実行することができる。自動化合成は、例えば、アプライド・バイオシステムス (Applied Biosystems) 431Aペプチド合成装置 (Perkin Elmer) を使用して達成することができる。選択的に、種々のフラグメントを別々に化学的に合成し、化学的方法を使用して組合わせて全長の分子を産生することができる。

【0260】

抗体組成物、そのフラグメントおよび他の結合因子

他の面によれば、本発明は、さらに、本明細書に開示する腫瘍ポリペプチド、またはその一部分、変異型または誘導体に対して免疫学的結合性を示す、結合因子、例えば、抗体およびその抗原結合性フラグメントを提供する。抗体およびその抗原結合性フラグメントは、それが本発明のポリペプチドと検出可能なレベルで反応し (例えば、ELISAアッセイにおいて)、同様な条件下に無関係のポリペプチドと検出可能に反応しない場合、本発明のポリペプチドに「特異的に結合する」、「免疫学的に結合する」、および/またはそれと「免疫学的に反応性」であると言われる。

10

【0261】

免疫学的に結合性は、本明細書において使用するとき、一般に免疫グロブリン分子と、免疫グロブリンがそれに対して特異的である抗原との間で起こる型の非共有結合の相互作用を意味する。免疫学的結合性相互作用は相互作用の解離定数 (K_d) で表すことができ、ここでより小さい K_d はより大きいアフィニティーを表す。選択したポリペプチドの免疫学的結合性は、この分野においてよく知られている方法により定量することができる。

20

【0262】

1つのこのような方法は抗原結合部位 / 抗原複合体形成および解離の速度を測定することを含み、ここでそれらの速度は複合体の相手の濃度、相互作用のアフィニティー、および両方の方向における速度に等しく影響を及ぼす幾何学的パラメーターに依存する。こうして、「オンの速度定数」 (K_{on}) および「オフの速度定数」 (K_{off}) の両方は、濃度および会合および解離の実際の速度を計算することによって決定することができる。 K_{off} / K_{on} の比は、アフィニティーに関係しないすべてのパラメーターの削除を可能とし、こうして解離定数 K_d に等しい。一般に、下記の文献を参照のこと : Davies 他 (1990) Ann. Rev. Biochem. 59 : 439 - 473。

30

【0263】

抗体の「抗原結合部位」または「結合部分」は、抗原の結合に参加する免疫グロブリン分子の部分の意味する。抗原結合部位は、重鎖 (「H」) および軽鎖 (「L」) のN末端の可変 (「V」) 領域のアミノ酸残基により形成される。重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に分岐したストレッチは「超可変性領域」と呼ばれ、これらの領域は「フレームワーク領域」または「FR」として知られている、いっそう保存されたフランキングストレッチ間に介在する。

40

【0264】

こうして、用語「FR」は免疫グロブリン中の超可変性領域間にかつそれに隣接して自然に見出されるアミノ酸配列を意味する。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変性領域および重鎖の3つの超可変性領域は三次元空間中で互いに関して位置して抗原結合表面を形成する。抗原結合表面は結合した抗原の三次元表面に対して相補的であり、そして重鎖および軽鎖の各々の3つの超可変性領域は「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれる。

【0265】

さらに、結合因子は癌、例えば、前立腺癌をもつ患者または癌をもたない患者を、本明細書において提供される代表的アッセイにより、区別することができる。例えば、腫瘍タンパク質に結合する抗体または他の結合因子は、好ましくは疾患を有する患者の少なくとも約20%、より好ましくは患者の少なくとも約30%において癌の存在を示すシグナルを発生させる。選択的に、またはさらに、抗体は癌をもたない個体の少なくとも約90%において疾患の非存在を示すシグナルを発生させるであろう。

50

【0266】

結合因子がこの要件を満足するかどうかを決定するために、癌をもつか、あるいはもなたい患者からの生物学的試料（例えば、血液、血清、痰、尿および/または腫瘍バイオプシー）を本明細書に記載するように結合因子に結合するポリペプチドの存在についてアッセイすることができる。好ましくは、統計的に有意な数の疾患をもつか、あるいはもなたい試料をアッセイする。各結合因子は上記基準を満足すべきである；しかしながら、当業者は認識するように、結合因子を組合わせて使用して感度を改良することができる。

【0267】

上記要件を満足する任意の因子は結合因子であることができる。例えば、結合因子はペプチド成分、RNA分子またはポリペプチドをもつか、あるいはもなたいリボソームであることができる。好ましい態様において、結合因子は抗体またはその抗原結合性フラグメントである。抗体はこの分野において知られている種々の技術により調製することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：HarlowおよびLane、Antibody：A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988。

10

【0268】

一般に、細胞培養技術、例えば、本明細書に記載するようなモノクローナル抗体の発生により、または抗体遺伝子を適当な細菌または哺乳動物細胞宿主の中にトランスフェクトして、組換え抗体の産生を可能とすることによって、抗体を製造することができる。1つの技術において、ポリペプチドを含んでなる免疫原を種々の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジまたはヤギ）に最初に注射する。この工程において、本発明のポリペプチドは修飾を含まない免疫原として働くことができる。

20

【0269】

選択的に、特に比較的短いポリペプチドについて、ポリペプチドを担体タンパク質、例えば、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニンに結合させる場合、よりすぐれた免疫応答を誘発させることができる。好ましくは1またはそれ以上のブースター免疫化を組込んだ前もって決定したスケジュールに従い、免疫原を動物宿主に注射し、周期的に動物から血を取る。次いで、例えば、適当な固体支持体にカップリングされたポリペプチドを使用するアフィニティークロマトグラフィーにより、ポリペプチドに対して特異的なポリクローナル抗体をこのような抗血清から精製することができる。

【0270】

例えば、KohlerおよびMilstein、Eur. J. Immunol. 6：511 - 519、1976の技術、およびそれに対する改良された技術を使用して、問題の抗原性ポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体を調製することができる。簡単に述べると、これらの方法は所望の特異性（すなわち、問題のポリペプチドとの反応性）を有する抗体を産生することができる永久分裂能化細胞系統の調製を包含する。このような細胞系統は、例えば、前述したように免疫化された動物から得られた脾細胞から、産生することができる。次いで、例えば、骨髄腫細胞の融合相手、好ましくは免疫化された動物と同系であるものとの融合により、脾細胞を免疫化する。

30

【0271】

種々の融合技術を使用することができる。例えば、脾細胞および骨髄腫細胞を非イオン性洗浄剤と数分間組合わせ、次いでハイブリッド細胞の増殖を支持するが、骨髄腫細胞の増殖を支持しない選択培地上に低密度でプレートする。好ましい選択技術において、HAT（ハイポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を使用する。十分な時間後、通常約1~2週後、ハイブリッドのコロニーが観測される。単一コロニーを選択し、それらの培養上清をポリペプチドに対する結合性について試験する。高い反応性および特異性を有するハイブリドーマは好ましい。

40

【0272】

モノクローナル抗体を増殖するハイブリドーマコロニーの上清から単離することができる。さらに、種々の技術、例えば、適当な脊椎動物宿主、例えば、マウスの腹腔の中へのハイブリドーマ細胞の注射を使用して、収率を増加させることができる。次いで、モノクローナル抗体を腹水または血液から収集することができる。慣用技術、例えば、クロマト

50

グラフィー、ゲル濾過、沈殿、および抽出により、汚染物質を抗体から除去することができる。本発明のポリペプチドは精製プロセス、例えば、アフィニティークロマトグラフィー工程において使用することができる。

【0273】

抗体分子の免疫学的結合性を示すことができる抗原結合部位を含んでなる、多数の療法上有効な分子がこの分野において知られている。タンパク質分解性酵素パパインはIgG分子を優先的に切断していくつかのフラグメントを産生し、そのうちの2つ(「F(ab)」)の各々は無傷の抗原結合部位を含む共有結合のヘテロダイマーを含んでなる。酵素はIgG分子を切断していくつかのフラグメントを産生することができ、これらのフラグメントは両方の抗原結合部位を含んでなる「F(ab')₂」フラグメントを包含する。

10

【0274】

「Fv」フラグメントは、IgM、稀な場合においてIgGまたはIgA免疫グロブリン分子の優先的タンパク質分解的切断により製造することができる。しかしながら、Fvフラグメントはこの分野において知られている組換え技術により普通に誘導される。Fvフラグメントは、天然抗体分子の抗原認識および結合能力の多くを保持する抗原結合部位を含む、非共有結合のV_H:V_Lヘテロダイマーを包含する。Inbar他(1972)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman他(1976)Biochem. 15:2706-2710; およびEhrlich他(1980)Biochem. 19:4091-4096。

【0275】

一本鎖Fv(「sFv」)ポリペプチドは共有結合したV_H:V_Lヘテロダイマーであり、リンカーをコードするポリペプチドにより結合されたV_HおよびV_Lをコードする遺伝子を包含する遺伝子融合物から発現される。Huston他(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883。自然に凝集した-しかし化学的に分離された-抗体のV領域からの軽および重ポリペプチド鎖を、抗原-結合部位の構造に構造的に類似する三次元構造にフォールドするsFv分子に変換するために、化学的構造を区別する、多数の方法が記載されてきている。例えば、下記の文献を参照のこと:Huston他に対する米国特許第5,091,513号および米国特許第5,132,405号; およびLadner他に対する米国特許第4,946,778号。

20

【0276】

前述の分子の各々は、それぞれ重鎖および軽鎖のFR組間に介在する、重鎖および軽鎖のCDR組を包含し、これらはCDRSに対する支持を提供し、互い関係するCDRの空間的關係を定める。本明細書において使用するとき、用語「CDR組」は重鎖および軽鎖のV領域の3つの超可変性領域を意味する。重鎖または軽鎖のN末端から進行して、これらの領域はそれぞれ「CDR1」、「CDR2」、および「CDR3」と表示される。

30

【0277】

したがって、抗原結合部位は、重鎖および軽鎖のV領域の各々からのCDR組を含んでなる、6つのCDRを包含する。単一CDR(例えば、CDR1、CDR2またはCDR3)を含んでなるポリペプチドを本明細書において「分子認識単位」と呼ぶ。多数の抗原-抗体複合体の結晶学的分析により、CDRのアミノ酸残基は結合した抗原との広範な接触を形成し、ここで大部分の広範な接触は重鎖CDR3との接触であることが証明された。こうして、分子認識単位は抗原結合部位の特異的に主として関係する。

40

【0278】

本明細書において使用するとき、用語「FR組」は、重鎖または軽鎖のV領域のCDR組のCDRをフレームする、4つのフランキングアミノ酸配列を意味する。いくつかのFR残基は結合した抗原と接触することができる;しかしながら、FRは抗原-結合部位、特にCDRSに直接隣接するFR残基へのV領域のフォールディングに主として関係する。FRにおいて、ある種のアミノ残基およびある種の構造的特徴は非常に高度に保存される。

【0279】

これに関して、すべてのV領域の配列は約90アミノ酸残基の内部のジサルファイドループを含有する。V領域が結合性部位にフォールドするとき、CDRは抗原結合表面を形成する突起するループモチーフとして展示される。一般に、精確なCDRアミノ酸配列に無関係に

50

- ある種の「カノニカル」構造にフォールドされたCDRループの形状に影響を及ぼすFRの保存された構造的領域が存在することが認識されている。さらに、ある種のFR残基は非共有結合のドメイン間接触に参加し、抗体の重鎖および軽鎖の相互作用を安定化することが知られている。

【0280】

非ヒト免疫グロブリンに由来する抗原結合部位を含んでなる、多数の「ヒト化」抗体分子が記載されてきており、これらは下記のものを含む：齧歯類V領域を有するキメラ抗体およびヒト定常領域に融合されたそれらの関連するCDR (Winter他 (1991) *Nature* 349: 293 - 299; Lobblio他 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4220 - 4224; Shaw他 (1987) *J. Immunol.* 138: 4534 - 4538; およびBrown他 (1987) *Cancer Res.* 47: 3577 - 3583)、適当なヒト抗体の定常ドメインとの融合前にヒト支持FRの中にグラフト化された齧歯類CDR (Riechmann他 (1988) *Nature* 332: 323 - 327; Verhoeyen他 (1988) *Science* 239: 1534 - 1536; およびJones他 (1986) *Nature* 321: 522 - 525)、および組換え的にベニヤ化された齧歯類FRにより支持された齧歯類CDR (欧州特許出願公開No. 519,596、1992年12月23日発行)。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントにおけるそれらの部分の療法的用途の期間および有効性を制限する、齧歯類抗ヒト抗体分子に対する望ましくない免疫学的応答を最小とするように設計される。

10

【0281】

本明細書において使用するとき、用語「ベニヤ化FR」および「組換え的にベニヤ化されたFR」は、天然FRポリペプチドフォールディング構造の実質的にすべてを保持する抗原結合部位を含んでなる異種分子を提供するために、例えば、齧歯類の重鎖または軽鎖のV領域からの、FR残基をヒトFR残基で選択的に置換することを意味する。ベニヤ化技術は、抗原結合部位のリガンド結合特性が主として重鎖および軽鎖の構造および相対的位置により決定されたという理解に基づく。

20

【0282】

Davies他 (1990) *Ann. Rev. Biochem.* 59: 439 - 473。こうして、抗原結合特異性はヒト化抗体においてのみ保存することができ、ここでCDR構造、互いとのそれらの相互作用、およびV領域ドメインの残部とのそれらの相互作用は注意して維持される。ベニヤ化技術を使用することによって、免疫系が容易に直面する外部の(例えば、溶媒アクセス可能な)FR残基をヒト残基で選択的に置換して、弱く免疫原性の、または実質的に非免疫原性のベニヤ化表面を含んでなるハイブリッド分子を形成する。

30

【0283】

ベニヤ化プロセスにおいて、Kabat他、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*、第4版 (U.S. Dept. of Health and Human Services、U.S. Government Printing Office、1987)により収集されたヒト抗体可変ドメインについての入手可能な配列データ、Kabatデータベースに対する最新情報、および他のアクセス可能な米国および外国のデータベース(核酸およびタンパク質の両方)を使用する。V領域のみアミノ酸の溶媒アクセス可能性は、ヒトおよびネズミ抗体フラグメントについて既知の三次元構造から推定することができる。ネズミ抗原結合部位のベニヤ化において、2つの一般的工程が存在す。

40

【0284】

最初に、問題の抗体分子の可変ドメインのFRを、上に同定した源から得られたヒト可変ドメインの対応するFR配列と比較する。次いで、最も相同的なヒトV領域を対応するネズミアミノ酸と残基対残基で比較する。ヒト対応物と異なるネズミFR中の残基を、この分野においてよく知られている組換え技術によりヒト部分の中に存在する残基と置換する。少なくとも部分的に暴露された(溶媒アクセス可能な)部分を使用してのみ残基の交換を実施し、そしてV領域の三次構造に対して有意な効果を有することができるアミノ酸残基、例えば、プロリン、グリシンおよび帯電したアミノ酸の置換において注意を払う。

【0285】

この方法において、生ずる「ベニヤ化」ネズミ抗原結合部位はこうして下記の残基を保持するように設計される：ネズミCDR残基、CDRに実質的に隣接する残基、埋没されたまた

50

はほとんど埋没された（溶媒アクセス可能）として同定された残基、重鎖および軽鎖ドメイン間の非共有結合的（例えば、静電的および疎水性）接触に参加すると考えられる残基、およびCDRループの「カノニカル」三次構造に影響を及ぼすと考えられるFRの保存された構造的領域からの残基。次いで、これらの設計基準を使用して組換えヌクレオチド配列を調製し、これらの組換えヌクレオチド配列はネズミ抗原結合部位の重鎖および軽鎖の両方のCDRを見掛けのヒトFRに組合わせ、ネズミ抗体分子の抗原特異性を示す組換えヒト抗体を発現させるために、これらのヒトFRを使用して哺乳動物細胞をトランスフェクトすることができる。

【0286】

本発明の他の態様において、本発明のモノクローナル抗体を1またはそれ以上の治療剤に対してカップリングさせることができる。これに関して適当な治療剤は、放射性核種、分化インデューサー、薬剤、トキシン、およびそれらの誘導体を包含する。好ましい放射性核種は、 ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{211}At 、および ^{212}Bi を包含する。好ましい薬剤は、メトトレキサート、およびピリミジンおよびプリンアナログを包含する。好ましい分化インデューサーは、ホルボールエステルおよび酪酸を包含する。好ましいトキシンは、リシン、アブリン、ジフテリアトキシン、コレラトキシン、ゲロニン、シュードモナス（*Pseudomonas*）エキソトキシン、シゲラ[赤痢菌]（*Shigella*）トキシン、およびアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質を包含する。

10

【0287】

治療剤を適当なモノクローナル抗体に直接的または間接的（すなわち、リンカー基を介して）にカップリング（例えば、共有結合）させることができる。治療剤と抗体との間の直接的反応は、各々が他と反応することができる置換基を有するとき、可能である。例えば、一方の求核基、例えば、アミノまたはスルフヒドリル基は、他方のカルボニル含有基、例えば、無水物または酸ハロゲン化物、またはすぐれた離脱基（例えば、ハライド）を含有するアルキル基と反応することができる。

20

【0288】

選択的に、リンカー基を介して治療剤および抗体をカップリングさせることが望ましいことがある。リンカー基は、治療剤から抗体を離して、結合可能性を妨害するスペーサーとして機能することができる。また、リンカー基は治療剤上または抗体上の置換基の化学的反応性を増加させ、こうしてカップリング効率を増加させる働きをすることができる。また、化学的反応性の増加は、そうでなければ不可能である、治療剤の使用、または治療剤上の官能基の使用を促進することができる。

30

【0289】

当業者にとって明らかになるように、ホモ - およびヘテロ - 機能性の両方の、種々の二機能性および多機能性試薬（例えば、Pierce Chemical Co.、イリノイ州ロックフォード、のカタログに記載されている試薬）をリンカー基として使用することができる。カップリングは、例えば、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基または酸化された炭水化物残基を通して、実施することができる。このような方法を記載する多数の参考文献が存在する。例えば、Rodwell他に対する米国特許第4,671,958号。

【0290】

本発明の免疫複合体の抗体部分を含有しないとき、治療剤はいっそう効力のある場合、細胞の中への内在化時にまたはその間に切断可能なリンカー基を使用することが望ましいことがある。多数の異なる切断可能なリンカー基が記載されてきている。これらのリンカー基からの治療剤の細胞内解放のメカニズムは下記の反応による切断を包含する：ジサルファイド結合の還元（例えば、Spitlerに対する米国特許第4,489,710号）、光不安定性結合の照射（例えば、Senter他に対する米国特許第4,625,014号）、誘導化アミノ酸側鎖の加水分解（例えば、Kohn他に対する米国特許第4,638,045号）、血清補体仲介加水分解（例えば、Rodwell他に対する米国特許第4,671,958号）、および酸触媒加水分解（例えば、Battler他に対する米国特許第4,569,789号）。

40

【0291】

50

2以上の治療剤を抗体にカップリングさせることが望ましいことがある。1つの態様において、治療剤の多数の分子を1つの抗体分子にカップリングさせる。他の態様において、2以上の型の治療剤を1つの抗体にカップリングさせることができる。特定の態様に無関係に、2以上の治療剤との免疫複合体を種々の方法で調製することができる。例えば、2以上の治療剤を抗体分子に直接カップリングさせるか、あるいは多数の結合部位を提供するリンカーを使用することができる。選択的に、担体を使用することができる。

【0292】

担体は種々の方法、例えば、直接的またはリンカー基を介する共有結合により治療剤を有することができる。適当な担体は、タンパク質、例えば、アルブミン（例えば、Kato他に対する米国特許第4,507,234号）、ペプチドおよび多糖、例えば、アミノデキストリン（例えば、Shih他に対する米国特許第4,699,784号）を包含する。また、担体は非共有結合により、または、例えば、リボソームベヒクル内の、包膜（例えば、米国特許第4,429,008号および米国特許第4,873,088号）により治療剤を支持することができる。

10

【0293】

放射性核種因子に対して特異的担体は、放射性ハロゲン化小分子およびキレート化合物を包含する。例えば、米国特許第4,735,792号には、代表的な放射性ハロゲン化小分子およびそれらの合成が記載されている。放射性核種のキレートはキレート化合物から形成することができ、これらのキレート化合物は窒素および硫黄原子、例えば、金属、または金属酸化物、放射性核種と結合するためのドナー原子を含有する化合物を包含する。例えば、Davison他に対する米国特許第4,673,562号には、代表的キレート化合物およびそれらの合成が開示されている。

20

【0294】

T細胞組成物

本発明は、他の面において、本明細書に記載する腫瘍ポリペプチド、またはそれらの変異型または誘導体に対して特異的なT細胞を提供する。一般に、このような細胞は、*in vitro*または*ex vivo*において、標準プロトコルに従い調製することができる。例えば、T細胞は、商業的に入手可能な細胞分離系、例えば、下記のものを使用して、患者の骨髄、末梢血液、または骨髄または末梢血液の画分から単離することができる：ネキセル・セラピューディクス・インコーポレーテッド（Nexell Therapeutics, Inc.、カリフォルニア州アービン）から入手可能である Isolex™ System（また、下記の文献を参照のこと：米国特許第5,240,856号；米国特許第5,215,926号；WO 89/06280；WO 91/16116およびWO 92/07243）。選択的に、T細胞は関係するまたは無関係のヒト、非ヒト哺乳動物、細胞系統または培養物から誘導することができる。

30

【0295】

ポリペプチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/またはこのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞（APC）でT細胞を刺激することができる。このような刺激は、問題のポリペプチドに対して特異的であるT細胞の発生を可能とするために十分な条件下にかつ時間の間実行される。好ましくは、本発明の腫瘍ポリペプチドまたはポリヌクレオチドをデリバリーベヒクル、例えば、微小球内に存在させて、特異的T細胞の発生を促進する。

40

【0296】

T細胞が特異的の増殖し、サイトカインを分泌し、またはペプチドで被覆されたまたはポリペプチドをコードする遺伝子を発現するターゲット細胞を殺す場合、T細胞は本発明のポリペプチドに対して特異的であると考える。種々の標準技術に従い、T細胞の特異性を評価することができる。例えば、クロム解放アッセイまたは増殖アッセイにおいて、陰性対照と比較して、溶解および/または増殖の3倍以上の増加の刺激指数はT細胞の特異性を示す。このようなアッセイは、例えば、下記の文献に記載されているように実行することができる：Chen他、Cancer Res. 54:1065-1070、1994。選択的に、T細胞増殖の検出は種々の既知技術により達成することができる。

【0297】

50

例えば、T細胞増殖はDNA合成速度の増加を測定することによって検出することができる（例えば、トリチウム化チミジンを使用するT細胞培養物のパルス標識化、およびDNA中に導入されたトリチウム化チミジン量の測定による）。典型的には、3~7日間の腫瘍ポリペプチド（100ng/ml~100µg/ml、好ましくは200ng/ml~25µg/ml）との接触は、T細胞増殖を少なくとも2倍増加させるであろう。

【0298】

前述したように2~3時間接触させると、標準サイトカインアッセイにより測定して、T細胞を活性化させ、ここでサイトカイン（例えば、TNFまたはTNF- α ）解放レベルの2倍の増加はT細胞活性化を示す（下記の文献を参照のこと：Coligan他、Current Protocols in Immunology, Vol. 1, Wiley Interscience (Greene 1998)）。腫瘍ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド発現性APCに反応して活性化されたT細胞は、CD4⁺および/またはCD8⁺であることができる。腫瘍ポリペプチド特異的T細胞は標準技術により拡大することができる。好ましい態様において、T細胞は患者、関係するドナーまたは無関係のドナーに由来し、下記の刺激および拡大後に患者に投与される。

10

【0299】

療法上の目的で、腫瘍ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはAPCに反応して増殖するCD4⁺またはCD8⁺T細胞の数をin vitroまたはin vivoにおいて拡張することができる。T細胞増殖因子、例えば、インターロイキン-2、および/または腫瘍ポリペプチドを合成する刺激因子の細胞を添加するか、あるいは添加しないで、腫瘍ポリペプチド、またはこのようなポリペプチドの免疫原性部分に対応する短いペプチドに対して、T細胞をin vitroで暴露することができる。選択的に、腫瘍ポリペプチドの存在下に増殖する1またはそれ以上のT細胞の数をクローニングにより拡張することができる。細胞をクローニングする方法はこの分野においてよく知られており、そして限界希釈法を包含する。

20

【0300】

医薬組成物

追加の態様において、本発明は、単独で、または1またはそれ以上の治療法と組合わせて細胞または動物に投与するための、1またはそれ以上の本明細書に開示するポリヌクレオチド、ポリペプチド、T細胞および/または抗体組成物と、薬学上許容される担体とを含んでなる処方物に関する。

【0301】

理解されるように、必要に応じて、本明細書に開示する組成物はその上他の薬剤、例えば、他のタンパク質またはポリペプチドまたは種々の療法上活性な薬剤と組合わせて投与することができる。事実、追加の薬剤がターゲット細胞または宿主組織との接触時に有意な悪い作用を引き起こさないかぎり、添加することができる他の成分に対する制限は事実上存在しない。次いで、組成物は特定の場合において必要に応じて種々の他の薬剤と一緒に送与することができる。このような組成物は宿主細胞または他の生物学的源から精製することができるか、あるいは選択的に本明細書に記載するように化学的に合成することができる。同様に、このような組成物は置換されたまたは誘導化されたRNAまたはDNA組成物をさらに含んでなることができる。

30

【0302】

したがって、本発明の他の面において、1またはそれ以上の本明細書に開示するポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および/またはT細胞組成物と、薬学上許容される担体とを含んでなる医薬組成物が提供される。ある好ましい態様において、本発明の医薬組成物は、予防的および治療的ワクチン適用において使用するための本発明の免疫原性ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド組成物を含んでなる。一般に、ワクチン組成物は、例えば、下記の文献に記載されている：M.F. PowellおよびM.J. Newman編、Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)、Plenum Press (NY, 1995)。一般に、このような組成物は、1またはそれ以上の本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド組成物と、1またはそれ以上の免疫刺激因子とを含んでなるであろう。

40

【0303】

50

当業者にとって明らかなように、本明細書に記載する任意の医薬組成物は本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学上許容される塩を含有することができる。このような塩は、例えば、薬学上許容される無毒の塩基、例えば、有機塩基の塩（例えば、第一級、第二級および第三級アミンおよび塩基性アミノ酸の塩）および無機塩基の塩（例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウムおよびマグネシウム）を包含する。

【0304】

他の態様において、本発明の例示的免疫原性組成物、例えば、ワクチン組成物は、ポリペプチドが *in situ* で発生されるように、1またはそれ以上の前述のポリペプチドをコードするDNAを含んでなる。前述したように、ポリヌクレオチドはこの分野において知られている種々のデリバリー系により投与することができる。

10

【0305】

事実、多数の遺伝子デリバリー技術はこの分野においてよく知られており、例えば、下記の文献に記載されている：Rolland、*Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15 : 143 - 198、1998、およびその中に引用された参考文献。もちろん、適当なポリヌクレオチド発現系は、患者における発現の必要な調節DNA調節配列を含有するであろう（例えば、適当なプロモーターおよび終結シグナル）。選択的に、細菌デリバリー系は、この場合において、細胞表面上のポリペプチドの免疫原性部分を発現するか、あるいはこのようなエピトープを分泌する細菌（例えば、*Bacillus - Calmette - Guerrin*）の投与を包含することができる。

20

【0306】

したがって、ある態様において、本明細書に開示する免疫原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、多数の既知のウイルスをベースとする系を使用して、発現のために適当な哺乳動物宿主細胞の中に導入される。1つの例示的態様において、レトロウイルスは遺伝子デリバリー系のために好都合かつ有効なプラットフォームを提供する。この分野において知られている技術に従い、本発明のポリペプチドをコードする選択されたポリヌクレオチドをベクターの中に挿入し、レトロウイルス粒子の中にパッケージすることができる。

【0307】

次いで、組換えウイルスを単離し、被検体に出すことができる。多数の例示的レトロウイルス系が記載されてきている（例えば、米国特許第5,219,740号；MillerおよびRosman (1989) *Bio Techniques* 7 : 980 - 990；Miller、A.D. (1990) *Human Gene Therapy* 1 : 5 - 14；Scarpa他 (1991) *Virology* 180 : 849 - 852；Burns他 (1993) *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA* 90 : 8033 - 8037；およびBoris - LawrieおよびTemin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3 : 102 - 109)。

30

【0308】

さらに、多数の例示的アデノウイルスをベースとする系も記載されてきている。宿主ゲノムの中に統合するレトロウイルスと異なり、アデノウイルスは染色体外に存続し、こうして挿入突然変異誘発に関連する危険を最小にする（Haj - AhmadおよびGraham (1986) *J. Virol.* 57 : 267 - 274；Bett他 (1993) *J. Virol.* 67 : 5911 - 5921；Mittereder他 (1994) *Human Gene Therapy* 5 : 717 - 729；Seth他 (1994) *J. Virol.* 68 : 933 - 940；Barr他 (1994) *Gene Therapy* 1 : 51 - 58；Berkner、K.L. (1988) *Bio Techniques* 6 : 616 - 629；およびRich他 (1993) *Human Gene Therapy* 4 : 461 - 476)。

40

【0309】

また、種々のアデノ関連ウイルス（AAV）ベクター系がポリヌクレオチドのデリバリーのために開発された。AAVベクターは、この分野においてよく知られている技術を使用して容易に構築することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：米国特許第5,173,414号および米国特許第5,139,941号；国際公開No. WO 92 / 01070およびWO 93 / 03769；Lebkowski他 (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8 : 3988 - 3996；Vincent他 (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Carter、B.J. (1992) *Current Opinion in Bi*

50

otechnology 3 : 533 - 539 ; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158 : 97 - 129 ; Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5 : 793 - 801 ; Shelling および Smith (1994) Gene Therapy 1 : 165 - 169 ; および Zhou 他 (1994) J. Exp. Med. 179 : 1867 - 1875.

【 0 3 1 0 】

遺伝子転移により本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを送出するために有効な追加のウイルスベクターは、ウイルスのボックスファミリー、例えば、ワクシニアウイルスおよびトリボックスウイルスに由来するものを包含する。1例として、新規な分子を発現するワクシニアウイルス組換え体を次のようにして構築することができる。

【 0 3 1 1 】

まず、ワクシニアプロモーターおよびフランキングワクシニアDNA配列、例えば、チミジンキナーゼ (TK) をコードする配列に隣接するように、ポリペプチドをコードするDNAを適当なベクターの中に挿入する。次いで、このベクターを使用して細胞をトランスフェクトし、この細胞を同時にワクシニアで感染させる。相同的組換えはワクシニアプロモーター + 問題のポリペプチドをコードする遺伝子をウイルスゲノムの中に挿入する働きをする。5 - プロモデオキシウリジンの存在下に細胞を培養し、それに対して耐性であるウイルスブランクを取り上げることによって、生ずるTK.sup(-)組換え体を選択することができる。

【 0 3 1 2 】

ワクシニアをベースとする感染/トランスフェクション系を好都合に使用して、生物の宿主細胞中で1またはそれ以上の本明細書に記載するポリペプチドの誘導可能な、一時的発現または共発現を提供することができる。この特定の系において、まず、バクテリオファージT7RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換え体で細胞をin vitro感染させる。このポリメラーゼは絶妙な特異性を展示し、ここでそれはT7ポリメラーゼを支持する鋳型のみを転写する。感染後、細胞をポリヌクレオチドまたは問題のポリヌクレオチドでトランスフェクトし、T7プロモーターにより推進する。

【 0 3 1 3 】

ワクシニアウイルス組換え体からの細胞質中で発現されたポリメラーゼはトランスフェクトされたDNAをRNAに転写し、次いでこれは宿主翻訳機構によりポリペプチドに翻訳される。この方法はRNAおよびその翻訳産物の高いレベルの、一時的、細胞質産生を提供する。例えば、下記の文献を参照のこと : Elroy - Stein および Moss, Proc. Nat ' l. Acad. Sci. USA (1990) 87 : 6743 - 6747 ; Fuerst 他, Proc. Nat ' l. Acad. Sci. USA (1986) 83 : 8122 - 8126。

【 0 3 1 4 】

選択的に、アビボックスウイルス、例えば、フォウル痘およびカナリボックスウイルスをまた使用して問題のコーディング配列を送出することができる。組換え体アビボックスウイルスは、哺乳動物病原体から免疫原を発現し、非トリ種に添加したとき、保護的免疫性を与えることが知られている。アビボックスベクターの使用はヒトまたは他の哺乳動物種において特定の望ましい。なぜなら、アビボックス遺伝子のメンバーは感受性トリ種において産生的にのみ複製することができ、形質転換哺乳動物細胞において感染性ではないからである。アビボックスウイルスはこの分野において知られており、そしてワクシニアウイルスの産生に関して前述したように、遺伝的組換えを使用する。例えば、下記の文献を参照のこと : WO 91 / 03429 ; および WO 92 / 03545。

【 0 3 1 5 】

また、本発明のポリヌクレオチド組成物のデリバリーのために、多数のアルファウイルス、例えば、下記の文献に記載されているベクターを使用することができる : 米国特許第5,843,723号 ; 米国特許第6,015,686号 ; 米国特許第6,008,035号および米国特許第6,015,694号。ベネゼラウマ脳炎 (VEE) を使用することもでき、その例示的例は米国特許第5,505,947号および米国特許第5,643,576号に記載されている。

【 0 3 1 6 】

10

20

30

40

50

その上、複合体ベクター、例えば、Michael他、J. Biol. Chem. (1993) 268 : 6866 - 6869およびWagner他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA (1992) 89 : 6099 - 6103に記載されているアデノウイルスキメラベクターを本発明における遺伝子デリバリーのために使用することもできる。

【0317】

これらおよび他の既知のウイルスをベースとするデリバリー系についての追加の情報は、例えば、下記の文献に記載されている：Fisher - Hoch他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86 : 317 - 321、1989；Flexner他、Ann. N. Y. Acad. Sci. 569 : 86 - 103、1989；Flexner他、Vaccine 8 : 17 - 21、1990；米国特許第4,603,112号、米国特許第4,769,330号、および米国特許第5,017,487号；WO 89 / 01973；米国特許第4,777,127号；GB2,200,651；EPO ,345,242；WO 91 / 02805；Berkner、Biotechniques 6 : 616 - 627、1988；Rosenfeld他、Science 252 : 431 - 434、1991；Kolls他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91 : 215 - 219、1994；Kass - Eisler他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90 : 11498 - 11502、1993；Guzman他、Circulation 88 : 2838 - 2848、1993；およびGuzman他、Cir. Res. 73 : 1202 - 1207、1993。

【0318】

ある態様において、ポリヌクレオチドをターゲット細胞のゲノムの中に統合することができる。この統合は相同的組換え（遺伝子置換）を介する特異的位置および向きであることができるか、あるいはランダムな、非特異的位置（遺伝子増強）に統合することができる。なお他の態様において、ポリヌクレオチドは細胞の中にDNAの別々の、エピソームセグメントとして安定に維持することができる。このようなポリヌクレオチドのセグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞周期に対して独立に、またはそれと同期に維持および複製を可能とするために十分に配列をコードする。発現構築物が細胞に送出され、そして細胞の中にポリヌクレオチドが止まる方法は、使用する発現構築物の型に依存する。

【0319】

本発明の他の態様において、ポリヌクレオチドは、例えば、下記の文献に記載されているように、「裸」DNAとして投与 / 送出される：Ulmer他、Science 259 : 1745 - 1749、1993およびCohen、Science 259 : 1691 - 1692、1993。細胞の中に効率よく輸送される、生物分解性ビーズ上にDNAを被覆することによって、裸DNAの吸収を増加させることができる。

【0320】

なお他の態様において、本発明の組成物は粒子衝撃アプローチを介して送出すことができ、それらの多数は記載されてきている。1つの例示的例において、気体推進粒子加速は装置、例えば、パウダージェット・ファーマシューティカルズ（Powderjet Pharmaceuticals）PLC（英国オックスフォード）およびパウダージェット・ワクチンス・インコーポレーテッド（Powderjet Vaccines Inc.）（ウイスコンシン州マディソン）製の装置を使用して達成可能であり、それらのいくつかの例は下記の文献に記載されている：米国特許第5,846,796号；米国特許第6,010,478号；米国特許第5,865,796号；米国特許第5,584,807号；およびEP特許No.0,500,799。このアプローチは針を含まないデリバリーアプローチを提供し、ここで微視的粒子、例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの粒子の乾燥粉末状処方物は、手で保持する装置により発生されたヘリウムガスのジェット中で高速に加速され、粒子は問題のターゲット組織の中に推進される。

【0321】

関係する態様において、本発明の組成物の針を含まないガス推進注入に有効な他の装置および方法は、バイオジェット・インコーポレーテッド（Biojet, Inc）（オレゴン州ポートランド）により提供される装置を包含し、それらのいくつかの例は下記の文献に記載されている：米国特許第4,790,824号；米国特許第5,064,413号；米国特許第5,312,335号；米国特許第5,383,851号；米国特許第5,399,163号；米国特許第5,520,639号および米国特許第5,993,412号。

【0322】

他の態様によれば、本明細書に記載する医薬組成物は1またはそれ以上の免疫刺激因子

と、本発明の免疫原性ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、T細胞および/またはAPC組成物とを含んでなるであろう。免疫刺激因子は、外因的抗原に対する免疫応答（抗体および/または細胞仲介）を増強または強化する、本質的に任意の物質を意味する。免疫刺激因子の1つの好ましい型はアジュバントを含んでなる。多数のアジュバントは、急速な異化作用から抗原を保護するように設計された物質、例えば、水酸化アルミニウムまたは鉱油、および免疫応答の刺激因子、例えば、脂質A、百日咳菌（*Bordetella pertussis*）またはヒト型結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）由来タンパク質を含有する。

【0323】

ある種のアジュバントは商業的に入手可能であり、それらの例は次の通りである：フロインド不完全アジュバントおよびフロインド完全アジュバント（Difco Laboratories、ミシガン州デトロイト）；メルクアジュバント65（Merck and Company, Inc.、ニュージャージー州ローウェイ）；AS-2（SmithKline Beecham、ペンシルベニア州フィラデルフィア）；アルミニウム塩、例えば、水酸化アルミニウムゲル（明礬）またはリン酸アルミニウム；カルシウム、鉄または亜鉛の塩；アシル化チロシンの不溶性懸濁液；アシル化糖；カチオンのまたはアニオンの誘導化された多糖；ポリホスファゼン；生物分解性微小球；モノホスホリル脂質Aおよびquil A。また、サイトカイン、例えば、GM-CSF、インターロイキン-2、-7、-12、および他の増殖因子をアジュバントとして使用することができる。

10

【0324】

本発明のある態様において、アジュバント組成物は好ましくは主としてTh1型の免疫応答を誘導するものである。高いレベルのTh1型サイトカイン（例えば、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2およびIL-12）は、投与された抗原に対する細胞仲介免疫応答の誘導に好適である傾向がある。対照的に、高いレベルのTh2型サイトカイン（例えば、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10）は、体液性免疫応答の誘導に好適である傾向がある。

20

【0325】

本発明において提供されるワクチンの適用後、患者はTh1型およびTh2型応答を包含する免疫応答を支持するであろう。好ましい態様において、応答は主としてTh1型であり、Th1型サイトカインのレベルはTh2型サイトカインのレベルよりも大きい程度に増加するであろう。これらのサイトカインのレベルは標準アッセイにより容易に評価することができる。サイトカインファミリーの概観については、下記の文献を参照のこと：MosmanおよびCoffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145 - 173, 1989。

30

【0326】

主としてTh1型応答を誘導するある種の好ましいアジュバントは、例えば、モノホスホリル脂質A、好ましくは3-デオキシアシル化モノホスホリル脂質A、とアルミニウム塩との組み合わせを包含する。MPLTMアジュバントは、コリクサ・コーポレーション（Crix Corporation）から入手可能である（ワシントン州シアトル；例えば、下記の文献を参照のこと：米国特許第4,436,727号；米国特許第4,877,611号；米国特許第4,866,034号および米国特許第4,912,094号）。また、CpGを含有するオリゴヌクレオチド（ここでCpGジヌクレオチドはメチル化されていない）は主としてTh1型応答を誘導する。

40

【0327】

このようなオリゴヌクレオチドはこの分野においてよく知られており、そして例えば、下記の文献に記載されている：WO 96/02555、WO 99/33488および米国特許第6,008,200号および米国特許第5,856,462号。また、免疫刺激性DNA配列が、例えば、Sato他、*Science* 273: 352、1996に記載された。他の好ましいアジュバントは、サポニン、例えば、Quil A、またはその誘導体を含んでなり、QS21およびQS7aQUILA Biopharmaceuticals Inc.、マサチューセッツ州ファーマンガム）；エシン；ジギトニン；またはジョスソフィラ（*Gyssopila*）またはケノポジウム・キノア（*Chenopodium quinoa*）サポニンを包含する。他の好ましい処方物は、2以上のサポニンと、本発明のアジュバントの組み合わせ、例えば、少なくとも2つの下記のグループの組み合わせとを含む：QS21、QS7、Quil A、 α -エオシンまたはジギトニン。

50

【0328】

選択的に、サポニン処方物を、キトサンまたは他のポリカチオン性ポリマー、ポリラクチドおよびポリラクチド - コ - グリコリド粒子、ポリ - N - アセチルグルコサミンをベースとするポリマーマトリックス、多糖または化学的に修飾された多糖から構成された粒子、リポソームおよび脂質をベースとする粒子、グリセロールモノエステルから構成された粒子、およびその他から構成されたワクチンと組み合わせることができる。

【0329】

また、サポニンをコレステロールの存在下に処方して、粒状構造物、例えば、リポソームまたはISCOMを形成することができる。さらに、サポニンを、非粒状溶液または懸濁液中で、または粒状構造物、例えば、小層状リポソームまたはISCOM中で、ポリオキシエチレンエーテルまたはエステルと一緒に処方することができる。また、サポニンを賦形剤、例えば、CarboplTMと処方して粘度を増加させるか、あるいは乾燥粉末の形態で粉末状賦形剤、例えば、ラクトースと処方することができる。

10

【0330】

1つの態様において、アジュバント系は、モノホスホリル脂質Aとサポニン誘導体との組み合わせ、例えば、WO 94 / 00153に記載されているような、QS21と3D - MPLTMアジュバントとの組み合わせ、またはWO 96 / 33739に記載されているような、QS21がコレステロールでクエンチされている低い反応の組成物を包含する。他の好ましい処方物は、水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含んでなる。水中油型エマルジョンのQS21、3D - MPLTMアジュバントおよびトコフェロールを使用する、他の特に好ましいアジュバント処方物は、WO 95 / 17210に記載されている。

20

【0331】

他の増強されたアジュバント系はCpGを含有するオリゴヌクレオチドとサポニン誘導体との組み合わせを包含し、特にCpGとQS21との組み合わせはWO 00 / 09159に開示されている。好ましくは、処方物はさらに水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含んでなる。

【0332】

本発明の医薬組成物において使用するための追加の例示的アジュバントは下記のものを含む：モンタニドISA 720 (Seppic、フランス国)、SAF (Chiron、米国カリフォルニア州)、ISCOMS (CSL)、MF - 59 (Chiron)、アジュバントのSBAS系列 (例えば、SBAS - 2またはSBAS - 4、SmithKline Beecham、ベルギー国リクセンサルト、から入手可能である)、Detox (EnhanzynTM; Corixa、モンタナ州ハミルトン)、RC - 59 (Corixa、モンタナ州ハミルトン)、および他のアミノアルキルグルコサミン4 - ホスフェート (AGP)、例えば、係属中の米国特許出願第08 / 853,826号および同第09 / 074,720号 (それらの開示は引用することによって本明細書の一部とされる)に記載されているもの、およびポリオキシエチレンエーテルのアジュバント、例えば、WO 99 / 52549A1に記載されているもの。

30

【0333】

他の好ましいアジュバントは、下記の一般式のアジュバント分子を包含する：



ここでnは1~50であり、Aは結合または - C(O) - であり、RはC₁₋₅₀アルキルまたはフェニルC₁₋₅₀アルキルである。

40

【0334】

本発明の1つの態様は、一般式(1)のポリオキシエチレンエーテルを含んでなるワクチン処方物から成り、ここでnは1~50、好ましくは4~24、最も好ましくは9であり、R成分はC₁₋₅₀、好ましくはC₄ - C₂₀アルキル、最も好ましくはC₁₂アルキルであり、そしてAは結合である。ポリオキシエチレンエーテルの濃度は0.1~20%、好ましくは0.1~10%、最も好ましくは0.1~1%の範囲である。好ましいポリオキシエチレンエーテルは下記のグループから選択される：ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン - 9 - ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン - 8 - ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン - 4 - ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン - 55 - ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン - 23 - ラウリルエーテル。

50

【0335】

ポリオキシエチレンエーテル、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテルはメルクインデックス (Merck Index) (第12版: エントリー-7717) に記載されている。これらのアジュバント分子は、WO 99/52549に記載されている。上記一般式(1)に従うポリオキシエチレンエーテルは、必要に応じて、他のアジュバントと組み合わせることができる。例えば、好ましいアジュバントの組み合わせは、係属中の英国特許出願GB9820956.2に記載されているように、CpGを使用することが好ましい。

【0336】

本発明の他の態様によれば、本明細書に記載する免疫原性組成物は抗原提示細胞 (APC)、例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球および効率よいAPCであるように操作できる他の細胞を介して宿主に送出される。このような細胞は遺伝学的に修飾して抗原提示能力を増加させ、T細胞応答の活性化および/または維持を改良し、それ自体が抗腫瘍作用を有するようにし、および/または受容体と免疫学的にコンパティブルである (すなわち、合致したHLAハプロタイプ) ようにすることができるが、それは不必要である。APCは一般に種々の生物学的流体および器官、例えば、腫瘍および腫瘍周辺組織から単離することができる、そしてオートロガス、同種異系、同系または異種細胞であることができる。

10

【0337】

本発明のある態様において、抗原提示細胞として樹状細胞またはそれらの子孫を使用する。樹状細胞は高度に効力のあるAPCであり (BanchereauおよびSteinman、Nature 392: 245 - 251、1998) そして予防的または治療的抗腫瘍免疫性を誘発するための生理学的アジュバントとして有効であることが示された (TimmermanおよびLevy、Ann. Rev. Med. 50: 507 - 529、1999参照)。

20

【0338】

一般に、樹状細胞はそれらの典型的な形状 (in situ星状、in vitroにおいて可視の顕著な細胞質プロセス (樹枝突起) を有する)、高い効率で抗原を取り上げ、プロセスし、提示する能力、素朴なT細胞応答を活性化する能力に基づいて同定することができる。もちろん、in vivoまたはex vivoにおいて樹状細胞上に普通に見出されない特異的細胞表面レセプターまたはリガンドを発現するように、樹状細胞を操作することができ、そしてこのような修飾された樹状細胞は本発明により意図される。樹状細胞の代替物として、分泌された小胞性抗原負荷樹状細胞 (エキソソームと呼ばれる) をワクチンにおいて使用することができる (Zitvogel他、Nature Med. 4: 594 - 600、1998参照)。

30

【0339】

樹状細胞および子孫は、末梢血液、骨髄、腫瘍浸潤性細胞、腫瘍周辺組織 - 浸潤性細胞、リンパ節、脾臓、皮膚、臍帯血液または任意の他の適当な組織または流体から得ることができる。例えば、樹状細胞はex vivoにおいてサイトカイン、例えば、GM-CSF、IL-4、IL-13および/またはTNF の組み合わせを末梢血液から収集した単球の培養物に添加することによって分化させることができる。選択的に、GM-CSF、IL-3、TNF、CD40リガンド、LPS、flt3リガンドおよび/または推定の分化、成熟および増殖を誘導する1またはそれ以上の他の化合物の組み合わせを培地に添加することによって、末梢血液、臍帯血液または骨髄から収集したCD34陽性細胞を樹状細胞に分化させることができる。

40

【0340】

樹状細胞は、簡単な方法で2つの十分に特性決定された表現型を識別することを可能とする、「未熟」および「成熟」細胞として好都合にカテゴリー化される。しかしながら、この命名法は分化のすべての可能な中間段階を排除すると解釈すべきではない。未熟細胞は、抗原を吸収しかつプロセッシングする高い能力を有するAPCとして特性決定され、これらはFcレセプターおよびマンノースレセプターの高い発現と相関する。成熟表現型は典型的にはこれらのマーカーの低い発現により特性決定されるが、T細胞の活性化に関係する細胞表面の分子、例えば、クラスIおよびクラスII MHC、接着分子 (例えば、CD54およびCD11) および共同刺激性分子 (例えば、CD40、CD80、CD86および4-1BB) の高い発現に

50

より特性決定される。

【0341】

一般に、APCsに本発明のポリヌクレオチド（またはその部分または変異体）をトランスフェクトさせることにより、コード化ポリペプチド、またはその免疫原性部分を細胞表面に発現させることができる。このようなトランスフェクション処理を生体外で行い、このトランスフェクトされた細胞を含有する薬剤を、本願明細書中に述べるよう治療目的に使用することができる。あるいは、樹状またはその他の抗原提示細胞をターゲットとする遺伝子運搬手段を患者に投与することによって、トランスフェクションが生体内で起こるようにすることもできる。

【0342】

例えば樹状細胞の生体内および生体外トランスフェクション処理は、WO97/24447に記載されているような公知の方法で、またはMahvi et alがImmunology and cell Biology75: 456-460 (1997) に記述している遺伝子銃アプローチを利用して行うことができる。

【0343】

樹状細胞の抗原ローディングは樹状細胞または前駆細胞を腫瘍ポリペプチド、DNA（そのまま、またはプラスミドベクターに挿入して）またはRNAと一緒に；または抗原発現組換え細菌またはウイルス（例えばワクシニア、鶏痘ウイルス、アデノウイルスまたはレンチウイルスベクター）と一緒にインキュベートすることによって達成される。ローディングに先立ち、ポリペプチドを、（例えばキャリア分子のような）T細胞ヘルプを提供する免疫パートナーと共有結合させる。あるいは、ポリペプチドとは別に、またはポリペプチドの存在において、樹状細胞を非共有結合免疫パートナーでパルス処理してもよい。

【0344】

本発明の薬剤には、当業者に公知の適当なキャリアを使用できるが、キャリアのタイプは投与態様に依りて異なるのが普通である。本発明の薬剤は局所、経口、経鼻腔、経粘膜、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下、筋肉内など、該当の投与態様に合わせて調合すればよい。

【0345】

このような薬剤中に使用されるキャリアは生体適合性であり、生物分解性であってもよい。或る実施例では、活性成分の放出レベルが比較的一定となるように調合することが好ましい。しかし、他の実施例では、投与と同時に比較的迅速に放出することが好ましい。このような薬剤の調合は公知技術を使用する当業者のレベルで充分可能である。この点で有用なキャリアとしては、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）、ポリアクリレート、ラテックス、でんぷん、セルロース、デクストランなどの微粒子が挙げられる。

【0346】

抑制放出キャリアとしては、非流動性親水コア（例えば架橋多糖類またはオリゴ糖）および必要に応じてリン脂質のような両親媒性化合物からなる外層を含む超分子バイオベクターが挙げられる（米国特許第5,151,254号およびPCT出願WO94・20078号、WO94/23701号およびWO96/06638号を参照）。抑制放出調合物に含まれる活性化合物の量は、着床部位、放出速度および放出時間および治療または予防すべき状態の性質に応じて異なる。

【0347】

他の実施例では、本発明の薬剤のキャリアとして、生物分解性マイクロスフェア（例えば、ポリアクテート ポリグリコレート）を使用する。適当な生物分解性マイクロスフェアは、例えば、米国特許第4,897,268号；5,075,109号；5,928,647号；5,811,128号；5,820,883号；5,853,763号；5,814,344号；5,407,609号および5,942,252号に開示されている。WO99/40934号に開示され、本願明細書にも参考として引用している変性B型肝炎コアタンパク質キャリア系も種々の用途に好適である。他のキャリア/デリバリ系は米国特許第5,928,647号に開示されているような顆粒タンパク質複合体を使用し、この複合体は宿主におけるクラスI-被制限細胞毒Tリンパ球応答を誘発することがある。

【0348】

本発明の薬剤は多くの場合、1種または2種以上の緩衝液（例えば、中性緩衝食塩水また

10

20

30

40

50

は燐酸塩緩衝食塩水)、炭水化物(例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデクトラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸、例えば、グリシン、酸化防止剤、静菌剤、EDTAまたはグルタチオンのようなキレート剤、助剤(例えば、水酸化アンモニウム)、患者の血液で調剤を等張、高張、または劣張化する溶質、懸濁化剤、濃縮剤および/または保存剤をも含む。本発明の薬剤は凍結乾燥物として調剤することもできる。

【0349】

本発明の薬剤は密閉アンプルまたは密閉水薬びんのような1回服用分または複数回服用分の容器で提供される。このような容器は使用まで無菌性と安定性を維持するように密閉される。一般に、調剤は油性または水性ビークル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンの形態で保存される。凍結乾燥状態で保存され、使用の直前に無菌液を添加するだけでよい形態も可能である。

特定の薬剤を使用するため、経口、非経口、静脈内、鼻腔内、筋肉内投与に適した調剤を行うことは既に種々開発されており、その幾つかを以下に説明する。

【0350】

用途によっては、本発明の薬剤を経口方式で動物に投与することができる。その場合、これらの薬剤を不活性希釈剤または同化可能な食用キャリアで調剤するか、または硬質または軟質ゼラチンカプセルに封入するか、または圧縮して錠剤にするか、または食品と直接組み合わせることができる。

活性化化合物を賦形剤と組合せ、錠剤、舌下錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェハーなどの形態で使用できる(例えば、Mathiwits et al., Nature 1997 Mar 27; 386(6623): 410-4; Hwang et al., Crit Rev Ther drug Carrier Syst 1998; 15(3)-243-84; 米国特許第5,641,515号; 米国特許第5,580,579号および米国特許第5,792,451号を参照)。

【0351】

錠剤、トローチ、ピル、カプセルなどは種々の助剤、例えば、トラガカント、アカシア、コーンスターチ、ゼラチンのようなバインダー; 燐酸ジカルシウムのような賦形剤; コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸などのような分散剤; ステアリン酸マグネシウムのような滑剤; およびスクロース、ラクトース、サッカリンのような甘味料、またはペパーミント、ウィンターグリーン・オイル、チェリー・フレーバリングのような香料をも含むことができる。

【0352】

服用形態がカプセルである場合、上記材料の他に、液状キャリアをも含むことができる。コーティングのため、または服用形態を物理的に変えるため、他に種々の材料を含むことがある。例えば、錠剤、ピル、またはカプセルはセラック、糖またはこれら両方でコーティングすることがある。当然のことながら、服用形態に関係なく、使用される材料は薬学的に純粋であり、使用量が実質的に無害でなければならない。

【0353】

多くの場合、これらの調剤は少なくとも約0.1%またはそれ以上の活性化化合物を含有するが、活性成分の%は一様ではなく、調剤全体の重量または容積の約1または2%から約60%または70%またはそれ以上である。それぞれの治療目的に有用な薬剤中の活性化化合物量は、所与の化合物の1回服用分で必要な摂取量が確保されるように調剤される。可溶性、生物学的利用能、生物学的半減期、投与径路、貯蔵期間、およびその他の薬学的留意点は製薬分野の当業者が熟知であり、多様な投与および治療方法が望ましい。

【0354】

経口投与の場合、本発明の薬剤は1種または2種以上の賦形剤と組合わせて、うがい薬、歯磨き剤、口腔剤、吸入剤、舌下錠などの形態に調剤させることができる。活性成分を、例えば、ホウ酸ナトリウム、グリセリン、炭酸水素カリウムを含む口腔剤に組込んだり、歯磨き剤に組込んだり、水、バインダー、研磨剤、香料、発泡剤、湿潤剤を含む組成物に治療に有効な量を添加することもできる。舌下に挟むなど、口腔内で溶かす錠剤または溶

10

20

30

40

50

液の形態に調剤することもできる。

【0355】

場合によっては、本発明の薬剤を非経口、静脈内、筋肉内または腹腔内投与することが望ましい。このようなアプローチは公知であり、そのいくつかは米国特許第5,543,158号、15,641,515号および5,399,363号に開示されている。或る実施例では、遊離塩基または薬学的に許容できる塩の形態を取る活性化化合物を、ヒドロキシプロピルセルロースのような計面活性剤と混合した水溶液として調合する。グリセロール、液状ポリエチレン・グリコール、およびこれらの混合物及びオイル中に分散させる調合も可能である。通常の貯蔵および使用条件下で、これらの調合物は微生物の生長を防止する保存剤を含むのが普通である。

10

【0356】

注射用の形態としては、無菌の水溶液または水性ぶんさん液またはその場でこのような無菌の注射用水溶液または水性分散液を調製できる無菌粉末（例えば、米国特許第5,466,468号参照）がある。いずれの場合でも、無菌でなければならず、容易に注射できるだけの流動性が必要である。製造および貯蔵の段階において、安定であり、細菌や黴のような微生物の汚染作用から保護されねばならない。キャリアは水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレン・グリコールなど）これらの適当な混合物、および/または植物油を含有する溶媒または分散媒であればよい。

【0357】

レシチンのようなコーティングを利用するか、分散液の場合なら必要な粒度を維持するか、および/または界面活性剤を使用することによって適正な流動性を維持することができる。微生物の作用は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベンス、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって容易に防止できる。多くの場合、糖または塩化ナトリウムのような等張剤を含むことが好ましい。注射薬のを長く吸収させるためには、吸収を遅らせる、例えば、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンのような吸収遅延剤を含有させればよい。

20

【0358】

非経口投与水溶液の形態を取る実施例では、必要に応じて溶液を適当に緩衝し、希釈液を先ず十分な量の食塩水またはグルコースで等張化する。このような水溶液は静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に好適である。これに使用できる無菌水性媒は本発明の開示内容に照らして当業者が容易に理解するところである。例えば、1回分を1mlの等張NaCl溶液中に溶解させ、1000mlの皮下注入液に添加するか、または所定の注入部位に注入する（例えば、“REMINGTON's Pharmaceutical Sciences”15th Edition, pp1035-1038および1570-1580）。患者の状態に応じて、投与量のある程度変化させる必要がある。また、ヒトに投与する場合、当然のことながら、食品医薬品局の生物製剤基準部が定める無菌性、発熱性、その他一般的な安全性と純粋性の基準を満たさねばならない。

30

【0359】

本発明の他の実施例では、薬剤を中性または塩形態に調合する。医薬として許容可能な塩としては、（タンパク質の遊離アミノ基で形成される）酸添加塩があり、この塩は塩化水素酸またはリン酸のような無機酸、または酢酸、シュウ酸酒石酸、マンデル酸のような有機酸で形成される。遊離カルボキシル基で形成される塩は無機塩基、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、および有機塩基、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどから誘導できる。調合を終えたら溶液は投与形態に適合した態様で、且つ治療目的に適った量が投与される。

40

【0360】

キャリアは溶媒、分散媒、ピークル、コーティング、希釈剤、抗菌および抗真菌剤、等張化剤、吸収遅延剤、緩衝液、キャリア溶液、懸濁液、コロイドなどをも含む。薬剤として活性の物質にこれらの媒質や作用剤を使用することは公知である。公知の媒質または作用剤が活性成分と不適合でない限り、治療剤中に使用することができる。構成要素に補

50

足的な活性成分を組込むことも可能である。尚、“薬剤として許容可能な”とは、ヒトに投与した場合、アレルギーなどのような有害な反応を発生させない分子および組成物を意味する。

【0361】

或る実施例では、薬剤を鼻腔内スプレー、吸入および/またはその他のエアロゾル投与ピークルによって投与することができる。遺伝子、核酸およびペプチドを鼻腔エアロゾルスプレーを介して直接肺へ投与する方法は、例えば、米国特許第5,756,353号および5,804,212号に開示されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂を利用して薬剤を投与する方式 (Takemaga et al., J Controlled Release 1998 Mar 2; 52 (1-2): 81-7) およびリソホスファチジル-グリセロール化合物 (米国特許第5,725,871号) も公知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態で粘膜を介して薬剤を投与する方式も米国特許第5,780,045号に開示されている。

10

【0362】

或る実施例では、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、脂質粒子、気泡などを利用して、本発明の薬剤を適当な宿主細胞/器官に導入する。特に、本発明の薬剤は脂質粒子、リポソーム、気泡、ナノスフェア、ナノ粒子などに封入して投与するように調合することができる。あるいは、共有または非共有の形でキャリア・ピークルの表面に結合させることもできる。

【0363】

有望なキャリアとしてのリポソームおよびリポソーム状剤の形成および利用は当業者に公知である (例えば、Lasic, Trends Biotechnol 1998 Jul; 16 (7): 307-21; Takakura, Nippon Rinsho 1998 Mar; 56 (3): 691-5; Chandran et al., Indian J Exp Biol. 1997 Aug; 35 (8): 801-9; Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995; 12 (2-3): 233-61; 参考のため本願明細書中に引用した米国特許第5,567,434号; 米国特許第5,795,587号)。

20

【0364】

リポソームを他の方法ではトランスフェクションが困難な多くの種類の細胞、例えば、T細胞懸濁液、1次肝細胞菌株、PC12細胞と併用して成功を収めている (Renneisen et al., J Biol Chem. 1990 Sep 25; 265 (27): 16337-42; Muller et al., DNA Cell Biol. 1990 Apr; 9 (3): 221-9)。さらにまた、リポソームはウィルス-ベス投与系に典型的DNA長さの制約がない。遺伝子、種々の薬剤、放射線治療剤、酵素、ウィルス、転写調節因子、アロステリック・エフェクタなどを種々の培養細胞系および動物に導入するために利用され、成功を収めている。また、リポソームの使用が自己免疫反応や由々しき中毒事故の要因となるとは考えられない。

30

【0365】

或る実施例では、リン脂質を水性媒中に分散させ、自然発生的に多層同心二重気泡 (多層気泡 (MLVs) とも呼称される) を発生させることによってリポソームを形成する。

【0366】

他の実施例では、本発明の薬剤の、薬剤として許容可能なナノカプセル調剤を可能にする。一般に、ナノカプセルは薬剤を安定且つ再生可能に封入することができる (例えば、Quintanar-Guerrero et al., Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec; 24 (12): 1113-28参照)。細胞内重合過負荷に起因する副作用を回避するため、ポリマーを利用してこの超微粒子 (約0.1 μm) を生体内で分解できるようにする。この粒子の製法は、例えば、Couvreux et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988; 5 (1): 1-20; Muhlen et al., Eur J Pharm Biopharm. 1998 Mar; 45 (2): 149-55; Zambaux et al., J Controlled Release 1998 Jan 2; 50 (1-3): 31-40; oyobi米国特許第5,145,684号に開示されている。

40

【0367】

癌の治療方法

本発明の別の観点として、上記薬剤を癌、特に前立腺癌の免疫治療に利用することができる。この治療方法では、上記薬剤を、典型的には温血動物、好ましくはヒトに投与する

50

。患者は癌に罹っていてもいなくてもよい。即ち、上記薬剤を使用することによって、癌の発生を防止するか、または癌患者を治療することができる。原発腫瘍の外科的切除および/または放射線治療または従来 of 化学的治療剤投与の前後に薬剤およびワクチンを投与する。上述したように、薬剤の投与は静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内、皮内、肛門、膺、局所、経口など、適宜の方法で投与すればよい。

【0368】

或る実施例では、免疫療法は内因性宿主免疫システムをの生体内刺激に依存する積極的な免疫療法であり、免疫反応変性剤（例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチド）の投与で腫瘍を抑制するというものである。

【0369】

他の実施例では、免疫療法は、直接または間接的に抗腫瘍作用を仲介し、必ずしも無傷の宿主免疫システムに依存しない、定評のある腫瘍免疫反応性を有する薬剤（エフェクタ細胞または抗体）を投与する消極的な免疫療法である。エフェクタ細胞の例としては、上記T細胞、Tリンパ球（CD8⁺細胞毒Tリンパ球およびCD4⁺T-ヘルパー腫瘍浸潤リンパ球）、キラー細胞（Natural Killer細胞およびリンパ球活性化キラー細胞）、B細胞およびポリペプチドを発現する抗原提示細胞（樹状細胞およびマクロファージ）が挙げられる。

【0370】

養子免疫療法のためには、ポリペプチドに特異なT細胞レセプタおよび抗体レセプタをクローニングし、発現させて、他のベクターまたはエフェクタ細胞に移行させればよい。消極的免疫療法では、抗体または抗イディオタイプの抗体を発生させるためにもポリペプチドを利用することができる（米国特許第4,918,164号参照）。

【0371】

エフェクタ細胞は、試験管内培養によって養子免疫療法に十分な量を得ることができる。単一の抗原特異性エフェクタ細胞を数十億個にまで増殖させて、生体内での抗原認識を可能にする培養条件は公知である。このような試験管内培養条件としては、多くの場合、シトカイン（例えば、IL-2）および非分割支持細胞の存在において、間歇的な抗原による刺激が利用される。上述したように、免疫反応性のポリペプチドを利用することによって抗原特異性T細胞菌株を急速に増殖させ、免疫療法に必要な細胞数を発生させることができる。

【0372】

具体的には、公知の技術で、樹状細胞、マクロファージ、単球、繊維芽細胞および/またはB細胞のような抗原提示細胞を免疫反応性ポリペプチドでパルス処理するか、または1種または2種以上のポリヌクレオチドをトランスフェクトすればよい。例えば、抗原提示細胞に、組換えウィルスまたは他の発現システムでの発現を促進するのに好適なプロモータを有するポリヌクレオチドをトランスフェクトすることができる。

【0373】

療法に使用するため培養されるエフェクタ細胞は成長して広く分布し、長期にわたって生体内に生存できなければならない。研究結果によれば、培養されたエフェクタ細胞を生体内で成長させ、IL-2で補足される抗原による刺激を繰返すことで、長期に亘って多数のエフェクタ細胞を生体させることができる（例えば、Cheever et al., Immunological Reviews 157 : 177, 1997）

【0374】

ポリペプチドを発現するベクターを患者から採取された抗原提示細胞に導入し、生体外でのクローニング処理で増殖させ、これを再び同じ患者に移植することができる。公知の手段で、好ましくは無菌の状態、静脈内、腔内、腹腔内または腫瘍内投与で患者に再導入することができる。

【0375】

治療薬の投与経路、頻度および用量は個々の患者に応じて異なり、標準的な技術によって容易に決定することができる。一般に、薬剤やワクチンは注射（例えば、皮内、筋肉内、静脈内または皮下）、鼻腔内投与（例えば、吸入）または経口で投与される。好ましく

10

20

30

40

50

は、1ヶ月間隔で6回投与し、その後、ブースタワクチン投与を行う。個々の患者にはそれぞれ異なるプロトコルが適切な場合がある。投与した時に、抗腫瘍免疫反応を促進することができ、少なくとも（治療前に比較して）10 - 50%レベルアップすれば、それが適量である。

【0376】

免疫反応は患者の抗腫瘍抗体を測定するか、または試験管内で患者の腫瘍細胞を殺すことができる細胞溶解性エフェクタ細胞の、ワクチンによる発生によってモニターすることができる。このようなワクチンは免疫反応を起こさせ、ワクチンを投与されない患者よりも臨床転帰を改善させることが可能でなければならない。（例えば、回復が早く、完全に、または部分的に、または長期に亙って生存）。一般に、1種または2種以上のポリペプチドを含む薬剤およびワクチンでは、1回の投与量中に存在する各ポリペプチドの量は宿主体重1kg当り約25 μ g ~ 5mgである。適量は患者のサイズに応じて異なるが、約0.1mL ~ 約5mLが普通である。

10

【0377】

一般に、投与量と治療方法が妥当であるためには、治療および/または予防効果を発揮するに十分な量の活性化化合物が投与されねばならない。このような効果はワクチンを投与されない患者よりも臨床転帰が改善されている（例えば、回復が早く、完全に、または部分的に、または長期に亙って生存）ことでモニターすることができる。腫瘍タンパク質に対する既存の免疫反応は改善された臨床転帰と相関する。このような免疫反応は治療の前後に患者から得られたサンプルを使用して行われる標準的な増殖、細胞毒性またはサイトカイン分析によって評価することができる。

20

【0378】

癌検出・診断のための薬剤、方法及びキット

一般に、患者から得られる生体サンプル（例えば、血液、血清、痰および/または腫瘍組織）中の、1つまたは2つ以上の前立腺腫瘍タンパク質および/またはこのようなタンパク質を符号化するポリヌクレオチドの存在に基づいて、患者の癌を検出することができる。換言すれば、このようなタンパク質をマーカーとして利用することによって前立腺癌のような癌の有無を検出できる。

【0379】

このようなタンパク質はその他の癌の検出にも役立つ。一般に、本発明の結合剤は、生体サンプル中の結合剤に結合する抗原のレベル検出を可能にする。ポリヌクレオチド・プライマーおよびプローブを利用することによって、腫瘍タンパク質を符号化するmRNAレベルを検出することができ、癌の有無をも示唆する。一般に、前立腺腫瘍配列は正常組織よりも3倍以上のレベルで存在する。

30

【0380】

サンプル中のポリペプチド・マーカーを検出するのに結合剤を使用する種々の分析方法は当業者に公知である。例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい。一般に、患者における癌の有無は(a)患者から得られた生体サンプルを結合と接触させ；(b)サンプル中の、結合剤と結合するポリペプチドのレベルを測定し；(c)ポリペプチドのレベルを所定の合格値と比較することによって判定できる。

40

【0381】

好ましい実施例では、この分析において、固形支持材に固定した結合剤を使用し、これにポリペプチドを結合させ、サンプルの残余の部分から取り除く。結合しているポリペプチドを検出するため、リポーター・グループを含有し、結合剤/ポリペプチドと特異的に結合する検出試薬を使用する。検出試薬は、例えば、ポリペプチドまたは抗体と特異的に結合する結合剤またはこの結合剤と特異的に結合する抗免疫グロブリン、Gタンパク質、Aタンパク質またはレクチンなどである。或いは、ポリペプチドをリポーター・グループで標識し、結合剤をサンプルと共にインキュベートした後、固定結合剤に結合させる、競合アッセイを利用することもできる。この分析に使用できるポリペプチドとしては、完全長

50

前立腺腫瘍タンパク質および、上記のように結合剤が結合するポリペプチド部分が挙げられる。

【0382】

固形支持材は、腫瘍タンパク質を付着させることができるなら、公知のいかなる材料であってもよい。例えば、マイクロタイタープレートのテスト・ウェル、ニトロセルロースなどのような膜を利用できる。ガラス、ファイバークラス、ラテックス、またはポリスチレン、ポリ塩化ビニルのようなプラスチック材からなるビーズやディスクでもよい。さらには、米国特許第5,359,681号に開示されているような磁気粒子はファイバーオプチック・センサーでもよい。結合剤を固形支持材に固定するには、特許文献などに数多く記載されている種々の公知技術を利用すればよい。

10

【0383】

本発明において、“固定”とは吸着のような非共有結合と（結合剤と支持材の官能基との間の直接的なリンケージまたは架橋剤を介してのリンケージである）共有結合との双方を含む。マイクロタイタープレートのウェルまたは膜への吸着による固定が好ましい。この場合、適当な緩衝液中で結合剤を、適当な時間に互って固形支持材と接触させることで吸着が得られる。接触時間は温度にも左右されるが、典型的には約1時間～約1日である。一般に、（ポリスチレンやポリ塩化ビニルのような）プラスチック製マイクロタイターのウェルを、約10ng～約10 μ g、好ましくは約100ng～約1 μ gの結合剤と接触させれば、十分な量の結合剤を固定することができる。

20

【0384】

結合剤を固形支持材に共有結合させるには、支持材とも結合剤のヒドロキシルまたはアミノ基とも反応する二元機能試薬と支持材とを反応させることによって達成される。例えば、ベンゾキノンを使用するか、または支持材のアルデヒド基を結合パートナーの活性水素と縮合することによって、結合剤を、適当なポリマー・コーティングを有する支持材と共有結合させることができる（Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, A12-A13）。

【0385】

或る実施例では、2抗体サンドイッチ方式分析を採用する。この分析法では、マイクロタイター・プレートのような固形支持材に固定された抗体を、サンプルと接触させることによって、サンプル中のポリペプチドを固定抗体と結合させる。結合しなかったサンプルを、固定されたポリペプチド-抗体複合体から除去し、リポーター・グループを含む検出試薬（好ましくはポリペプチドの異なる部位に結合できる第2抗体）を添加する。固形支持材と結合したままの検出試薬量を、特定リポーター・グループに適した方法を利用して測定する。

30

【0386】

具体的には、上記のように抗体を支持材に固定したら、支持材上の残余のタンパク質結合部位をブロックする。ブロック剤は公知のものでよく、例えば、ウシ血清アルブミンまたはTween20（商標）（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）などがある。次いで、固定された抗体をサンプルと一緒にインキュベートし、ポリペプチドを抗体と結合させる。インキュベーションに先立って、サンプルを燐酸塩緩衝食塩水（PBS）のような適当な希釈剤で希釈する。

40

【0387】

一般に、好適な接触時間（即ち、インキュベーション時間）は前立腺癌のある個人から得られたサンプル中のポリペプチドの存在を検出するのに十分な時間である。接触時間は結合および非結合ポリペプチド間の平衡が少なくとも約95%となる結合レベルを達成するのに十分な時間であることが好ましい。当業者には明らかなように、平衡を達成するのに必要な時間は、一定時間に互って起こる結合レベルを評価することによって容易に測定できる。

【0388】

次いで、例えば、0.1% Tween20（商標）を含有するPBSのような適当な緩衝液で固形支

50

持材を洗浄することによって非結合サンプルを除去する。リポーター・グループを含有する第2抗体を固形支持材に加える。好ましリポーター・グループは上述したようなものである。

【0389】

次に、結合ポリペプチドを検出するのに十分な時間に互って、検出試薬を、固定された抗体-ポリペプチド複合体と一緒にインキュベートする。検出に適当な時間は、一定時間に互って起こる結合のレベルを評価することによって決定することができる。次いで、結合しなかった検出試薬を除去し、結合した検出試薬を、リポーター・グループを利用して検出する。(115ページ、1行目まで)リポーター・グループを検出する方法はリポーター・グループの性質に応じて異なる。

10

【0390】

放射性グループならば、シンチレーション・カウントまたはオートラジオグラフィが適当である。染料、発光性グループおよび蛍光性グループならば、分光分析を利用すればよい。ビオチンは異なるリポーター・グループ(通常は放射性または蛍光性グループまたは酵素)と結合しているアビジンを利用して検出すればよい。酵素リポーター・グループは(特定時間に互って)基質を加え、次いで反応物質の分光分析またはその他の分析を行うことによって検出するのが普通である。

【0391】

前立腺癌のような癌の有無を判定するには、固形支持体と結合したままのリポーター・グループから検出される信号を、所定の合格値に相当する信号と比較する。好ましい実施例では、癌を検出するための合格値は固定された抗体を癌のない患者からのサンプルと一緒にインキュベートする時に得られる平均信号である。所定の合格値より3標準偏差高い信号を発するサンプルは癌に関して陽性と考えられる。

20

【0392】

他の好ましい実施例では、Sackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, p.106-7に記載の方法に従い、Receiver Operator Curveを利用して合格値を設定する。この実施例では、診断テスト結果に照らしたそれぞれ妥当と思われる合格値に相当する複数対の真陽性率(即ち、感度)と偽陽性率(100%-特異度)のプロットから合格値を算出する。偽陽性率を極力小さくするため合格値をプロットに沿って左へずらし、偽陰性率を極力小さくするため右へずらしてもよい。一般に、この方法で設定された合格値よりも高い信号を発するサンプルは癌に関して陽性と考えられる。

30

【0393】

関連する実施例においては、フロースルーまたはストリップ・テスト・フォーマットで分析を行い、結合剤をニトロセルロースのような膜に固定する。フロースルー・テストでは、サンプルが膜を通過すると、サンプル中のポリペプチドが固定された結合剤と結合する。次に、第2結合剤を含む溶液が膜を通過すると、標識されたこの第2結合剤が結合剤-ポリペプチド複合体と結合する。次いで、結合した第2結合剤の検出が上述したように行われる。ストリップ・テスト・フォーマットでは、結合剤が結合する膜の一端がサンプルを含有する溶液に浸漬される。

40

【0394】

サンプルは膜に沿って第2結合剤を含む部位を固定されている結合剤の部位に向かって移動する。固定計都合剤の部位における第2結合剤濃度が癌の存在を示唆する。前記部位における第2結合剤の濃度は視認可能な線を描くパターンを形成する。このパターンが存在しなければ、結果が陰性であることを示唆する。膜に固定される結合剤の量は、サンプルが上記フォーマットにおける2-抗体サンドイッチ分析において陽性信号を発するに十分なレベルのポリペプチドを含む時はっきり視認できるように設定される。

【0395】

この分析に使用される好ましい結合剤は抗体およびその抗原結合フラグメントである。膜に固定される抗体の量は約25ng~約1 μ gであり、より好ましくは約50ng~約500ngであ

50

る。このテストは極めて少量のサンプルで行うことができる。

【0396】

本発明の腫瘍タンパク質または結合剤と併用できる分析プロトコルが他にも種々存在することはいうまでもない。上記のプロトコルはあくまでも例である。例えば、サンプル中のポリペプチドと結合するを検出するのに腫瘍ポリペプチドを利用する上記プロトコルは容易に変更することができる。腫瘍タンパク質に特異な抗体の検出は癌の存在と相関する。

【0397】

サンプル中の腫瘍タンパク質と特異に反応するT細胞の存在に基づいて癌を検出することもできる。患者から分離されたCD4⁺および/またはCD8⁺T細胞を含むサンプルを腫瘍ポリペプチド、これを符号化するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの少なくとも免疫原性部分を発現するAPCと一緒にインキュベートし、T細胞の特異活性化の有無を検出する。適当なサンプルとしては、例えば、分離T細胞がある。T細胞は(例えば、末梢血リンパ球のFicoll/Hypaque密度勾配遠心沈殿法のような)公知技術によって患者から分離することができる。

10

【0398】

ポリペプチド(5-25 μg/ml)と一緒に2-9日間37 °Cにおいて、試験管内でT細胞をインキュベートする。対照として腫瘍ポリペプチドが存在しないT細胞サンプルをもインキュベートすることが望ましい。CD4⁺T細胞については、T細胞の増殖評価によって活性化を検出することが好ましい。CD8⁺については、細胞毒活性の評価によって活性化を検出することが好ましい。疾病のない患者よりも増殖レベルが少なくとも2倍高く、および/または細胞毒活性が少なくとも20%高ければ、患者に癌が存在することを示唆する。

20

【0399】

上述のように、サンプル中の腫瘍タンパク質を符号化するmRNAのレベルに基づいて癌を検出することもできる。ポリメラーゼ鎖反応(PCR)に基づく分析に、少なくとも2種ノオリゴヌクレオチド・プライマーを使用することにより、サンプルからの腫瘍cDNAの一部を増幅することができ、その場合、オリゴヌクレオチド・プライマーの少なくとも一方が腫瘍タンパク質を符号化するポリヌクレオチドに対して特異である(即ち、これと雑種を形成する)。増幅されたcDNAを分離し、ゲル電気泳動のような公知技術で検出する。同様に、腫瘍タンパク質を符号化するポリヌクレオチドと特異に交雑するオリゴヌクレオチドを雑種形成分析に利用すれば、サンプル中の腫瘍タンパク質を符号化するポリヌクレオチドの存在を検出することができる。

30

【0400】

分析条件下で交雑を可能にするためには、オリゴヌクレオチド・プライマーおよびプローブは少なくとも10個、好ましくは20個のヌクレオチドに相当する長さの本発明の腫瘍タンパク質符号化ポリヌクレオチドの部分と、少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは約90%の同一性を有するオリゴヌクレオチド配列を含まねばならない。好ましくは、オリゴヌクレオチド・プライマーおよび/またはプローブは上記の条件下でポリペプチド符号化ポリヌクレオチドと交雑する。

【0401】

診断に使用されるオリゴヌクレオチド・プライマーおよび/またはプローブは好ましくは少なくとも10-40個のヌクレオチドに相当する長さを有する。このましいじっしれいでは、オリゴヌクレオチド・プライマーは上記配列を有するDNA分子の、少なくとも10個の連続するヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15個の連続するヌクレオチドをふくむ。PCR分析も交雑分析も公知である(Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263,1987; Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989)。

40

【0402】

好ましい分析では、PCRを逆転写と併用するRT-PCRを利用する。RNAは生体組織のようなサンプルから抽出され、逆転写されてcDNA分子を生成する。少なくとも1つの特異プライマーを使用するPCR増幅によって、cDNAを生成し、これを分離し、ゲル電気泳動などを利

50

用して可視化する。増幅はテスト患者から得たサンプルと健常者から得たサンプルで行う。増幅反応は2桁の範囲で数回希釈したcDNAで行う。テスト患者のサンプルを数回希釈した結果、健常者に比較して発現が2倍以上増大し、陽性と判定される。

【0403】

他の実施例では、癌進行のマーカーとして本発明の薬剤を使用することができる。この実施例では、癌診断のための上記分析を継続的に実施し、反応性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベル変化を評価する。例えば、6ヶ月～1年間、24-72時間ずつ分析を行い、必要に応じてその後も行う。検出されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルが増大する患者では、癌が進行中である場合が多い。逆に、レベルが一定のままか、または低下する場合、癌は進行していない。

10

【0404】

生体診断分析を直接腫瘍において行う。この分析では、腫瘍細胞を結合剤と直接接触させる。結合した結合剤は直接またはリポーター・グループを介して間接的に検出する。結合剤は組織学的にも利用できる。この場合、ポリヌクレオチド・プローブを使用することもできる。

【0405】

感度を高めるには、所与のサンプル内で、多重腫瘍タンパク質マーカーを分析すればよい。種々のタンパク質に対して特異な結合剤を単一の分析内で組み合わせることができる。多重プライマーまたはプローブを同時に使用することができる。腫瘍タンパク質マーカーの選択は一連の実験に基づいて行い、最適感度となるようにする。腫瘍タンパク質の分析を、

20

たの既知腫瘍抗原分析と組み合わせてもよい。

本発明の他の観点においては、細胞保護技法は、本明細書に開示される種々の検出方法の感度を改良するために、検出の前に使用され得る。

【0406】

典型的な細胞富化方法は、表面細胞マーカーに対する特異的モノクローナル抗体により被覆される免疫磁気ビーズを使用するか、又は四量体複合体がまず、サンプルにおける癌細胞を富化するか又は確実に選択するために使用され得る。種々の市販のキット、例えば Dynabeads (商標) Epithelial Enrich (Dynal Biotech, Oslo, Norway), StemSep™ (Stemcell Technologies, Inc., Vancouver, BC) 及び RosetteSep (StemCell Technologies) が使用され得る。当業者は、他の容易に入手できる方法及びキットがまた、所望する細胞集団を富化するか又は確実に選択するために適切に使用され得ることを認識するであろう。

30

【0407】

Dynabeads (商標) Epithelial Enrichは、正常及び腫瘍上皮組織上に発現される2種の糖タンパク質膜抗原に対して特異的なmAbにより被覆された磁気ビーズを含む。被覆されたビーズは、サンプルに添加され、そして次に、サンプル磁石に適用され、それにより、ビーズに結合される細胞が保護される。所望しない細胞は、洗浄され、そして磁的に単離された細胞はビーズから溶出され、そしてさらなる分析に使用される。

RosetteSepは、血液サンプルからの細胞を直接的に富化するために使用され得、そして種々の所望しない細胞を標的化する四量体抗体のカクテルからなり、そしてサンプルに存在する赤血球細胞(RBC)上のグリコホリンAにそれらを架橋し、ロゼットを形成する。Ficoll上で遠心分離される場合、標的化された細胞は、遊離RBCと共にペレット化する。

40

【0408】

消耗カクテルにおける抗体の組合せは、細胞が除去され、そして結果的に、細胞が回復されるかどうかを決定する。利用できる抗体は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD29, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD66B, CD66e, HLA-DR, IgE及びTCR。さらに、前立腺腫瘍抗体に対して特異的なmAbが類似する態様で開発され、そして使用され得ることが、本発明において企画される。例えば腫瘍 - 特異的細胞表面抗体に結合するmAbsが、磁気ビーズに接合されるか、又は四

50

量体抗体複合体に配合され得、そしてサンプルからの転移性前立腺腫瘍細胞を富化するが、又は確実に選択するために使用され得る。

サンプルが富化されるか又は明確に選択されると、細胞はさらに分析され得る。例えば、細胞が溶解され、そしてRNAが単離され得る。次に、RNAは、本明細書に記載されるように、同時PCRアッセイにおいて前立腺腫瘍 - 特異的プライマーを用いて、RT - PCRにゆだねられ得る。

【0409】

本発明のもう1つの観点においては、細胞保護技法は、前立腺腫瘍抗原を発現する転移性細胞の検出のためにより感受性の手段を提供するために同時PCRと一緒に使用され得る。骨髓サンプル、末梢血液、生検及び他のサンプルにおける前立腺癌の検出が、前立腺癌患者における診断及び予後のために所望される。

10

【0410】

本発明は上記診断方法に使用されるキットをも提供する。このキットは2つまたは2つ以上の、診断分析に必要な成分を含む。成分は化合物、試薬、容器および/または装置を含む。キット内の1つの容器はモノクローン抗体またはそのフラグメントを収容する。このキットは抗体結合を直接または間接的に検出するリポーター・グループを含む検出試薬をも収容する。

【0411】

あるいは、生体サンプル中の腫瘍たんぱく質を符号化するmRNAレベルを検出するようにキットを構成することもできる。このようなキットは多くの場合、上述のように、腫瘍たんぱく質を符号化するポリヌクレオチドと雑種形成する少なくとも1つのオリゴヌクレオチド・プローブまたはプライマーを含む。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、PCRまたは雑種形成分析に使用することができる。この種のキット中に存在するその他の成分としては、第2オリゴヌクレオチドおよび/または診断試薬または腫瘍たんぱく質を符号化するポリヌクレオチドの検出を容易にする容器が挙げられる。

20

下記の例は説明のためのものであり、本発明を制限するものではない。

【実施例】

【0412】

実施例1. 前立腺特異性ポリペプチドの分離および特徴づけ

この例は前立腺腫瘍cDNAライブラリーからの幾つかの前立腺特異性ポリペプチドの分離に係わる。Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning kit (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD20897) を使用し、メーカーのプロトコルに従って、前立腺腫瘍ポリA⁺RNAからヒトの前立腺腫瘍cDNAライブラリーを構成した。具体的には、ポリトロン (Kinematica, Switzerland) で前立腺腫瘍組織を均質化し、メーカーの指示に従ってTrizol試薬 (BRL Life Technologies) を使用して全RNAを抽出した。

30

【0413】

次いで、メーカーのプロトコルに従って、Qiagen oligotex spin column mRNA精製キット (Qiagen, Santa Clarita, CA91355) を使用して、ポリA⁺RNAを精製した。NotI/Oligo-dT18プライマーを使用して第1ストランドcDNAを合成した。二重鎖cDNAを合成し、EcoRI/BAXIアダプタ (Invitrogen, San Diego, CA) と結合させ、NotIで消化した。Chroma Spin-1 000カラム (Clontech, Palo Alto, CA) でサイズ分画した後、cDNAをpCDNA3.1 (Invitrogen) のEcoRI/NotI部位に結合させ、電気穿孔により、ElectroMax E. coli DH10B細胞に形質変換した。

40

【0414】

同じ方法を利用して、正常なヒト膵臓cDNA発現ライブラリーを、6個の組織試料 (Clontech) から作成した。独立コロニーの数、挿入断片を有するコロニーの%、平均挿入断片サイズを測定すると共に、配列分析によってcDNAライブラリーを特徴づけた。前立腺腫瘍ライブラリーは 1.64×10^7 個の独立コロニーを含み、コロニーの70%が挿入断片を有し、平均挿入断片サイズは1745塩基対であった。正常な膵臓cDNAライブラリーは 3.3×10^6 個のコロニーを含み、コロニーの69%が挿入断片を有し、平均挿入断片サイズは1120塩基対であ

50

った。いずれのライブラリーでも、配列分析の結果、クローンの大部分が完全な長さのcDNA配列を有し、mRNAから合成され、rRNAおよびミトコンドリアDNA汚染は極めて少ないことが判明した。

【0415】

Hara et al (Blood, 84: 189-199, 1994) が報告している方法に幾つかの変更を加え、上記前立腺腫瘍および正常な膵臓cDNAライブラリーを利用して、cDNAライブラリー減算を行った。具体的には、下記のようにして前立腺特異性減算cDNAライブラリーを形成した。正常な膵臓cDNAライブラリー(70 µg)をEcoRI, NotI, およびSfuIで消化し、DNAポリメラーゼ・クレナウ・フラグメントとフィリング-イン反応させた。

【0416】

フェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿の後、DNAを100 µlのH₂Oに溶解させ、過熱変性し、100 µl (100 µg)のPhotoprobeピオチン(Vector Laboratories, Burlingame, CA)と混合した。メーカーの勧めに従い、氷上で、得られた混合物を270W太陽灯で20分間照射した。追加のPhotoprobeピオチン(50 µl)を添加し、ピオチン化反応を繰り返した。ブタノールで5回抽出した後、DNAをエタノール沈殿させ、23 µlのH₂Oに溶解させてドライバ-DNAを形成した。

【0417】

トレーサー-DNA形成のため、10 µgの前立腺腫瘍cDNAライブラリーをBamHIおよびXhoIにて消化し、フェノールクロロホルムで抽出してから、Chromom spin-400カラム(クローンテック(Clontech))に通した。エタノール沈殿後、トレーサー-DNAは5 µlのH₂Oに溶解された。トレーサー-DNAを15 µlのドライバ-DNAおよび20 µlの2 × ハイブリダイゼーションバッファー(1.5MのNaCl/10mM EDTA/50mM HEPES pH7.5/0.2%ドデシル硫酸ナトリウム)と混合し、ミネラルオイル重層後完全に熱変性した。

【0418】

サンプルは直ぐに68 °Cの水槽に移され、20時間インキュベーションされた(長時間ハイブリダイゼーション[LH])。次に反応混合液をストレプトアビジン処理にかけてからフェノール/クロロホルム抽出した。この工程をさらに3回繰り返した。サブトラクション処理されたDNAを沈殿させ、12 µlのH₂Oに溶解、8 µlのドライバ-DNAおよび20 µlの2 × ハイブリダイゼーションバッファーと混合してから、68 °Cにて2時間ハイブリダイゼーションにかけた(短時間ハイブリダイゼーション[SH])。

【0419】

ピオチン化2本鎖DNAを除いた後、サブトラクション処理されたcDNAをクロラムフェニコールpBCSK+ (ストラタジーン(Stratagene)、ラジョラ(La Jolla)、カリフォルニア州(CA)92037)のBamHI/XhoI部位に連結し、エレクトロポレーションによりElectroMaxE.coli DH10B細胞内に形質転換し、前立腺腫瘍特異的サブトラクション処理cDNAライブラリー(「前立腺サブトラクションI」と呼ぶ)が作製された。

【0420】

サブトラクションcDNAライブラリーを解析するため、サブトラクション処理した前立腺腫瘍特異的ライブラリーより無作為に取り上げた100個の独立クローンよりプラスミドDNAを調製し、そのインサートの大きさに基づいてグループ分けした。代表的なcDNAクローンは、パーキンエルマー/アプライドバイオシステムズ部門(Perkin Elmer/Applied Biosystems)自動シーケンサーモデル373A(フォスターシティ(Foster City)、カリフォルニア州(CA))を用いたDNA配列決定によりさらに特性分析された。

【0421】

以後F1-13、F1-12、F1-16、H1-1、H1-9およびH1-4と呼ぶ6個のcDNAクローンがサブトラクション処理された前立腺特異的cDNAライブラリー中に豊富に存在することが示された。F1-12について決定された3'および5' cDNA配列は、それぞれ配列番号2および3に示されており、F1-13、F1-16、H1-1、H1-9およびH1-4について決定された3' cDNA配列はそれぞれ配列番号1および4-7に示されている。

【0422】

10

20

30

40

50

単離クローンのcDNA配列はEMBLおよびGenBankデータベース(96版)を用い、遺伝子バンク内の既知配列と比較された。4種類の前立腺腫瘍cDNAクローンF1-13、F1-16、H1-1およびH1-4は次の同定済み蛋白質をコードしていることが判明した: 前立腺特異抗原(PSA)、ヒト腺カリクレイン、ヒト腫瘍発現増進遺伝子、およびミトコンドリアチトクロームC酸化酵素サブユニットII。H1-9は以前同定された自律的複製配列に同一であることが判明した。F1-12に関するcDNA配列には有意な相同体は見出されなかった。

【0423】

次の研究ではF1-12の全長cDNA配列(P504Sとも呼ぶ)の単離が行われた。この配列は配列番号107に示されており、対応する推定アミノ酸配列は配列番号108に記載されている。P504SのcDNAスプライス変異体は配列番号600-605に示されている。

10

【0424】

より少ない前立腺腫瘍特異遺伝子をクローン化するために、上記前立腺腫瘍cDNAライブラリーから正常膵臓cDNAライブラリーおよび先のサブトラクション前立腺腫瘍特異的cDNAライブラリーで最も多く存在した3種類の遺伝子、即ちヒト腺カリクレイン、前立腺特異抗原(PSA)およびミトコンドリアチトクロームC酸化酵素サブユニットIIの遺伝子を差し引いてcDNAライブラリーサブトラクションを行った。具体的にはpCDNA3.1に入ったヒト腺カリクレイン、PSAおよびミトコンドリアチトクロームC酸化酵素サブユニットIIのcDNAをそれぞれ1μgドライバードNAに加え、上記同様にサブトラクション処理し、以後「スパイクサブトラクション前立腺腫瘍特異cDNAライブラリー」とよぶ第2回目サブトラクション処理済みcDNAライブラリーを得た。

20

【0425】

22個のcDNAクローンがスパイクサブトラクション前立腺腫瘍特異cDNAライブラリーより単離された。J1-17、L1-12、NJ-1862、J1-13、J1-19、J1-25、J1-24、K1-58、K1-63、L1-4およびL1-14と呼ばれるクローンについて決定された3'および5' cDNAは配列番号8-9、10-11、12-13、14-15、16-17、18-19、20-21、22-23、24-25、26-27および28-29にそれぞれ示されている。J1-12、J1-16、J1-21、K1-48、K1-55、L1-2、L1-6、N1-1858、N1-1860、N1-1861、N1-1804と称されるクローンについて決定された3' cDNA配列はそれぞれ配列番号30-40に示されている。

【0426】

これら配列と上記遺伝子バンク内の配列との比較からは、最も多く存在した5種類のDNA種のうち3種(J1-17、L1-12およびN1-1862;それぞれ配列番号8-9、10-11および12-13)とは有意な相同性を示されなかった。残り2最多存在種のうちの1種(J1-12;配列番号30)はこれまでに同定されたヒト肺界面活性剤関連蛋白質と同一であることが見出され、そして残りの1種(K1-48;配列番号33)は2-アリアルプロピオニル-CoAエピメラーゼの*R. norvegicus* mRNAと相同性を有すると判定された。

30

【0427】

スパイクサブトラクション前立腺腫瘍特異的cDNAライブラリーより単離された量的に少ない腫瘍17種のうち4種(J1-16、K1-35、L1-6およびN1-1864;それぞれ配列番号31、34、36および40)は非ヒト配列と相同性を示すことが見出され、2種(L1-2およびN1-1861;それぞれ配列番号35および39)は既知ヒト配列と相同性を示すことが見出された。ポリペプチドJ1-13、J1-19、J1-24、J1-25、K1-58、K1-63、L-4、L1-14(それぞれ配列番号14-15、16-17、20-21、18-19、22-23、24-25、26-27、28-29)に対して相同性は認められなかった。

40

【0428】

続く研究ではJ1-17、L1-12およびN1-1862(それぞれ配列番号109-111)の全長cDNA配列の単離が行われた。対応する推定アミノ酸配列は配列番号112-114に示されている。L1-12はまたP501Sとも呼ばれる。p501SのcDNAスプライス変異体は配列番号606に示されている。

【0429】

下記に記載のように、N1-1862(P503Sとしても言及される;配列番号111)は、前立腺

50

- 特異的発現を示すことが見出された。免疫組織化学及び流動細胞計測法分析は、P503Sが形質膜 - 結合された分子であることを示した。P503Sは、アミノ酸59 - 75, 90-106, 107 - 123及び218-134によりコードされることが予測される4個のトランスメンブランダメインを含む。P503Sは、アミノ酸1 - 29で切断可能なN - 末端シグナル配列を含む。P503Sコードのアミノ酸1 - 58のN - 末端は内部であり、アミノ酸76 - 89は細胞外であり、アミノ酸124 - 217は細胞外であり、そしてアミノ酸235 - 241は細胞内である。可能性あるN - 結合されたグリコシル化部位は、アミノ酸N - 141、N154、N - 178及びN - 184で存在する。

【0430】

P503Sのグリコシル化は、タンパク質から糖残基を選択的に除去する酸素、及びウェルターンプロット分析を用いて、実験的に確認されている。P503Sは、テトラスパニンファミリー又はTM4SF (トランスメンブラン4スーパーファミリー) として集合的に知られている分子ファミリーのメンバーである。このタンパク質ファミリーは、他のファミリーメンバーと相互作用し、そしてホモ及びヘテロダイマー化することが知られている。さらに、TM4SFファミリーメンバーは、インテグリンとして知られている付着分子ファミリーと結合する。TM4SFファミリーメンバーは、それらの生理学的応答に関連するシグナルトランスダクション経路を制御することによって、細胞付着及び細胞増殖を調節することが知られている。

【0431】

別の実験では、前立腺腫瘍cDNAライブラリーから3種類の正常前立腺ポリA+RNAのプールより調製された正常前立腺cDNAをサブトラクションすることで(「前立腺サブトラクション2」と称する)さらに4種類のクローンが同定された。以後U1-3064、U1-3065、V1-3692および1A-3905と称される、これらクローンの決定cDNA配列はそれぞれ配列番号69-72に示されている。決定されたこれら配列と遺伝子バンクとの配列比較からは、U1-3065との有意な相同性は見出されなかった。

【0432】

スパイクによる第2サブトラクション(「前立腺サブトラクションスパイク2」と称する)は、前立腺腫瘍特異cDNAライブラリーより正常前立腺cDNAライブラリーを持つスパイクでサブトラクションし、さらにPSA、J1-17、肺表面活性剤関連蛋白質、ミトコンドリアDNA、チトクロームc酸化酵素サブユニットII、N1-1862、自律複製配列、L1-12および腫瘍発現増大遺伝子でスパイクされ除かれた。以後V1-3686、R1-2330、1B-3976およびV1-3679と呼ばれる4種類の追加クローンが単離された。これらクローンについて決定されたcDNA配列はそれぞれ配列番号73-76に示されている。これら配列と遺伝子バンク内配列との比較からは、V1-3686およびR1-2330との有意な相同性は見出されなかった。

【0433】

上記3種類の前立腺サブトラクション(前立腺サブトラクション2、スパイクサブトラクション前立腺腫瘍特異cDNAライブラリー、および前立腺サブトラクションスパイク2)を更に分析した結果、1G-4736、1G-4738、1G-4741、1G-4744、1G-4734、1H-4774、1H4781、1H-4785、1H4787、1H4796、1I-4810、1I-4811、1J-4876、1K-4884および1K-4896と称される16個の更なるクローンが同定された。

【0434】

これらクローンの配列と上記遺伝子バンクの配列との比較からは、1G-4741、1G-4734、1I-4807、1J-4876および1K-4896(それぞれ配列番号79、81、87、90および92)との有意な相同性は示されなかった。更なる単離クローン分析より、それぞれ配列番号179-188および191-193に示される1G-4736、1G-4738、1G-4741、1G-4744、1H-4774、1H4781、1H-4785、1H4787、1H4796、1I-4807、1J-4876、1K-4884および1K-4896の延長cDNA配列が決定され、さらにそれぞれ配列番号189および190に示される1I-4810および1I-4811に関する追加の部分cDNA配列が決定された。

【0435】

前立腺サブトラクションスパイク2の追加研究より、さらに3個のクローンが分離された。それらの配列は上記同様にして決定され、最新のGeneBankと比較された。3クローン

10

20

30

40

50

全てが既知遺伝子であるシステインリッチ蛋白質、L1AA0242およびK1AA0280（それぞれ配列番号317、319および320）と相同性を有することが見出された。シンテニ（Synteni）マイクロアレイ（シンテニ（Synteni）、パロアルト（Palo Alto）、カリフォルニア州（CA））によるこれらクローンの更なる分析からは、これら3種類全てのクローンが大部分の前立腺腫瘍および前立腺BPH、ならびに試験した正常前立腺組織の多くで過剰発現されているものの、その他の正常組織ではいずれも発現が低いことが示された。

【0436】

更なるサブトラクションが、正常前立腺cDNAライブラリーを正常膵臓cDNAでサブトラクションすることで実施された（「前立腺サブトラクション3」と称する）。その結果1G-4761、1G-4762、1H-4766、1H-4770、1H-4771および1H-4722（配列番号93-98）と称される6個の追加クローンが同定された。これら配列と遺伝子バンク配列との比較からは、1G-4761および1H4711（それぞれ配列番号93および97）に対し有意な相同性は示されなかった。単離クローンの更なる分析から、それぞれ配列番号194-196および199に示される1G-4761、1G-4762、1H-4766および1H-4772に関する延長cDNA配列が決定され、そしてそれぞれ配列番号197および198に示される1H-4770および1H-4771に関する追加部分cDNA配列が決定された。

10

【0437】

前立腺癌患者3例のポリA+RNAプールより調製された前立腺腫瘍cDNAライブラリーを正常膵臓cDNAライブラリーでサブトラクションし（前立腺サブトラクション4）たところ、1D-4297、1D-4309、1D.1-4278、1D-4288、1D-4283、1D-4304、1D-4296および1D-4280（配列番号99-107）と称される8個のクローンが同定された。これらの配列は上記遺伝子バンクの配列と比較された。1D-4283および1D-4304（それぞれ配列番号103および104）との有意な相同性は見出されなかった。単離クローンの更なる分析から、それぞれ配列番号200-206に示される1D-4309、1D.1-4278、1D-4288、1D-4283、1D-4304、1D-4296および1D-4280に関する延長cDNA配列が決定された。

20

【0438】

上記前立腺サブトラクション1および前立腺サブトラクション2で単離されたcDNAクローンはコロニーPCRで増幅され、マイクロアレイ技術（シンテニ（Synteni）、パロアルト（Palo Alto）、カリフォルニア州（CA））を用い、前立腺腫瘍、正常前立腺および各種その他組織中に於けるそれらのmRNA発現レベルが決定された。簡単に述べると、各産物がアレイ中に特有位置を占める様にPCR増幅産物をスライド上にアレイフォーマットにドットした。試験対象となる組織サンプルよりmRNAを抽出し、逆転写し、蛍光標識cDNAプローブを製作した。マイクロアレイを標識cDNAプローブでプロービングし、スライドをスキャンして蛍光強度を測定した。

30

【0439】

この強度はハイブリダイゼーション強度に比例する。2つのクローンが、前立腺腫瘍および正常前立腺で過剰に発現され、そして試験したその他全ての正常組織（肝臓、膵臓、皮膚、骨髄、脳、乳房、副腎、膀胱、精巣、唾液腺、大腸、腎臓、卵巣、肺、脊髄、骨格筋および結腸）では発現が低レベルであることが見出された。P509SおよびP510Sについて決定されたcDNA配列はそれぞれ配列番号223および224に示されている。これら配列と上記遺伝子バンク中の配列との比較からは、これまでに同定された幾つかのESTと相同性が示された。

40

【0440】

さらに研究はP509Sの完全長cDNA配列の分離を行った。この配列は配列番号332に示されており、対応する推定アミノ酸配列は配列番号339に示されている。2種類のP510Sに関する変種完全長cDNA配列が配列番号535および536に、対応する推定アミノ酸配列がそれぞれ配列番号537および538に示されている。P510Sの更なるスプライス変異体が配列番号598および599に示されている。

【0441】

P510Sは、前立腺 - 特異的態様で発現されることが見出された。免疫組織化学及び流動

50

細胞計測分析は、P510Sが形質膜 - 結合された分子であることを示した。他の多薬剤耐性 - 関連トランスポータータンパク質に対する配列類似性に基づいて、P510Sは、ATP結合カセットを含む細胞表面発現された薬剤輸送タンパク質であることが予測される。P510Sは、アミノ135 - 151、233 - 249、330 - 246、351 - 367、711 - 727、775 - 791、850 - 866、867 - 883及び954 - 970によりコードされることが予測される9種のトランスメンブランドメインを含む。P510SのC - 末端は、細胞内であることが予測される。可能性あるN - 結合されたグリコシル化部位は、アミノ酸N - 651、N - 690、N - 746及びN754, N792, N-1176及びN-1312で存在する。

前立腺特異的cDNAの特性決定の間に単離された追加の前立腺 - 特異的クローンの決定されたcDNA配列を配列番号：618-689、691-697及び709-772に示す。これらの配列と公共のデータベースの配列との比較により、それらの配列の何れとも有意な相同性が無いことが示された。

【0442】

実施例2 . 前立腺特異的ポリペプチドの組織特異性の決定

遺伝子特異的プライマーを用い、代表的な前立腺特異的ポリペプチドF1-16、H1-1、J1-17 (P502Sとも称される)、L1-12 (P501Sとも称される)、F1-12 (P504Sとも称される) およびN1-1862 (P503Sとも称される) のmRNA発現レベルを、RT-PCRを利用して各種正常および腫瘍組織について調べた。簡単に述べると、全RNAはTrizol試薬を用い、上記の如く各種正常および腫瘍組織から抽出された。第1鎖合成は全RNA1-2 µgを使い、SuperScriptII逆転写酵素 (BRLライフテクノロジーズ (LifeTechnologies)) により42、1時間行われた。次にcDNAが遺伝子特異プライマーを用いたPCRにより増幅された。RT-PCRの判定量性を保証するために、 α -アクチンを各検討組織の内部コントロールとして用いた。

【0443】

まず第1鎖cDNAの連続希釈体を調製し、 α -アクチン特異プライマーを用いてRT-PCRを実施した。次に α -アクチン鑄型が直線増幅され、そして初期コピー数の差を反映できる十分な感度を得られる希釈率が選ばれた。これら条件下に於いて、各組織からの各逆転写反応について α -アクチンレベルが決定された。DNase処理すること、および逆転写酵素を加えずに調製された第1鎖cDNAを用いた場合に陰性のPCR結果であることを確認することによって、DNAの混入は最小限に留められた。

【0444】

mRNA発現レベルを、4種類の腫瘍組織 (2患者の前立腺組織、3患者の乳癌、結腸癌、肺癌) および前立腺、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、平滑筋、皮膚、胃、精巣、骨髄および脳を含む16種類の正常組織について検討した。F1-16は前立腺腫瘍組織、結腸癌および正常前立腺に於いて高レベルに、そして正常肝臓、皮膚および精巣では低レベルに発現されること、さらに検討したその他組織では検出されないことが判明した。H1-1は前立腺腫瘍、肺癌、乳癌、正常前立腺、正常結腸および正常脳で高いレベルに、正常肺、膵臓、骨格筋、皮膚、小腸、骨髄では遙か低レベルに、そして試験したその他組織では検出されないことが見出された。

【0445】

J1-17(P502S)およびL1-12(P501S)は、前立腺で特異的に過剰発現されると思われる、そして両遺伝子とも前立腺腫瘍と正常前立腺組織で高レベルに発現されていたが、検討したそのいずれの他組織での発現は低レベルで検出できなかった。N1-1862 (P503S)は前立腺腫瘍の60%で過剰発現されていること、そして正常結腸および腎臓でも検出可能であることが見出された。即ちRT-PCRの結果は、F1-16、H1-1、J1-17(P502S)、N1-1862(P503S)およびL1-12(P501S)は前立腺特異的であるか、または前立腺にて有意に高いレベルで発現されていることを示している。

【0446】

さらなるRT-PCR研究は、F1-12(P504S)が前立腺腫瘍において過剰発現されていること、そして正常腎臓でも検出されるが試験したその他全ての組織では検出されないことを示した。同様にR1-2330は前立腺腫瘍の40%で過剰発現され、そして正常腎臓および肝臓で検出

可能であるが、試験したその他全ての組織では検出されないことが示された。U1-3064は前立腺腫瘍の60%で過剰発現され、そして乳癌および結腸癌でも検出可能であるが、正常組織では検出されないことが示された。

R1-2230、U1-3064および1D-4279のRT-PCR特性分析は、これら3抗原が前立腺および/または前立腺腫瘍にて過剰発現されていることを示した。

【0447】

4種類の前立腺腫瘍と2種類の正常前立腺サンプル、2種類のBPH前立腺ならびに正常結腸、腎臓、肝臓、肺、膵臓、骨格筋、脳、胃、精巣、小腸および骨髄を用いたノーザン分析は、L1-12(P501S)が前立腺腫瘍および正常前立腺では過剰発現されているが、その他試験した正常組織では検出できないことを示した。J1-17(P502S)は2種類の前立腺腫瘍で検出されたが、その他試験した組織では検出されなかった。N1-1862(P503S)は3種類の前立腺腫瘍で過剰発現され、そして正常前立腺、結腸および腎臓でも発現されているが、試験したその他組織では発現されていないことが見出された。F1-12(P504S)は2前立腺腫瘍では高発現されていたが、試験したその他全ての組織では検出されないことが見出された。

10

【0448】

上記マイクロアレイ技術を用い、ここに記した代表的な抗原の前立腺腫瘍、乳癌および以下正常組織に於ける発現レベルを決定した：前立腺、肝臓、膵臓、皮膚、骨髄、脳、乳房、副腎、膀胱、精巣、唾液腺、大腸、腎臓、卵巣、肺、脊髄、骨格筋および結腸。L1-12(P501S)は正常前立腺および前立腺腫瘍において過剰発現されていること、そして正常骨格筋でいくらかの発現が検出されることが見出された。J1-12およびF1-12(P504S)は前立腺腫瘍で過剰発現され、試験したその他全ての組織ではより低いか、または検出できないことが見出された。

20

【0449】

N1-1862(P503S)は前立腺腫瘍および正常前立腺において高レベルに発現され、正常大腸および正常結腸では低レベルに発現され、そして試験したその他全ての組織では検出されないことが見出された。R1-2330は前立腺腫瘍および正常前立腺では過剰発現されており、そしてその他試験した全ての組織ではより低レベルに発現されることが見出された。1D-4279は前立腺腫瘍および正常前立腺で過剰発現されており、正常脊髄ではより低レベルに発現され、試験したその他の組織では検出できないことが見出された。

30

【0450】

P501S(配列番号110)がどの程度乳癌で発現しているかについて特異的に解析した別のマイクロアレイでは、乳癌だけでなく転移性乳癌でも(2/31)軽度の過剰発現があること、そして正常組織では無視できるほど低発現であることが示された。このデータは、P501Sが各種乳癌ならびに前立腺腫瘍でも過剰発現されていることを示唆している。

【0451】

Vasmatzisら(Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 95:300-304,1998)により各種腫瘍および正常組織に記載された32種類のEST(発現配列タグ)を上記マイクロアレイ技術を用いて検討した。これらクローンの内の2クローン(P1000CおよびP1001Cと称する)が前立腺腫瘍および正常前立腺で過剰発現されていること、および試験したその他全ての組織(正常大動脈、胸腺、休止および活性化PBMC、上皮細胞、脊髄、副腎、胎児組織、皮膚、唾液腺、大腸、骨髄、肝臓、肺、樹状細胞、胃、リンパ節、脳、心臓、小腸、骨格筋、結腸および腎臓)では低いし検出不能レベルに発現されていることが見出された。

40

【0452】

P1000CおよびP1001Cについて決定されたcDNA配列はそれぞれ配列番号384および472に示されている。P1001Cの配列はこれまでに単離されているJM27蛋白質に関するヒトmRNAと同一性をしめすことが判明した。配列番号384と公開データベース中配列との更なる比較から、492アミノ酸配列をコードするp1000Cの全長cDNA配列が同定された(配列番号929)。PSORTIIプログラムを用いたアミノ酸配列分析より、アミノ酸84-100由来の推定膜貫通ドメインが同定された。停止コドンを含むP100CのオープンリーディングフレームのcDNA配

50

列は配列番号930に示されており、停止コドンを含まないオープンリーディングフレームのそれは配列番号931に示されている。P1000Cの完全長アミノ酸配列は配列番号932に示されている。配列番号933および934はそれぞれアミノ酸1-100および100-492を示している。

【0453】

F1-12の完全長cDNA (P504Sとも称される；配列番号108) にコードされているポリペプチドの発現を免疫組織学的分析により調べた。標準的技術により完全長504S蛋白質に対しウサギ抗P504Sポリクローナル抗体を作製した。続いてポリクローナル抗体の単離および特性分析を、当分野周知の技術により実施した。免疫組織学的分析は、P504Sポリペプチドが試験した前立腺癌サンプル(n=5)の100%で発現されていることを示した。

【0454】

ウサギ抗P504Sポリクローナル抗体は良性前立腺細胞を一様に細胞質顆粒を染色し染めるのではなく、むしろ核を軽く染色した。正常組織分析からは、コードされたポリペプチドが試験したヒト組織全てではないが、幾つかの組織で発現されていることが示された。ウサギ抗P504Sポリクローナル抗体による陽性の細胞質染色像は正常ヒト腎臓、肝臓、脳、結腸および肺関連マクロファージに見出されたが、一方心臓および骨髄は陰性であった。

【0455】

このデータは、P504Sポリペプチドが前立腺癌組織内に存在すること、そして良性前立腺肥大組織と前立腺癌組織との間には染色に定性的および定量的な違いが存在することを示しており、このポリペプチドが前立腺腫瘍で選択的に検出されることから、前立腺癌の診断に有用であることを示唆している。

【0456】

実施例3 . PCRベースサブトラクションによる前立腺特異的ポリペプチドの単離および特性分析

正常前立腺を10種類のその他正常組織cDNA (脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、胎盤、骨格筋、脾臓および胸腺) でサブトラクションされ、次に第1ラウンドPCR増幅されたcDNAを含む、cDNAサブトラクションライブラリーはクローンテック (Clontech) より購入した。このライブラリーをメーカーのプロトコールに従って第2ラウンドPCR増幅にかけた。

【0457】

得られたcDNA断片をベクター-pT7BlueT-ベクター (ノバゲン (Novagen)、マジソン (Madison)、ウイスコンシン州(WI)) にサブクローニングし、XL-1BlueMRF' E.coli (ストラタジーン (Stratagene)) を形質転換した。独立したクローンよりDNAを単離し、パーキンエルマー/アプライドバイオシステム (Perkin Elmer/Applied Biosystems) 部門、自動シーケンサーモデル373Aを用いて配列決定した。

【0458】

49個の陽性クローンについて配列決定した。これらクローンのDNA配列を上記遺伝子バンク内の配列と比較したところ、そのうちの以後P5、P8、P9、P18、P20、P30、P34、P36、P38、P39、P42、P49、P50、P53、P55、P60、P64、P65、P73、P75、P76、P79およびP84と呼ぶ25クローンについては有意な相同性が認められなかった。これらクローンについて決定されたcDNA配列は、配列番号41-45、47-52および54-65にそれぞれ示されている。P29、P47、P68、P80およびP82 (それぞれ配列番号46、53および66-68) は、これまでに同定されたDNA配列とある程度相同性を示すことが判明した。発明者の知りうる限りにおいて、これまでこれら配列が前立腺内に存在することは示されていない。

【0459】

標準的完全長クローニング法にて配列番号67の配列をプローブとして用いる別の研究からは、P80 (P704Pとしても知られる) のスプライ変異体と思われる3種類のcDNA配列が単離された。これら配列は配列番号699-701に示されている。

【0460】

上記PCRをベースとした技術を用いた別の研究からは、さらに180種類の追加クローンが単離され、そのうち23クローンが既知配列と有意な相同性を持たないことが見出された。

10

20

30

40

50

これらクローンについて決定されたcDNA配列は配列番号115-123、127、131、137、145、147-151、153、156-158および160に示されている。23クローン（配列番号124-126、128-130、132-136、138-144、146、152、154、155および159）はこれまでに同定されたESTといくらかの相同性を示すことが見出された。

【0461】

さらに10クローン（配列番号161-170）は既知遺伝子とある程度の相同性を持つことが判明した。P20を含むより大型のcDNAクローンは、P703Pと称される遺伝子のスプライト変異体である。DE1、DE13およびDE14と称される変異体について決定されたDNA配列がそれぞれ配列番号171、175および177に示されており、そして対応する推定アミノ酸配列はそれぞれ配列番号172、176および178に示されている。P703の延長スプライス型について決定されたcDNA配列は配列番号225に示されている。DE2およびDE6と称されるスプライス変異体のDNA配列はそれぞれ配列番号173および174に示されている。

10

【0462】

腫瘍組織（前立腺(n=5)、乳房(n=2)、結腸および肺）、正常組織（前立腺(n=5)、結腸、腎臓、肝臓、肺(n=2)、卵巣(n=2)、骨格筋、皮膚、胃、小腸および脳）、および活性化ならびに非活性化PBMCの代表クローンに於けるmRNA発現レベルを、上記RT-PCRより決定した。発現は特記無い限り各組織について1サンプルずつ検討された。

【0463】

P9は、同等の発現を示した正常結腸を除き、試験した全正常試験組織に比べて、正常前立腺および前立腺腫瘍で高く発現していることが判明した。P703P遺伝子の一部であるP20は、試験した全12種類の正常組織に比べて正常前立腺および前立腺腫瘍で高く発現していることが見出された。肺（2例のうち1）を除く全ての正常組織に比べた場合、乳癌(n=2)、結腸癌および肺癌でP20はいくらか増加を示した。肺および胃を除くその他正常細胞に比べ、正常前立腺、前立腺腫瘍および乳癌でP18の発現増加が認められた。

20

【0464】

正常前立腺では、その他多くの正常組織に比べ若干のP5発現の増加が観察された。しかし、正常肺およびPBMCにおいて、いくらかの発現増加が見られた。P5の発現増加は前立腺腫瘍（5例中2例）、乳癌および1例の肺癌サンプルでも観察された。P30に関しては、正常前立腺および前立腺腫瘍において、試験した残り12種類の他正常組織中有6組織と類似の発現レベルが認められた。

30

【0465】

乳癌、1肺癌サンプルおよび1結腸癌サンプル、ならびに正常PBMCにおいて発現増加が認められた。P29は前立腺腫瘍（5例中5例）および正常前立腺（5例中5例）に於いて、大部分の正常組織と比較した時過剰発現が認められた。しかし、P29の実質的発現が正常結腸および正常肺（2例中2例）に観察された。P80は、試験したその他全ての正常組織に比べ前立腺腫瘍（5例中5例）および正常前立腺（5例中5例）で過剰発現が認められ、そして結腸癌でも発現増加が認められた。

【0466】

さらなる研究の結果、以後10-d8、10-h10、11-c8、7-g6、8-b5、8-b6、8-d4、8-d9、8-g3、8-h11、9g-12および9-f3と称される追加クローンが単離された。10-d8、10-h11、11-c8、8-d4、8-d9、8-h11、9g-12および9-f3について決定された配列は配列番号207、208、209、216、217、220、221および222にそれぞれ記されている。

40

【0467】

7-g6、8-b5、8-b6および8-g3について決定された正方向および逆方向のDNA配列はそれぞれ配列番号210と211、212と213、214と215および218と219に記載されている。これら配列と遺伝子バンク配列との比較から、9-f3の配列に対し有意な相同性がないことが示された。10-d8、11-c8および8-h11のクローンは既に単離されているESTといくらかの相同性を示し、そして10-h10、8-b5、8-b6、8-d4、8-d9、8-g3および9-f12は既に同定された遺伝子といくらかの相同性を示すことが見いだされた。

【0468】

50

これらクローンのmRNA発現レベルは上記マイクロアレイ技術を用い決定された。クローン7-G6、8-G3、8-B5、8-B6、8-D4、8-D9、9-F3、9-F12、9-H3、10-A2、10-A4、11-C9および11-F2が前立腺腫瘍および正常前立腺で過剰発現されていることが見いだされた。8-F11の発現増加は前立腺腫瘍および正常な前立腺、膀胱、骨格筋および結腸で見られた。10-H10の発現増加は、前立腺腫瘍および正常な前立腺、膀胱、肺、結腸、脳および大腸に見られた。9-B1の発現増加は前立腺癌、乳ガンおよび正常前立腺、唾液腺、大腸および皮膚に見られ、11-C8の発現増加は前立腺腫瘍および正常の前立腺と大腸に見られた。

【0469】

上記のPCRをベースとした正常前立腺サブトラクションより得た追加cDNAの1断片が前立腺特異的であることが、マイクロアレイ技術およびRT-PCRにより見いだされた。このクローン(9-A11と称される)について決定されたcDNA配列は配列番号226に示されている。この配列と公開データベースとの比較したところ、既知遺伝子HOXB13と99%の同一性が示された。

10

さらに研究を行い、クローン8-C6および8-H7を単離した。これらクローンについて決定されたcDNA配列はそれぞれ配列番号227および228に示されている。これら配列は単離済みのESTといくらか相同性を示すことが見いだされた。

【0470】

PCRおよびハイブリダイゼーションをベースとする方法を用いてクローンP20(P703Pとも呼ばれる)に関するより長いcDNA配列を得、遺伝子の5'末端をさらに伸ばした3種類の追加のcDNA断片を得た。これらP703PDE5、P703P6.26およびP703PX-23(配列番号326、328および330、それぞれ対応する推定アミノ酸配列が配列番号327、329および331に示される)と呼ばれる断片は、cDNAライブラリー(#141-26)をP703Pの一部をプローブとして用いるスクリーニングにかけることで、回収された追加の5'配列P703PDE5を含む。

20

【0471】

P703P6.26は3種類の前立腺腫瘍cDNA混合体より回収され、そしてP703PX_23はcDNAライブラリー(#438-48)より回収された。まとめると、追加配列は推定シグナル配列の一部と共に推定成熟型セリンプロテアーゼの全てを含んでいる。P703Pの完全長cDNA配列は配列番号524に、そして対応するアミノ酸配列は配列番号525に示されている。

【0472】

コンピューターアルゴリズムを用いたところ、P703Pの以下の領域が潜在的なHLA A2-結合CTLエピトープを示すことが予測された：配列番号525のアミノ酸164-172(配列番号866)；配列番号525のアミノ酸160-168(配列番号867)；配列番号525のアミノ酸配列239-247(配列番号868)；配列番号525のアミノ酸118-126(配列番号869)；配列番号525のアミノ酸112-120(配列番号870)；配列番号525のアミノ酸155-164(配列番号871)；配列番号525のアミノ酸117-126(配列番号872)；配列番号525のアミノ酸164-173(配列番号873)；配列番号525のアミノ酸154-163(配列番号874)；配列番号525のアミノ酸163-172(配列番号875)；配列番号525のアミノ酸58-66(配列番号876)；および配列番号525のアミノ酸59-67(配列番号877)。

30

【0473】

P703Pはトロンビンの様な既に同定済みのプロテアーゼにいくらかの相同性を示すことが判明した。トロンピン受容体は主に高い転移性を示す乳ガン細胞および乳ガン生検サンプルに発現していることが分かっている。トロンピン受容体アンチセンスcDNAの導入は、培養転移性乳ガン細胞の浸潤を阻害することが示されている。トロンピン受容体に対する抗体は、トロンピン受容体の活性化およびトロンピン誘導血小板活性化を阻害する。さらに受容体の係留リガンドドメインを組み立てるペプチドは、トロンピンによる血小板凝集を阻害する。P703Pは前立腺癌では、癌細胞または間質細胞上のプロテアーゼ活性化受容体を介しその役割を果たすだろう。

40

【0474】

P703Pの持つ潜在的トリプシン様プロテアーゼ活性は、癌細胞膜上のプロテアーゼ活性化受容体を活性化して癌発生を促進するか、または隣接細胞(間質細胞の様な)上のプロ

50

テアーゼ活性化受容体を活性化して増殖因子および/またはプロテアーゼ(マトリックスメタロプロテアーゼ)を分泌し、これが腫瘍形成、浸潤および転移を促進するかもしれない。即ちP703Pはプロテアーゼ活性化受容体の活性化を通じ癌進行および/または転移を促進するのだろう。従ってP703P-受容体相互作用を遮断するポリペプチドおよび抗体は、前立腺癌の治療に有効に利用できるだろう。

【0475】

P703Pの発現が腫瘍ステージの指標であるグレアソン(Gleason)重症度の上昇に伴って増加するか決定するために、グレアソンスコア5ないし>8の範囲の前立腺腫瘍サンプルに定量PCR分析を行った。P703P発現の平均レベルはグレアソンスコアの上昇に伴い増加し、P703Pの発現が疾患重傷度の増加と相関するらしいことが示された。

10

【0476】

前立腺腫瘍プールを正常組織のプールでサブトラクションしたPCRをベースとしたサブトラクションライブラリー(JP:PCRサブトラクションと称する)を用いた別の研究より13個の追加クローンが単離され、そのうちの7個は既知GenBank配列と有意な相同性を共有しなかった。これら7個のクローン(P711P、P712P、novel23、P774P、P775P、P710PおよびP768P)について決定されたcDNA配列はそれぞれ配列番号307-311、313および315に示している。

【0477】

残りの6クローン(配列番号316および321-325)は既知遺伝子といくらかの相同性を示した。マイクロアレイ分析より、これら13個のクローン全てが正常非前立腺組織に比べ前立腺腫瘍、BPHおよび正常前立腺において3またはそれ以上の倍率で過剰発現していることが示された。クローンP711P、P712P、novel23およびP768Pは試験した大部分の前立腺腫瘍およびBPH組織(n=29)ならびに正常前立腺組織の多く(n=4)で過剰発現を示したが、全ての正常組織ではバックグラウンドないし低いレベルの発現であった。クローンP774P、P775PおよびP710Pは比較的低い発現を示し、発現を示す前立腺腫瘍およびBPHサンプルも少数であり、正常前立腺では陰性ないし低い発現であった。

20

【0478】

更なる研究よりP712P(配列番号552)に関する延長cDNA配列が単離された。配列番号552の配列内に存在する16個の推定オープンリーディングフレームによりコードされたアミノ酸配列は配列番号553-568に示されている。

30

【0479】

P711Pに関する完全長cDNAは、配列番号307の部分配列を用いて前立腺cDNAライブラリーをスクリーニングすることで得た。具体的には標準的技術を用いて定方向クローニングされた前立腺cDNAライブラリーを調製した。このライブラリーの100万個のコロニーをLB/Am pプレートに接種した。ナイロン膜フィルターを用いてこれらクローンをつり上げ、そしてこれらフィルターによって取り上げられたcDNAを変性し、UV光を用いてフィルターに架橋結合した。配列番号307のP711PcDNA断片を放射線標識し、これらフィルターのハイブリダイゼーションに用いた。陽性クローンを選択し、cDNAを調製、自動パーキンエルマー/アプライドバイオシステムズシーケンサーを用い配列決定した。決定されたP711Pの全長配列は配列番号382に、そして対応する推定アミノ酸配列は配列番号383に示されている。

40

【0480】

PCRおよびハイブリダイゼーションをベースとする方法を用いて、上記2クローン、即ち以後それぞれここではP707PおよびP714Pと称される11-C9および9-F3より追加のcDNA配列情報を得た(配列番号333および334)。最新のGenBankとの比較より、P707Pは既知遺伝子HoxB13のスプライス変異体であることが判明した。これに対しP714Pについては有意な相同性は認められなかった。配列番号334を標準的全長クローニング法に於けるプローブとして用いた別の研究から、P714Pに関する延長cDNA配列を得た。この配列は配列番号698に示されている。この配列はリボソームL23A蛋白質をコードする遺伝子にある程度の相同性を示すことが見いだされた。

50

【 0 4 8 1 】

クローン8-B3、P-89、P98、P130およびP201（1998年、2月9日出願、米国特許出願第09/020,956に開示される様）は、P705P（配列番号335で供給されるcDNA配列、対応する推定アミノ酸配列は配列番号336に示される）と呼ばれる1個の連続配列内に含まれていることが見いだされており、それは既知遺伝子NKX3.1のスプライス変異体であることが決定されている。続く研究は、P705Pについての補正されたcDNA配列の単離を導く。この配列のコード領域は配列番号948で提供される。

【 0 4 8 2 】

P775Pに関する更なる研究の結果、全てP775P遺伝子のスプライス変異体である4個の追加配列（配列番号473-476）が単離された。配列番号474の配列は2個のオ-ブンリーディングフレーム(ORF)を含むことが見いだされている。これらORFにコードされる推定アミノ酸配列は配列番号477および478に示されている。配列番号475のcDNA配列は配列番号479のアミノ酸配列をコードするORFを含むことが見いだされている。配列番号473のcDNA配列は4つのORFを含むことが見いだされている。これらORFによりコードされるcDNA配列は配列番号480-483に示されている。追加のP775Pのスプライス変異体は配列番号593-597に示されている。

【 0 4 8 3 】

続く研究よりキャッツアイ症候群領域として知られる染色体22q11.2上のゲノム領域が同定され、その領域は5個の前立腺遺伝子P704P、P712P、P774P、P775PおよびB305Dを含んでいた。このゲノム領域内にあるこれら5遺伝子の相対位置を図10に示す。従ってこの領域は悪性腫瘍と関連すると思われ、そしてその他潜在的腫瘍遺伝子がこの領域に含まれている可能性がある。これら研究はさらにP775P（配列番号533に示す）に関する、配列番号534のアミノ酸配列をコードしている潜在的オ-ブンリーディングフレーム(ORF)も同定した。

【 0 4 8 4 】

配列番号325のクローン（P558Sと呼ぶ）とGenBankおよびGeneSeqDNAデータベースとの比較からは、P558Sが、2つの形を持つことが知られている前立腺特異的トランスグルタミナーゼ遺伝子と同一であることが示された。この2つの形の完全長配列はそれぞれ配列番号773および774、対応するアミノ酸配列は配列番号775および776に示されている。配列番号774のcDNA配列は15対塩基のインサートを有しており、その結果対応するアミノ酸配列中に5アミノ酸の挿入が生じた（配列番号776）。この挿入は配列番号773の配列内には存在していない。

【 0 4 8 5 】

P768P（配列番号315）に関する更なる研究により、推定完全長オープンリーディングフレーム(ORF)が同定された。停止コドンを持つORFのcDNA配列は配列番号907に示されている。停止コドンを持たないORFのcDNA配列は配列番号908に示されており、対応するアミノ酸配列は配列番号909に示されている。この配列はラットカルシウム輸送蛋白質と80%の同一性を示し、P767Pがヒトカルシウム輸送蛋白質である可能性を示唆した。P768P内の膜貫通ドメインの位置は、PSORTIIコンピューターアルゴリズムを用い推測された。6個の膜貫通ドメインがアミノ酸位置118-134、172-188、211-227、230-246、282-298および348-364に推測された。配列番号910-915のアミノ酸配列はそれぞれP768Pのアミノ酸1-134、135-188、189-227、228-246、247-298および299-511を表している。

【 0 4 8 6 】

実施例 4 . ポリペプチドの合成

ポリペプチドはパーキンエルマー/アプライドバイオシステムズ430Aペプチド合成装置を用い、HPTU(0-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸)活性化を利用したFMOC化学を利用して合成される。ペプチドのアミノ末端には、固定面へ共役し、結合し、またはペプチド標識する方法を提供するためにGly-Cys-Gly配列を取り付けても良い。固相支持体からのペプチド切断は、次の切断混合液を利用し実施される：トリフルオロ酢酸：エタンジチオール：チオアニソール：水：フェノール（40:1

10

20

30

40

50

:2:2:3)。

【0487】

2時間切断した後、ペプチドは冷メチル-t-ブチル-エーテルで沈殿される。次にペプチド沈渣は0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含む水に溶解され、C18逆相HPLCで精製される前に凍結乾燥される。0%-60%(0.1%TFAを含む)のアセトニトリル勾配水溶液(0.1%TFAを含む)を用いペプチドを溶出する。精製分画を凍結乾燥した後、ペプチドはエレクトロスプレーまたはその他タイプのマススペクトロメトリーにより、およびアミノ酸分析により特性分析される。

【0488】

実施例5 . PCRベースサブトラクションを用いた前立腺特異ポリペプチドの更なる単離および特性分析

上記の様に前立腺原発性腫瘍mRNAより作成されたcDNAを、正常前立腺由来cDNAでサブトラクションした。サブトラクションは、より長い断片を生成するように改良されたPCRをベースとするプロトコール(クローンテック(Clontech))を用い実施された。

【0489】

このプロトコールでは、テスターおよびドライバーの2本鎖cDNAは別々に、6種類のヌクレオチド制限部位(MluI、MscI、PvuII、SalIおよびStuI)を認識する5種類の制限酵素で消化された。この消化では、クローンテックプロトコールのRsaI消化で生じる平均サイズ300bpではなく、平均サイズ600bpのcDNAが生じた。この改良はサブトラクション効率に影響しなかった。次に異なるアダプターを使って2種類のテスター集団が作成され、そしてドライバーライブラリーはアダプターなしの状態維持された。

【0490】

次にテスターおよびドライバーライブラリーは、過剰のドライバーcDNAを用いハイブリダイゼーションされた。第1ハイブリダイゼーション段階では、ドライバーは2種類のテスターcDNA集団それぞれに別々にハイブリダイゼーションされた。その結果、(a)ハイブリダイゼーションしていないテスターcDNA、(b)他のテスターcDNAとハイブリダイゼーションしたテスターcDNA、(c)ドライバーcDNAとハイブリダイゼーションしたテスターcDNA、および(d)ハイブリダイゼーションしなかったドライバーcDNAの集団が生じた。

【0491】

次に2つの別々のハイブリダイゼーション反応液をまとめ、追加の変性ドライバーcDNA存在下に再ハイブリダイゼーションを行った。この2回目のハイブリダイゼーション後に、(a)ないし(d)の集団に加え、あるアダプターを持つテスターcDNAで第2アダプターを持つテスターcDNAをハイブリダイゼーションした5番目の集団(e)が生成された。その結果第2ハイブリダイゼーション段階では、アダプター特異的プライマーを用いたPCR増幅に鋳型として利用できる差別的に発現された配列が濃縮された。

【0492】

末端部分を充足し、アダプター特異的プライマーを用いてPCR増幅を行った。ドライバーcDNAとハイブリダイゼーションしなかったテスターcDNAを含む集団(e)のみが対数的に増幅された。次に第2PCR増幅段階を実施し、バックグラウンドを下げ、さらに差別的に増幅された配列を濃縮した。

このPCRをベースとするサブトラクション技術は、差別的に発現したcDNAを正規化するため、前立腺腫瘍組織内で過剰発現されている稀な転写体を回収することができる。このような転写体は従来のサブトラクション法で回収することは困難であろう。

【0493】

前立腺腫瘍内で過剰発現されていることが既知の遺伝子に加え、77個のクローンがさらに同定された。これら部分cDNAの配列は配列番号29ないし305に示されている。これらクローンの大部分はデータベース配列と有意な相同性を示さなかった。例外はJPTPN23(配列番号231; プタバロシン含有蛋白質に類似)、JPTPN30(配列番号234; プロテオソームに関するラットmRNAに類似) JPTPN30(配列番号234; ラットノルベギカス(norvegicus)細胞質NADP-依存型イソシトレートデヒドロゲナーゼに類似)、JPTPN46(配列番号244;

10

20

30

40

50

ヒトサブクローンH8 4 d4 DNA配列に類似)、Jp1d6(配列番号265;G.gallusダイニン軽鎖-Aに類似)、JP8D6(配列番号288;ヒトBACクローンRG016J04に類似)、JP8F5(配列番号289;ヒトサブクローンH8 3 b5 DNA配列に類似)およびJP8E9(配列番号299;ヒトAlu配列に類似)であった。

【0494】

PCRをベースとした、正常前立腺プールに対し前立腺腫瘍プールをサブトラクションすること(PT-PN PCRサブトラクションと呼ぶ)を含むサブトラクションライブラリーを用いた追加研究から、さらに3個の追加クローンが得られた。これらクロンのcDNA配列と最新のGenBankとの比較からは、P715PおよびP767P(配列番号312および314)と称される2クローンについて、有意な相同性は示されなかった。

10

【0495】

マイクロアレイ分析を用い各種組織中のmRNA発現レベルを測定したところ、3クローン全てが前立腺腫瘍およびBPH組織内で過剰発現していることが見いだされた。具体的にはクローンP715Pは大部分の前立腺腫瘍およびBPH組織において3倍またはそれ以上過剰発現されており、また多くの正常前立腺サンプルおよび胎児組織でも発現増加が認められるが、その他全ての正常組織での発現は陰性または低かった。クローン767Pは複数の前立腺腫瘍およびBPH組織で過剰発現され、半数の正常前立腺サンプルでは軽度の発現レベルを示し、その他の試験した全正常組織ではバックグランドまたは低発現であった。

【0496】

上記マイクロアレイによる、PT-PN PCRサブトラクションライブラリーおよび正常組織cDNAのプールでサブトラクションされた前立腺腫瘍由来のcDNAを含むDNAサブトラクションライブラリーを更に分析した結果、前立腺腫瘍で過剰発現することが確定された27個のクローンがさらに単離された(配列番号340-365および381)。配列番号341、342、345、347、348、349、351、355-359、361、362および364のクローンは正常前立腺で発現していることが見いだされた。

20

【0497】

各種正常組織内では全26クローンとも発現が低いかまたは検出されないことが見いだされたが、P544S(配列番号336)は例外で、小腸にて発現していることが見いだされた。26クローンのうち11(配列番号340-349および362)はこれまでに同定されている配列にいくらか相同性を示すことが判明した。配列番号350、351、353-361および363-365のクローンについては有意な相同性は認められなかった。

30

【0498】

配列番号362とGenBankおよびGeneSeq DNAデータベースとの比較からは、このクローン(P788Pと称す)はGeneSeq登録番号X27262と同一で、GeneSeq登録番号Y00931に見いだされる蛋白質をコードしている。P788Pの完全長cDNA配列は図12A(配列番号777)に示されており、対応する推定アミノ酸は図12B(配列番号778)に示されている。続いて配列番号779の配列には認められない多形を含むP788Pの完全長cDNA配列を、3個人に由来する複数のRNA鋳型から調製したcDNAからPCR増幅し、複数回クローン化した。P788Pのこの多形について決定されたcDNA配列は配列番号779に示されており、対応するアミノ酸配列は配列番号780に示されている。配列番号780の配列は配列番号778の配列と6カ所のアミノ酸残基で異なっていた。P788P蛋白質は7個の潜在的膜貫通ドメインをC-末端部分に有しており、そして細胞外N-末端老域を持つ原形質膜蛋白質と推定されている。

40

【0499】

配列番号352のクローン(P790Pと称す)について更に研究したところ、配列番号526の完全長cDNA配列が単離された。対応する推定アミノ酸は配列番号527に示されている。2回の定量的PCR実験のデータよりP790Pが試験した前立腺腫瘍サンプル中11/15で過剰発現されていること、そして脊髄では発現が低レベルであること、ならびに試験したその他正常サンプルでは発現が見られないことが示された。さらなるPCR実験およびマイクロアレイ実験のデータは、正常前立腺および前立腺腫瘍では過剰発現していること、そしてその他試験した組織では発現がほとんどないか、または全くないことが示された。その後P790

50

Pは従来同定されているG-蛋白質結合前立腺組織受容体と有意な相同性を示すことが判明した。

【0500】

配列番号354のクローン(P776Pと称す)について更に研究したところ、配列番号569に示す延長cDNA配列が単離された。P776Pの3種類の追加スプライス変異体について決定されたcDNA配列を配列番号570-572に示す。配列番号570に含まれ2個の推定オープンリーディングフレーム(ORF)、配列番号571に推定ORFが含まれる1個の推定ORF、そして配列番号569内に含まれる11個の推定ORFによりコードされるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号573-586に示されている。更に研究したところ、配列番号570クローンに関する完全長配列(配列番号880に示される)が単離された。

10

【0501】

配列番号571のクローンについて完全長クローニングを試みた結果、2種類の配列(配列番号881および882に示す)が単離され、一方のクローンは位置1293にある多形の挿入/欠失以外は同一であった。具体的には、配列番号882のクローン(クローンF1と称す)は位置1293の位置にCを持つ。配列番号881のクローン(クローンF2と称す)は位置1293の位置に1塩基対の欠失を持つ。配列番号880内に位置する5個のオープンリーディングフレームによりコードされる推定アミノ酸配列は配列番号883-887に、そして配列番号881および882のクローンにコードされる推定アミノ酸配列は、配列番号888-893に示されている。

【0502】

クローンP767P(配列番号314)およびP777P(配列番号350)のcDNA配列とGenBankヒトESTデータベースとの比較より、2クローンが多くEST配列と共通して合致することが示され、P767PおよびP777Pが同一遺伝子であることが示唆された。P767P、P777Pおよび複数のESTクローンのDNA配列アラインメントより得たDNA配列を配列番号587に示す。配列番号587内に存在する3個の推定ORFによりコードされるアミノ酸配列は配列番号588-590に示す。

20

【0503】

配列番号342のクローン(P789Pと称す)はこれまでに同定された遺伝子と相同性を示すことが判明した。P789Pの完全長cDNA配列および対応するアミノ酸配列はそれぞれ配列番号735および736に示す。

配列番号355の配列(P780Pと称する)とGeneseq DNAデータベースにおける配列との比較は、P780PがGeneSeq受託番号Z29049及びZ29050(それぞれ、配列番号944および945)と100%配列同一性を共有することを示した。Z29049及びZ29050は、Z29049がZ29050に関して、714bpの欠失を含むことにおいてお互い異なる。従って、Z29049及びZ29050は、遺伝子P780Pの2種のいずれかのスプライス形を表すと思われる。Z29049は、379個の長さのアミノ酸であるタンパク質(GeneSeq受託番号Y15155;配列番号946)をコードする。Z29050は、617個の長さのアミノ酸であるタンパク質(GeneSeq受託番号Y15156;配列番号947)をコードする。それらの2種のタンパク質は同一である。但し、Y1515は、Y15156に関して、238個のアミノ酸欠失を含む。このアミノ酸欠失は、Z29049においては、714bpの欠失に対応する。

30

【0504】

実施例6. マウスのペプチドプライミングおよびCTL細胞株の継代

6.1 本実施例はP502S遺伝子を発現している細胞に特異的な細胞毒性Tリンパ球(CTL)細胞株の調製を例示する。

ヒトHLA A2Kb(Dr.L.Sherman, スクリプス(Scripps)研究所、ラジョラ(La Jolla)、カリフォルニア州(CA))に関するトランス遺伝子を発現しているマウスを、以下変更を加えTheobaldら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.92:11993-11997、1995記載の様にP502S遺伝子(ここではJ1-17とも称する、配列番号8)より得たP2S#12ペプチド(VLGWVAEL;配列番号306)で免疫した。

40

【0505】

マウスは100 μgのP2S#12および不完全フレンドアジュバント中に乳剤化されたB型肝炎

50

ウイルス蛋白質に由来する120 µgのI-A^b結合ペプチドで免疫された。3週後これらマウスを屠殺し、ナイロンメッシュを使って単細胞懸濁液を調製した。次に細胞を10%FSC、2mMグルタミン(ギブコ(Gibco) BRL、ガイザースブルグ(Gaitehrsbrug)、メリーランド(MD)、ピルビン酸ナトリウム(Gibco BRL)、非必須アミノ酸(Gbico BRL)、 2×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、50U/mlのペニシリンおよびストレプトマイシンを含む完全培地(RPMI-1640; ギブコ(Gibco) BRL、ガイザースブルグ(Gaitehrsbrug)、メリーランド(MD)中に 6×10^6 細胞/mlに懸濁し、放射線照射照射された(3000rads)、P2S#12でパルス(5mg/ml P2S#12および10mg/ml 2-ミクログロブリン)処理したLPSプラスト存在下に(7 µg/mlの硫酸デキストランおよび25 µg/mlのLPS存在下に3日間培養したA2トランスジェニック脾臓細胞)培養した。

10

【0506】

6日後、細胞(5×10^5 /ml)を 2.5×10^6 /mlのペプチドパルス処理した放射線照射(20,000rads) EL4A2Kb細胞(Shermanら、Science 258:815-818, 1992)および 3×10^6 /ml A2トランスジェニック脾臓細胞フィーダー細胞で再刺激した。細胞を20U/mlのIL-2存在下に培養した。細胞はさらに1週ベースで、細胞株クローニング調製について記載されている様にして再刺激された。

【0507】

P2S#12細胞株は、ペプチドパルスされたEL4A2Kb腫瘍細胞(1×10^4 細胞/ウエル)を刺激体として用い、そしてA2トランス遺伝子脾臓細胞をフィーダー細胞(5×10^5 細胞/ウエル)として14日間30U/mlのIL-2存在下に増殖される限界希釈分析によりクローン化され、細胞は以前同様に再刺激された。21日目に増殖したクローンを単離し、培養して維持した。これらクローンの幾つかがコントロールの繊維芽細胞に対するよりも、P502Sで形質転換されたヒト繊維芽細胞(HLA A2Kb発現)に対し有意に高い反応性(溶解)を示した。例を図1に示す。

20

このデータはP2S#12が、ヒトHLA A2Kb分子と関連して発現されるP502S蛋白質の自然処理型エピトープを表すことを示している。

【0508】

6.2 本実施例はマウスCTL細胞株の調製およびP501S遺伝子を発現している細胞に特異的なCTLクローンを例示する。

この一連の実験は、上記同様にして実施された。マウスをP501S遺伝子(ここではL1-12とも呼ばれる、配列番号110)より得たP1S#10ペプチド(配列番号337)で免疫した。P1S#10ペプチドは公開されているHLA-A2結合モチーフ(Parker、KCら、J. Immunol., 152:163, 1994)により定義された潜在的HLA-A2結合配列に関するP501Sの推定ポリペプチドの分析より得た。

30

【0509】

P1S#10ペプチドは実施例4記載の様に合成され、T細胞をベースとする競合アッセイを用いHLA-A2結合について経験的に試験された。推定A2結合ペプチドは、HLA-A2結合インフルエンザマトリックスペプチド、flum58に特異的であるHLA-A2拘束CTLクローン(D150M58)に対するHLA-A2特異ペプチド提示と競合する能力について試験された。

【0510】

競合アッセイでは、CTL上にHLA-A2を結合させるため、D150M58CTLの培養体に100-200 µg/mlの試験ペプチドが加えられた。30分後、標準的TNFバイオアッセイを用い、試験ペプチドまたはコントロールペプチドと共に培養したCTLを、それらの抗原がflum58ペプチドに対し反応するか試験した。図3に示す様に、ペプチドP1S#10はflum58のHLA-A2拘束提示を競合し、ペプチドP1S#10がHLA-A2に結合することを示した。

40

【0511】

ヒトHLA A2Kbに関するトランス遺伝子を発現しているマウスを、Theobaldら(Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92: 11993-11997, 1995)報告を以下の如く変更して用い免疫した。マウスを62.5 µgのP1S#10および不完全 Freund アジュバント中に乳剤化されたB型肝炎ウイルス蛋白質に由来する120 µgのI-A^b結合ペプチドで免疫した。3週後これらマウスを

50

屠殺し、ナイロンメッシュを用い単細胞懸濁液を調製した。

【0512】

次に細胞を完全培地（上記）中に 6×10^6 細胞/ml に懸濁し、放射線照射した（3000rads）P2S#12パルス処理済み（ $2 \mu\text{g/ml}$ P1S#10および 10mg/ml 2-ミクログロブリン）LPSプラスト（ $7 \mu\text{g/ml}$ の硫酸デキストランおよび $25 \mu\text{g/ml}$ のLPS存在下に3日間培養したA2トランスジェニック脾臓細胞）存在下に培養した。6日後、細胞（ $5 \times 10^5/\text{ml}$ ）を上記の $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ のペプチドパルス処理した放射線照射（20,000rads）EL4A2Kb細胞および $3 \times 10^6/\text{ml}$ A2トランスジェニック脾臓細胞フィーダー細胞で再刺激した。細胞を 20U/ml のIL-2存在下に培養した。細胞はさらに1週ベースで再刺激し、クローニングに備えた。インビトロ刺激を3回繰り返した後、図4に示す様にP1S#10パルス処理したJurkat A2Kb標的細胞およびP501S-形質転換Jurkat標的細胞を認識する1細胞株が生成された。

10

【0513】

P1S#10特異的CTL細胞株は、ペプチドパルスされたEL4A2Kb腫瘍細胞（ 1×10^4 細胞/ウエル）を刺激体として用い、A2トランスジェニック脾臓細胞をフィーダー細胞（ 5×10^5 細胞/ウエル）として14日間 30U/ml のIL-2存在下に増殖される限界希釈分析によりクローン化された。21日目に生存クローンが単離され、培養し維持された。図5に示す様に、これらクローンのうちの5クローンが、P501S形質転換Jurkat A2Kb標的細胞に対し特異的細胞溶解性活性を示した。このデータはP1S#10が、ヒトHLA-A2.1分子と関連して発現されるP501S蛋白質の自然処理エピトープを表すことを示している。

20

【0514】

実施例7. 前立腺抗原を有する裸DNA免疫を用いたインビボでのCTLプライミング

前立腺特異抗原L1-12は、上記の如くP501Sとも呼ばれる。HLA A2Kb Tgマウス（Dr. L. Sherman、スクリプス研究所、ラジョラ、カリフォルニア州提供）を $100 \mu\text{g}$ のベクターVR1012中P501Sを用いて筋肉内または経皮的に免疫した。マウスは3回、2週間隔免疫された。最終免疫から2週後、免疫脾臓細胞をJurkat A2Kb-P501S形質導入刺激細胞と共に培養した。インビトロ刺激2週後、CTL活性をP501S形質導入標的細胞に対し調べた。8匹のマウスの内2匹が強い抗P501SCTL反応を生じた。これらの結果は、P501Sが少なくとも1個自然処理されたHLA-A2拘束CTLエピトープを含むことを示している。

【0515】

続く実験においては、マウスを、上記のようなベクターVR1012におけるP501S、又は 1×10^8 pfu/動物でのP501S-アデノウイルス構造体のいずれかにより免疫化した。3週間後、動物は、追加免疫化を受け、そしてP501のみにより感作された動物を、P501Sのみ又はP501S-アデノウイルスのいずれかにより追加免疫化した。脾臓細胞を、免疫化の後、3及び6週で収穫し、そして照射されたJurkat A2Kb細胞と共に培養した（0日）。CTL活性を6日目にアッセイし、脾臓細胞を7日目に再刺激し、そして二次CTLアッセイを13日目に行なった。P501SのN-末端領域（配列番号113のアミノ酸36-325）及びP501Sの切断形（配列113のアミノ酸342-538）に対するIgG1及びIgG2a応答を、ELISAを用いてアッセイした。

30

【0516】

P501S-アデノウイルス構造体は、T細胞及び抗体応答の両者を誘発し、そしてP501SはCTL応答のみを誘発したが、しかし抗体応答を誘発しなかった。P501Sのみによる免疫化は、P501S-アデノウイルス追加免疫と組合して、最も効果的であることが見出された。P501Sのみによる免疫化は、ペプチド370（CLSHSVAV）に対して応答するT細胞を生成した。対照的に、P501S-アデノウイルスによる免疫化は、ペプチド370に対して弱い対応性を生成するか、又はまったくの反応性を生成しなかった。それらの研究は、DNA感作免疫化、続くアデノウイルス追加免疫化の組合せがCTL及び抗体応答の誘発のための有能なアプローチであり、そして異なったエピトープを認識する明確な細胞毒性T細胞が、アデノウイルスのみにより免疫化する場合よりも、P501S又はP501S+アデノウイルスにより免疫化する場合、誘発され得ることを示す。

40

【0517】

50

実施例 8 . 前立腺特異ポリペプチドを認識するヒトT細胞の能力

本実施例は前立腺腫瘍ペプチドに対し特異的なT細胞のヒト腫瘍認識能力を例示する。

ヒトCD8+T細胞をVan Tsaiら、(Critical Reviews in Immunology 18:65-75, 1998)に従って樹状細胞を用い、P502S (J1-17とも呼ばれる)由来のP2S-12ペプチド(配列番号306)に対しインビトロでプライムした。得られたCD8+T細胞の微量培養体を、 γ -インターフェロンELISPOTアッセイ(Lalvaniら、J.Exp.Med. 186:859-8657参照)を用い、自家繊維芽細胞またはP502S遺伝子を発現する様に形質導入された繊維芽細胞が提示するP2S-12ペプチドを認識するそれらの能力について試験した。

【0518】

簡単に述べると、T細胞の力価数を $3\mu\text{g/ml}$ のヒト α -2-ミクログロブリンおよび $1\mu\text{g/ml}$ のP2S-12ペプチドまたはコントロールのE75ペプチド存在下、 10^4 繊維芽細胞について二重アッセイした。さらにT細胞は同時にP502S遺伝子で形質導入された自家繊維芽細胞、またはコントロールとしてHER-2/neuで形質導入された繊維芽細胞についてもアッセイされた。アッセイ前、繊維芽細胞は 10ng/ml の γ -インターフェロンで48時間処理され、クラスIMHCの発現をアップレギュレーションした。微量培養体の一つ(#5)が、 γ -インターフェロンELISPOTアッセイでペプチドパルス処理した繊維芽細胞ならびに形質導入繊維芽細胞の両方に強い認識を示した。

10

【0519】

図2Aは、P2S-12ペプチドでパルス処理された繊維芽細胞上のT細胞数の増加に伴って、 γ -インターフェロンのスポット数も大きく増加するが(実線)、コントロールE75ペプチドでは増加しない(破線)ことを示す。これは、これらT細胞のP2S-12ペプチドを特異的に認識する能力を示している。

20

【0520】

図2Bに示す様にこの微量培養体も、P502S遺伝子を発現するがHER-2/neu遺伝子は発現しない様形質導入された繊維芽細胞上のT細胞が増加するのに伴って γ -インターフェロンスポット数が増加するが、ことを示した。これらの結果は、P2S-12ペプチドが自然処理されたP502S蛋白質エピトープであること証明する更なる証拠を提供している。さらに、このことはヒトT細胞レパートリーの中にこのエピトープを認識できる高親和性T細胞が存在することも示している。これらT細胞はP502S遺伝子を発現するヒト腫瘍を認識することもできる。

30

【0521】

実施例 9 . ヒト血液中での前立腺抗原特異的CTL反応の誘導及びCTLエピトープの同定

本実施例は、正常ヒトの血液における細胞毒性Tリンパ球(CTL)応答を誘発する前立腺-特異的抗原P501Sの能力を示し、そしてT細胞認識に対して応答する重要なエピトープを定義する。そのような情報はさらに、P501Sの免疫原性を確かめ、そして本明細書に記載される多くの例示的な免疫診断及び免疫療法態様のいずれかへのその使用を有効にする。

自家樹状細胞(DC)は、正常人ドナーのPBMCに由来する単球培養体より、10%ヒト血清、 50ng/ml のGMCSFおよび 30ng/ml のIL-4を含むRPMI培地中に5日間増殖させることで分化させた。培養後、一晚DCをM.O.I 5の組換え体P501S発現ワクシニアウイルスで感染させ、 $2\mu\text{g/ml}$ のCD40リガンドを加え8時間成熟させた。

40

【0522】

ウイルスをUV照射により不活性化し、CD8+細胞を磁性ビーズを用いポジティブ選別して単離し、24ウエルプレート内にて初代培養を開始した。レトロウイルスによりP501SおよびCD80を発現するよう形質導入された自己繊維芽細胞を使って5回刺激サイクルを実施した後、自己P501S形質導入繊維芽細胞で刺激したとき特異的にインターフェロンガンマを生ずるCD8+細胞株を同定した。

【0523】

細胞株3A-1のP501S特異活性は、P501Sで形質導入された自己B-LCLに追加の刺激サイクルを行うことで維持できるだろう。細胞傷害性アッセイ(^{51}Cr 放出)およびインターフェロンガンマ生産(Interferon gamma Elispot;上記およびLavaniら、J. Exp. Med. 186:85

50

9-865, 1997参照)より測定したところ、細胞株3A-1はP501Sを発現する様形質導入された自己B-LCLを特異的に認識するが、PGFP形質導入自己B-LCLは認識しないことが示された。これらアッセイの結果を図6Aおよび6Bに示す。

【0524】

男性において免疫応答を誘発する前立腺抗原P501Sの能力を次の通りに試験した。

樹状細胞(DC)を、Percolグラジエント、続く示差付着により単離し、そして1%ヒト血清、50ng/mlのGM-CSF及び30ng/mlのIL-4を含むRPMI培地の存在下で5日間、培養した。培養に続いて、DCを、10のMOIで、P501S-発現アデノウイルスにより24時間、感染し、そして2µg/mlのCD40リガンドの添加により、さらに24時間、成熟せしめた。CD8細胞を、磁気ビーズによるPBMCからのCD4⁺、CD14⁺及びCD16⁺集団のサブトラクションにより、正常雄ドナーのPBMCから富化した。ウェル当たり10,000のP501S-発現DC及び10,000のCD8⁺T細胞を含むプライミング培地を、10%ヒト血清、5ng/mlのIL-12及び10ng/mlのIL-6を含むRPMIを有する96-ウェルV-底プレートにおいて設定した。

【0525】

培養物を、レトロウイルスによりトランスダクションされた自己由来の線維芽細胞を用いて、7日ごとに刺激し、P501S及びCD80を発現し、そしてIFN- γ により48~72時間、処理し、MHCクラスI発現をアップレギュレートした。10µl/mlのIL-2を、刺激の時点で、及び刺激に続いて2及び5日目に添加した。4回の刺激サイクルに続いて、IFN- γ ElispotアッセイにおいてIFN- γ 処理されたP501S/CD80-発現自己由来線維芽細胞に应答するが、しかしIFN- γ 処理されたP703P/CD80-発現自己由来線維芽細胞に应答しないで、IFN- γ を生成する複数のP501S-特異的CD8⁺T細胞を同定した。1H1、2H2及び6H1と称する3種の最も有望な系を、75,000のPBMC/ウェル、10,000のB-LCL/ウェル、30ng/mlのOKT3及び50µg/mlのIL-2の存在下で、0.5細胞/ウェル又は2細胞/ウェルを有する96-ウェルプレートにおいてクローン化し、P501S-特異的クローンを単離した。

【0526】

P501S-特異的クローンのためのクラスI制限要素を同定するために、HLAブロッキング及びミスマッチ分析を、次の通りに行なった。IFN- γ Elispotアッセイにおいては、P501Sトランスダクションされた自己由来の線維芽細胞に対するクローンの特異的応答を、25µg/mlのW6/32(pan-クラスIブロッキング抗体)と共にブレインキュベートすることにより阻止し、そして6F1に関しては、BB7.2(HLA-A2ブロッキング抗体)と共に、及び2H2に関しては、B1.23.2(HLA-B/Cブロッキング抗体)と共にインキュベートすることにより阻止した。その結果は、クローンのP501S特異的応答がHLA-A2及び/又はHLA-B又はC対立遺伝子に制限されることを示した。HLAミスマッチ分析に関しては、自己由来の線維芽細胞(D310、HLA-A2、A3、B44、B51、Cw5、Cw14)、及びHLA-A-2及びHLA-B51対立遺伝子を共有する異種線維芽細胞を、P501Sによりトランスダクションし、そしてクローンを刺激するために使用した。IFN- γ Elispotアッセイにおいては、1H1及び2H2のみが自己由来の線維芽細胞を認識し、このことは、適切な対立遺伝子がB44、Cw5;又はCw14であることを示唆し(上記抗体ブロッキングアッセイと共に)、そして6F1はD310及びB326の両者を認識し、このことは、応答がHLA-A0201に制限されることを示唆する。

【0527】

上記制限データを確かめ、そして拡張するために、D310からの個々の対立遺伝子を、pBIB発現ベクター中にクローン化し、そして十分な長さのP501Sと共に、Cos-7細胞中に同時トランスフェクトした。1H1及び2H2クローンは、P501S及びCw0501対立遺伝子により同時トランスフェクトされたCos-7細胞を特異的に認識し、そして6F1クローンは、P501S及びHLA-A0201対立遺伝子により同時トランスフェクトされたCos-7細胞を認識した。それらの結果は、上記対立遺伝子が、上記CTLに対してのP501Sの提供を担当することを示す。

【0528】

CTLにより認識されるエピトープを含むP501Sのサブフラグメントを同定するために、P501Sの3'切断を、上記対立遺伝子と共に、Cos-7細胞中に同時トランスフェクトした。6

F1クローンは、P501Sオープンリーディングフレーム（ORF）の初めの354個のヌクレオチドに由来するエピトープを認識することが見出され、2H2クローン（2H2 - 1A12とも称する）はP501S（配列番号113）のアミノ酸471 - 553間に見出されるP501Sの配列由来のエピトープを認識し、そして1H1クローン（1H1 - 1A6とも称する）は、P501S（配列番号113）のアミノ酸278 - 353間に見出されるP501Sの配列由来のエピトープを認識した。

【0529】

それらのCTLにより認識される最小エピトープを同定するために、それぞれ11又は15個のアミノ酸によりオーバーラップする15又は19 - マーペプチドを合成し、自己由来のB - LCLに対してパルスし、そして - IFN ELISPOTアッセイにおいてCTLのための細胞を提供する抗原として使用した。1H1 - 1A6に関しては、配列番号113のアミノ酸246 - 325を拡張する4種の15 - 21マーのプールを、CTLにより特異的に認識した。プール分解においては、ペプチド291（アミノ酸291 - 310；配列番号9B3、配列番号972で提供されるcDNA配列）を、1H1 - 1A6 CTLにより特異的に認識した。次にP501Sのアミノ酸291 - 310からの10 - マーペプチドを合成し、そして上記のようにして試験した。ペプチド291、292及び293（それぞれ配列番号924、982及び980；それぞれ配列番号975、976及び973で提供されるcDNA配列）を、CTLにより特異的に認識した。

10

【0530】

それらの結果は、3種の10 - マーペプチドの個々がCTLにより認識される最小エピトープを含むことを示す。配列TDFVGEGL（配列番号981）を有する、3種の10 - マーに共通する8 - マーペプチドを合成し、そして試験した。ペプチド滴定アッセイにおいては、このエピトープに対して特異的なCD8⁺ T細胞を、1 - 10 µg/mlによりパルスされたAPCを認識した。この8 - マーはまた、CTLにより効果的に認識され、このことは、CTLにより認識される最小の天然においてプロセッシングされたペプチドエピトープが配列番号981に及ぶことを示す。さらなる分析は、クローン1H1 - 1A6についての最小エピトープがYTDFVGEGL（P501のアミノ酸292 - 300）であり、そのアミノ酸及びDNA配列は、それぞれ配列番号1021及び1022で開示されることを示した。ペプチド滴定アッセイは、このエピトープに対して特異的なCD8⁺ T細胞が0.0016 µg/mlの9 - マーによりパルスされたAPCを認識したことを示した。従って、P501に対して特異的な最小CD8⁺ T細胞エピトープは、YTDFVGEGL（配列番号1022）である。

20

【0531】

2H1 - 1A12に関しては、アミノ酸462 - 553に及ぶ20個の15 - マーのプールを、自己由来のB - LCL上にパルスし、そして上記のようにして試験した。ペプチド462及び465（それぞれ配列番号979及び977；それぞれ配列番号971及び969で提供されるcDNA配列）を、CTLにより両者とも特異的に認識した。それらの結果は、2種の15 - マーペプチドの個々がCTLにより認識される最小エピトープを含むことを示す。単一のアミノ酸によりオーバーラップする10 - マーペプチドを、2種の上記ペプチドに共通する配列から合成し、そして上記のようにして試験した。主に、ペプチド464（アミノ酸464 - 474；配列番号978；配列番号970で供給されるcDNA配列）及びまた、ペプチド463（アミノ酸463 - 472）及び465（アミノ酸465 - 475）をCTLにより特異的に認識した。それらの結果は、配列番号978の配列（P501Sのアミノ酸464 - 474）が、2H2 - 1A12CTLにより認識される最小エピトープを含むことを示唆する。さらなる分析は、クローン2H2 - 1A12のための最小クローンがACDVSVRVV（P501Sのアミノ酸465 - 473）であり、そのアミノ酸及びDNA配列がそれぞれ、配列番号1012及び1013で開示されることを示した。ペプチド463及び465の認識は、ペプチド464によるそれらのペプチドの汚染、又はCTLによるそれらのペプチドの追加の二次及び無効化の認識に影響を及ぼす。

30

40

【0532】

従って、この例は、P501SがヒトCTL応答を誘発することができ、そしてこの前立腺 - 特異的抗原のT - 細胞認識を担当する複数のCTLエピトープを同定することを確立する。さらに、そのような情報は、免疫診断及び免疫治療用途への使用のための重要な標的物としてP501Sを確認する。

50

【 0 5 3 3 】

実施例10 . 前立腺特異抗原P703P内に含まれる自然処理CTLエピーブの同定

9merのペプチドP5(配列番号338)はP703P抗原(P20とも呼ばれる)より得た。p5ペプチドはヒトHLA-A2ドナー中の免疫源であり、自然処理されたエピーブである。抗原特異的CD8+T細胞は、p5ペプチドでパルス処理された単球を用いインビトロ刺激を反復することでプライムできる。これらCTLはELISPOT(上記)およびクロム放出アッセイに於いて、p5-パルス処理された標的細胞、およびP703P形質導入された標的細胞を特異的に認識する。さらに、p5を使ったHLA-A2Kbトランスジェニックマウスの免疫化によりHLA-A2KbまたはHLA-A2が形質導入されたP703Pを発現する各種標的細胞を認識するCTL細胞株が生成された。

10

【 0 5 3 4 】

p5が自然処理されたエピーブであることを示した最初の研究は、HLA-A2Kbトランスジェニックマウスを用いて行われた。HLA-A2Kbトランスジェニックマウスは、140 μ gのB型肝炎ウイルスコアペプチド(Thペプチド)のフレンド不完全アジュバント液と共に100 μ gのp5ペプチドで足蹠に皮下免疫された。免疫後3週目に免疫マウスの脾臓細胞をペプチドパルス処理したLPL芽細胞でインビトロ刺激した。CTL活性は、最初のインビトロ刺激後5日目にクロム放出アッセイにより調べた。レトロウイルスで形質導入された、コントロール抗原P703PおよびHLA-A2bを発現する細胞を標的として用いた。p5-パルス処理された標的細胞およびP703Pを発現する標的細胞の両方を特異的に認識するCTL細胞株が同定された。

20

【 0 5 3 5 】

ヒトでのインビトロプライミング実験は、p5ペプチドがヒトに於いて免疫原性であることを示した。樹状細胞(DC)は正常人ドナーのPBMCより、5日間10%ヒト血清、50ng/mlのヒトGM-CSFおよび30ng/mlのヒトIL-4を含むRPMI培地中で培養することで分化させた。培養後、DCを1 μ g/mlのp5ペプチドでパルス処理し、CD8+T細胞リッチPBMCと共培養した。CTL細胞株はp5-パルス処理した単球を用い週ベースで刺激された。CTL培養開始5ないし6週後に、p5-パルス処理標的細胞のCTL認識が示された。CTLはさらにP703Pを発現するよう形質導入されたヒト細胞を認識することが示され、p5が自然処理されたエピーブであることが示された。

30

【 0 5 3 6 】

さらにHLAクラスII分子と関連して細胞表面上にてCD4T細胞により認識される前立腺腫瘍特異的抗原P703P由来ペプチドエピーブ(ペプチド4と呼ぶ)を同定する研究を次の様にして行った。ペプチド4のアミノ酸配列は配列番号781に示されており、対応するcDNA配列は配列番号782に示されている。

【 0 5 3 7 】

10アミノ酸づつ重複する、P703Pのカルボキシ末端に由来する12種類の15-merペプチドが標準的手順により作製された。樹状細胞(DC)はGM-CSFおよびIL-4を用い、標準的プロトコールにより正常女性ドナーのPBMCと共培養より得た。CD4T細胞は同ドナーより、MACSビーズとネガティブ選別法を用いDCとして生成された。DCは一晚、それぞれペプチド最終濃度が0.25 μ g/mlである15-merのペプチドのプールでパルス処理された。パルス処理されたDCは洗浄され、 1×10^4 細胞/ウエルの割合で96-ウエル型V-底プレートに接種され、精製CD4T細胞を 1×10^5 /ウエルで加えられた。

40

【 0 5 3 8 】

培養体には60ng/mlのIL-6および10ng/mlのIL-12が添加され、37 $^{\circ}$ にてインキュベーションされた。培養体は生成されたDCを用いて上記同様週ベースに再刺激され、上記同様抗原提示細胞でパルス処理され、5ng/mlのIL-7および10u/mlのIL-2が補給された。4回インビトロ刺激サイクルを行った後、96細胞株(1ウエルに各細胞株に対応する)をコントロールとして用いられる乳グロビン由来の無関係なペプチドのプールを使ったプール刺激に対する特異的増殖およびサイトカイン産生について試験した。

【 0 5 3 9 】

50

P703Pペプチドのプール#1に反応して、特異的増殖（3H増殖アッセイにより測定した）およびサイトカイン産生（インターフェロンガンマELISAアッセイにより測定された）を示した細胞株1株（1-F9と呼ぶ）が同定された。この細胞株はさらに、ペプチドプールの特異認識、プール中の個別ペプチドの特異認識、および関連拘束アリルを同定するためのHLAミスマッチ分析について試験された。

【0540】

細胞株1-F9は、ペプチドプール#1および同様にペプチド4（配列番号781）に反応し特異的に増殖し、そしてインターフェロンガンマを生産することが見出された。ペプチド4は配列番号327のアミノ酸126-140に対応する。ペプチド力価実験を行い、特異的ペプチドに対する細胞株1-F9の感受性について調べた。この細胞株はペプチド4と0.25ng/ml程度の低濃度で特異的に反応することが見出され、T細胞が非常に感受性であり、従ってこのエピトープに対し高い親和性を持つと思われることを示した。

10

【0541】

P703P反応のHLA拘束を決定するために、T細胞の作製に使用したドナーと一部一致する抗原提示細胞(APC)のパネルを作った。APCはペプチドでパルスされ、細胞株1-F9と共に増殖およびサイトカインアッセイに使用された。HLA-DRB0701およびHLA-DQB02アリルがドナーと一致するAPCはT細胞にペプチドを提示することができ、P703P-特異的反応がこれらアリルの一つに拘束されていることが示唆された。

【0542】

抗体ブロッキングアッセイを使って、拘束アリルがHLA-DR0701またはHLA-DQ02であるか決定した。抗HLA-DRブロッキング抗体L243または無関係なイソ型が一致するIgG2aを、250ng/mlのペプチドRMPTVLQCVNVSVS（配列番号781）でパルス処理したT細胞およびAPC培養体に加えた。標準的なインターフェロンガンマおよび増殖アッセイを行った。コントロール抗体はT細胞のペプチドパルス処理APCの認識能力に影響を及ぼさなかったが、いずれのアッセイでも抗HLA-DR抗体はT細胞のペプチドパルス処理APCを特異的に認識する能力を完全に遮断した。

20

【0543】

ペプチドエピトープRMPTVLQCVNVSVS（配列番号781）が自然処理されるか決定するために、組換え体P703P蛋白質でパルス処理されたAPCを認識する1-F9細胞株の能力について検討した。これら実験には複数の組換え体P703P源が用いられた；大腸菌由来P703P、酵母（*Pichia*）由来P703Pおよびバキュロウイルス由来P703Pである。使用した無関係な蛋白質コントロールは大腸菌由来のL3E、肺特異的抗原およびバキュロウイルス由来乳グロビンである。

30

【0544】

インターフェロンガンマELISAアッセイでは、細胞株1-F9は大腸菌型P703Pおよび酵母由来組換え体P703Pの両方を効率的に認識できたが、バキュロウイルス由来P703Pは効果的には認識されなかった。その後のウエスタンブロット分析では、大腸菌および酵母P703P蛋白質標本は無傷であったが、バキュロウイルスP703P標本はおよそ75%が分解していた。即ちP703P由来ペプチドRMPTVLQCVNVSVS（配列番号781）はP703P由来の自然処理された得ペプチドエピトープであり、HLA-DRB-0701に関連してT細胞に提示される。

40

【0545】

さらなる研究では、10アミノ酸づつ重複する、P703PN-末端由来の12種類の15-merペプチド（配列番号525のアミノ酸27-154に相当する）が標準的手順により作製され、そして本質的には上記同様にしてCD4細胞により認識されるそれらの能力が決定された。DCは一晚、各ペプチドの最終濃度が0.25 µg/mlである15-merのペプチドのプールでパルス処理された。多くの個別CD4T細胞株（65/480）が、P703Pペプチドプールに反応して有意な増殖およびサイトカイン放出（IFN-ガンマ）を示したが、コントロールペプチドプールに対してはこれらを示さなかった。特異活性を示したCD4T細胞株は適当なP703Pペプチドプールで再刺激され、各プールの個別ペプチドについて再アッセイされ、そしてIFN-放出アッセイおよび増殖アッセイにてペプチドプールのペプチド投与量力価がアッセイされた。

50

【0546】

16種類の免疫源ペプチドが試験したペプチド抗原の全セットから得たT細胞により認識された。これらペプチドのアミノ酸配列は配列番号799-814に示されており、対応するcDNA配列は配列番号783-798にそれぞれ示されている。幾つかの例では、T細胞株のペプチド反応性は単一ペプチドにマッピングされたが、幾つかは各プール中のなかの1より多いペプチドにマッピングされた。

【0547】

これらペプチドに対し合理的な親和性を持つ各ペプチドプールから、代表的な認識パターンを示したCD4T細胞株を選びだし更に解析した(I-1A、-6A; II-4C、-5E; III-6E、IV-4B、-3F、-9B、-10F、V-5B-4Dおよび-10F)。これらCD4T細胞株は適当な個別ペプチドで再刺激され、大腸菌で作製された組換え体P703P蛋白質の切断型(配列番号525のアミノ酸96-254)、バキュロウイルス発現システムで作製された完全長P703P、および大腸菌で作製されたインフルエンザウイルスNS1およびP703Pの融合体によりパルス処理された自己DCを用い再アッセイされた。

10

【0548】

試験したT細胞株のうち、細胞株I-1Aは切断型P703P(大腸菌)を特異的に認識したが、他のP703Pの組換え体は認識しなかった。この細胞株はT細胞惹起に用いたペプチドも認識した。細胞株2-4Cは、P703P(大腸菌)切断型およびバキュロウイルスで作製されたP703Pの完全長型、ならびにペプチドを認識した。試験したT細胞株の残りは、ペプチドにのみ特異的であるか(II-5E、II-6F、IV-4B、IV-3F、IV-9B、IV-10F、V-5BおよびV-4D)または試験したいずれの抗原にも非反応性であった(V-10F)。

20

【0549】

これら結果は、T細胞株I-1Aに認識されるペプチド配列RPLLANDLMLIKLDE(配列番号814、即ち配列番号525のアミノ酸110-124に相当)およびT細胞株II-4Cにより認識されるペプチド配列SVSESdTIRSISIAS(配列番号811;配列番号525のアミノ酸125-139に相当)およびISIASQCPTAGNSCL(配列番号810;配列番号525のアミノ酸135-149に相当)がP703蛋白質の自然処理エピトープであることを示している。

【0550】

更なる研究において、10アミノ酸によりオーバーラップし、そしてP703P(配列番号:525)のアミノ酸47~254を含む領域に由来する15-マーペプチド45個を、標準的手法により生じさせ、そしてCD4細胞により認識されるそれらの能力を実質的に上記のようにして決定した。以前の実験において使用されたのとは異なるHLA DR及びDQ対立遺伝子を有する提供者のPBMCからDCが調製された。DCをペプチドのプールにより一晚パルスした。この場合、各ペプチドの最終濃度は0.25 µg/mLであり、各プールは10ペプチドを含有した。

30

【0551】

刺激性ペプチドプールに応答して特異的増殖及びサイトカイン生産(γ-インターフェロンELISAアッセイにより測定された)を示す12の細胞系を同定した。これらの細胞系は更に、ペプチドプールの特異的認識、プール中の個々のペプチドの特異的認識、及び組換えP703Pタンパク質の特異的認識について試験された。細胞系3A5H及び3A9Hが、組換えタンパク質及び一つの個別のペプチド並びにペプチドプールに応答して、特異的に増殖し、そしてγ-インターフェロンを生産した。

40

【0552】

特定のペプチドにより負荷された標的に対する再刺激の後、3A9Hのみが全長P703Pを発現するアデノウイルスに感染した線維芽細胞の細胞溶解物に暴露された標的に特異的に応答した。これらの結果が示すところによれば、細胞系3A9Hは哺乳類細胞において合成されたタンパク質に由来する抗原ペプチドに応答することが出来る。特異的CD4細胞系がそれに対して応答したペプチドは、P703P(配列番号:943)のアミノ酸155-170に対応する。このペプチドのDNA配列を配列番号:942に示す。

【0553】

実施例11. 前立腺における乳癌由来抗原の発現

50

示差表示法による乳癌からの抗原B305Dの単離は、1996年8月20日出願の米国特許出願第08/700,014号に記載されている。本抗原の複数の異なるスプライス型が単離されている。これらスプライス型について決定されたcDNA配列は、配列番号366-375に示されており、配列番号292、298および301-303の配列に対応する推定アミノ酸配列はそれぞれ配列番号299-306に示されている。

【0554】

さらなる研究で、位置884にグアニンの付加残基を含み、オープンリーディングフレーム内にフレームシフトを生じせしめることが分かっている配列番号366のcDNA配列のスプライス変異体（配列番号530）が単離された。このOFRについて決定されたDNA配列は配列番号531に示されている。このフレームシフトにより、B305Dの他イソ型に共通したC-末端ドメインを含むが、N-末端領域が異なる蛋白質配列（配列番号532に示されている）が生じる。

10

【0555】

各種腫瘍および正常組織中のB305Dの発現レベルは、リアルタイムPCRおよびノーザン分析により検討された。結果は、B305Dが乳癌、前立腺癌、正常前立腺および正常精巣で高く発現されており、検討したその他組織（結腸癌、肺癌、卵巣癌および正常骨髄、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、皮膚、小腸、胃）ではその発現は低いかまたは検出されないことを示した。前立腺腫瘍パネルについてリアルタイムPCRを用いたところ、前立腺腫瘍でのB305Dの発現はグレアソン等級の上昇に伴って増加することが示され、前立腺癌が進行するとB305Dの発現が増加することが示された。

20

【0556】

実施例12. 全遺伝子プライミングおよび前立腺特異抗原P501Sによる刺激を用いたインビトロでのヒトCTLの生成

P501Sワクシニア感染DCによるインビトロ全遺伝子プライミング（例えばYeeら、The Journal of Immunology, 157(9):4079-86, 1996参照）を利用して、上記インターフェロンELISPOT分析により決定した時に、P501S(L1-12としても知られる）で形質導入された自己繊維芽細胞を特異的に認識するヒトCTL細胞株が誘導された。P501Sで形質導入されたHLA A-ミスマッチB-LCL細胞株のパネルを用いて、これらCTL細胞株がHLA BクラスIIアリルに拘束されると示された。

30

【0557】

具体的には、樹状細胞（DC）は正常人ドナーのPBMCに由来する単球培養体より、10%ヒト血清、50ng/mlのヒトGM-CSFおよび30ng/mlのヒトIL-4を含むRPMI培地中に5日間増殖させることで分化させた。培養後DC細胞を一晩感染多重度（M.O.I）5の組換え体P501Sワクシニアウイルスで感染させ、3μg/mlのCD40リガンドを加え一晩成熟させた。ウイルスをUV照射により不活性化された。CD8+T細胞は磁性ビーズシステムを用い単離され、標準的培養技術を用いて初代培養が開始された。

【0558】

培養体をレトロウイルスによりP501SおよびCD80が形質導入された自己初代繊維芽細胞を使って7-10日ごとに再刺激した。4回の再刺激サイクル後、自己P501SおよびCD80-形質導入された自己の繊維芽細胞で刺激したとき特異的にインターフェロンガンマを生ずるCD8+T細胞株を同定した。反応の拘束アリルを基底するために、P501Sで形質導入されたHLA A-ミスマッチB-LCL細胞株のパネルが作られた。ELISPOTアッセイによりインターフェロン-γを測定し、P501S特異反応がHLA Bアリルにより拘束されるらしいことが示された。これらアッセイの結果は、P501Sに対するCD8+CTLが惹起可能なことを示している。

40

【0559】

認識されるエピトープを同定するために、P501SをコードするcDNAを様々な制限消化して断片にし、レトロウイルス発現ベクターであるpBIB-KSにサブクローニングした。レトロウイルス上清は、ヘルパーパッケージング細胞株Phenix-Amphoのトランスフェクションにより作製された。次に上清を用い、CTLスクリーニング用にJurkat/A2Kb細胞を形質導入した。CTLはIFN-γ ELISPOTアッセイで、P501S断片の「ライブラリー」で形質導入さ

50

れたこれらA2Kb標的についてスクリーニングされた。

【0560】

最初の陽性断片P501S/H3およびP501S/F2が配列決定され、それらがそれぞれ配列番号113のアミノ酸106-553およびアミノ酸136-547をコードしていることが見出された。配列番号113のアミノ酸106-351をコードする様にH3の切断が行われたが、これはCTLを刺激できななかつたことからエピトープはアミノ酸残基351-547にあるとされた。アミノ酸1-472(断片A)およびアミノ酸1-351(断片B)をコードする別の断片も作られた。断片Bだけでなく、断片AもまたCTLを刺激したことから、エピトープはアミノ酸残基351-472にあることが判明した。

【0561】

この領域を表す重複する20-merおよび18-merのペプチドについて、Jurkat/A2Kb細胞をパルス処理しIFN-ガンマアッセイでCTLについて試験した。ペプチドP501S-369(20)とP501S-369(18)のみがCTLを促進した。この領域を表す9-merおよび10-merのペプチドを合成して、同様に試験した。ペプチドP501S-370(配列番号539)が強い反応を示す最小の9-merであった。ペプチドP501S-376(配列番号540)も弱い反応を示したことから、これが交叉反応エピトープであることが示唆された。

【0562】

続く研究では、P501Sで形質導入された初代ヒトB細胞の、MHCクラスI拘束、P501S特異的、自己CD8T細胞をプライムする能力が検討された。初代B細胞はCD40リガンドおよびIL-4存在下に培養し、組換え体P501SのベクターpBIBで高頻度に形質導入され、そしてプラストジジン-Sで選別されることによりホモ接合体HLA-A2ドナーのPBMCより得た。インビトロプライミングを行う場合には、精製CD8+T細胞を自己由来CD40リガンド+IL-4で誘導したP501S-形質導入B細胞と96ウエル微量培養形式で共培養した。

【0563】

これらCTL微量培養体はP501S-形質導入B細胞で再刺激されてから、特異性についてアッセイされた。この最初のスクリーニングの後、バックグランドより高い有意なシグナルを示した微量培養体を自己由来EBV-形質導入B細胞(BLCL)にクローン化し、さらにP501Sで形質導入した。検出にはIFN-ガンマELISPOTを用い、これらCD8T細胞クローンの幾つかがP501Sに対し特異的であることが見出され、BLCL/P501Sには反応するがコントロール抗原で形質導入されたBLCLには反応しないことが示された。

【0564】

さらに抗P501S CD8T細胞特異性はHLA-A2拘束性であることが示された。第1に抗HLA-A-A、B、Cモノクローナル抗体(W6.32)、抗-HLA-B、Cモノクローナル抗体(B1.23.2)およびコントロールモノクローナル抗体を用いた抗体遮断実験は、抗HLA-A、B、C抗体のみがP501S発現自己由来BLCLの認識を遮断することを示した。第2に、抗P501SCTLはまたHLA-A2が一致した、P501Sで形質導入された異種BLCLを認識したが、対応するEGFPで形質導入されたコントロールBLCLは認識しなかった。

【0565】

自然に処理されたP501SのCD8、クラスI拘束ペプチドエピトープは次の様にして同定された。樹状細胞(DC)はパーコル(Percol)勾配で単離された後、差別的接着にかけられてから1%ヒト血清、50ng/ml GM-CSFおよび30ng/mlのIL-4を含むRPMI培地存在下に5日間培養された。培養後、2μg/mlのCD40リガンドを加えて更に24時間DCを培養した。CD8細胞はPBMCよりCD4+細胞、CD14+およびCD16+集団を磁性ビーズを使ってサブトラクションすることで濃縮された。

【0566】

ウエル当たり10,000個のP501S発現DCと100,000個のCD8+細胞を含むプライミング培養体を、10%ヒト血清、5ng/ml IL-12および10ng/ml IL-6を含むRPMIの入った96ウエル型V底プレートに準備した。培養体は7日ごとに、レトロウイルスによりP501SとCD80を発現するよう形質導入された自己由来繊維芽細胞で刺激され、48-72時間INF-ガンマにより処理されてMHCクラスIの発現をアップレギュレーションした。刺激時および刺激後2と5日目に

10

20

30

40

50

10u/mlのIL-2が加えられた。

【0567】

刺激サイクル4回後、 γ -IFN Elispotアッセイに於いて、IFNガンマ処理された、P501S/CD80を発現する自己由来繊維芽細胞に反応しIFN-ガンマを産生するが、IFN-ガンマ-処理したP703P/CD80発現自己由来繊維芽細胞との反応ではこれを産生しない1株のP501S特異的CD8+T細胞株(2A2と呼ぶ)が同定された。細胞株2A2は75,000PBMC/ウエル、10,000B-LCL/ウエル、30ng/mlOKT3および50u/ml IL-2存在下に0.5細胞/ウエルまたは2細胞/ウエルの割合で96ウエルプレートにクローン化された。形質導入繊維芽細胞に対する反応に強いP501S特異性を示した12クローンが単離された。

【0568】

蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)分析を、それぞれPercP、FITCおよびPEで標識されたCD3⁻、CD4⁺およびCD8⁻特異的抗体を行いてP501S特異クローンについて行った。プライミング培養体中での富CD8T細胞の使用に一致し、P5401S-特異的クローンがCD3⁺、CD8⁺およびCD4⁻であることが決定された。

【0569】

P501S特異的CTLにより認識される関連P501Sエピトープを同定するために、P501Sのアミノ酸配列の大部分をカバーする18-20merまたは30merペプチドのプールを自己由来B-LCLに負荷し、 γ -IFN Elispotアッセイにより、4E5および4E7と呼ばれる2種類のP501S特異的CTLクローンを刺激する能力について試験した。P501S(配列番号113)のアミノ酸411-486をカバーする5種類の18-20merのペプチドからなる1つのプールは、両P501S-特異的クローンにより認識されることが見出た。

【0570】

これらクローンに認識される特異的18-20merペプチドを同定するために、2種類のP501S-特異的CTLクローン、4E5および4E7を刺激する能力について、陽性プールを構成する各18-20merペプチドを γ -IFN Elispotアッセイで個別に試験した。4E5および4E7はいずれもP501Sのアミノ酸453-472に広がる1つの20mer-ペプチド(配列番号853;配列番号854に示されたcDNA配列)を特異的に認識した。

【0571】

CD8+T細胞により認識される最小エピトープは多くの場合9または10-merペプチド配列であることから、配列番号853の全配列をカバーする、1アミノ酸づつ異なる10-merペプチドを合成した。これら10-merペプチドのそれぞれについて、2種類のP501S-特異クローン(1D5および1E12と呼ぶ)を刺激する能力を試験した。P501S-特異クローンを特異的に刺激する1個の10-merペプチド(配列番号855;配列番号856に示したcDNA配列)。このエピトープはP501Sのアミノ酸463-472をカバーしている。この配列は自然の処理が可能であり、そして正常PBMCに於いてCTL反応が同定できるP501S由来の最小の10-merエピトープを規定している。即ち、このエピトープが前立腺癌のワクチン成分として、および治療薬および/または診断薬としての使用に適した候補である。

【0572】

配列番号855のP501S-由来配列に関するクラスI拘束要素を同定するために、HLA遮断分析およびミスマッチ分析を行った。 γ -IFN Elispotアッセイでは、P501S形質導入自己由来繊維芽細胞に対するクローン4A7および4E5の特異反応は25ug/mlのW6/32(汎クラスI遮断抗体)およびB1.23.2(HLA-B/C遮断抗体)との前インキュベーションにより遮断された。これらの結果は、配列番号855特異的反応がHLA-BまたはHLA-Cアレルにより拘束されていることを示す。

【0573】

HLAミスマッチ分析では、HLA-B*51が共通である自己由来B-LCL(HLA-A1、A2、B8、B51、Cw1、Cw7)および異種B-LCL(HLA-A2、A3、B18、B51、Cw5、Cw14)を1時間、20ug/mlの配列番号855のペプチドでパルスし、洗浄後 γ -IFN Elispotアッセイを用いクローン4A7および4E5刺激能について試験された。B1.23.2(HLA-B/C遮断抗体)を使った抗体遮断アッセイも行われた。配列番号855-特異反応は自己由来(D326)および異種(D107)B-LCLの両方を使

10

20

30

40

50

って検出され、さらにこの反応は25ug/mlのB1.23.2HLA-B/C遮断抗体との前インキュベーションにより遮断された。これらの結果は、配列番号855のペプチドに対するP501S特異反応はHLA-B51クラスIアリルに拘束されることを示している。D3326からのHLA-B51アリルの分子クローニングおよび配列分析は、D326のHLA-B51サブタイプがHLA-B51011であることを示している。

【0574】

配列番号855の10-merのP501S由来エピトープに基づき、配列番号857および858の配列を持った2種類の9-merを合成し、Elispotアッセイを用いて細胞株2A2由来の2種類のP501S-特異的CTLクローンに対する刺激能について試験した。配列番号855の10-merペプチドならびに配列番号858の9-merペプチドはP501S特異的CTLを刺激して、IFN-ガンマを産生できたが、配列番号857の9-merペプチドは刺激できなかった。これらの結果は、配列番号858のペプチドがP501S-特異的CTLにより認識される9-merのP501S由来エピトープであることを示している。配列番号858のエピトープをコードするDNA配列は配列番号859にしめされている。

10

【0575】

配列番号855および858特異反応のP501S由来ペプチドに関するクラスI拘束アリルを同定するために、HLA BおよびCアリルのそれぞれをインビトロプライミング実験で用いたドナーからクローン化した。配列分析は、関連するアリルがHLA-B8、HLA-B51、HLA-Cw01およびHLA-Cw07であることを示した。これらアリルのそれぞれを発現ベクター内にサブクローニングし、P501S遺伝子と共にBA-13細胞内にコトランスフェクションした。次にトランスフェクションされたVA-13細胞を、ELISPOTアッセイを持ちいP501S特異的CTLの特異的刺激能力について試験した。

20

【0576】

P501SおよびHLA-B51がトランスフェクションされたVA-13細胞はP501S特異的CTLを刺激して、IFNを分泌させることができた。HLA-B51のみ、またはP501S+その他HLAアリルがトランスフェクションされたVA-13細胞は、P501S特異的CTLを刺激できなかった。これらの結果は、P501S-特異的反応に関する拘束アリルがHLA-B51アリルであることを示している。配列分析は、関連する拘束アリルのサブタイプがHLA-B51011であることを示した。

【0577】

P501S-特異的CTLがP501Sを発現している前立腺腫瘍細胞を認識できるかを決定するために、P501S陽性細胞株LnCAPおよびCRL2422（共にP501SmRNAおよび蛋白質を“中程度”の量発現している）、ならびにPC-3（P501SmRNAと蛋白質を低量発現している）、さらにP501S-陰性細胞株DU-145を、レトロウイルスを使ってP501S特異的CTLを生成するのに使用したドナーよりクローン化されたHLA-B51011アリルで形質導入した。HLA-B51011-またはEGFP-形質導入され、選択された腫瘍細胞をガンマイインターフェロンおよびアンドロゲン（それぞれ刺激機能およびP501Sをアップレギュレーションする）で処理し、P501S-特異的CTLクローンの4E5および4E7と共にガンマイインターフェロンElispotアッセイに用いた。

30

【0578】

4E5および4E7は共にHLA-B51011アリルが形質導入されたLnCAPおよびCRL2422細胞を効率的かつ特異的に認識したが、EGFPが形質導入された同一細胞株は認識しなかった。さらに両CTLクローンはHLA-B51011が形質導入されたPC-3細胞を特異的に認識したが、P501S-陰性腫瘍細胞株であるDU-145は認識しなかった。ガンマイインターフェロンまたはアンドロゲンによる処理はCTLの腫瘍細胞認識能を高めなかった。これらの結果は、インビトロにて全遺伝子をプライミングして作製されたP501S-特異的CTLがP501Sを発現する前立腺腫瘍細胞株を特異的かつ効率的に認識することを示している。

40

【0579】

P501Sの自然処理されたCD4エピトープは次の様にして同定された。

P501Sに特異的なCD4細胞を上記同様に調製した。P501S遺伝子のアミノ末端部分の約50%に広がる（配列番号113のアミノ酸1-325）16種類の重複ペプチドのシリーズを合成した。プライミングに備え、ペプチドを4種類のペプチドプールにまとめ、TNF-アルファと共に

50

4 $\mu\text{g/ml}$ で樹状細胞 (DC)を24時間パルスした。つぎにDCを洗浄し、ネガティブ選別したCD4+T細胞を96ウェルU底プレート中に混合した。

【0580】

培養体を新しいDC上で、ペプチドプールを加えて毎週刺激した。合計4回刺激サイクルを行った後に、細胞をさらに1週間休息させてから、 γ -IFN ELISAおよび増殖アッセイを用いて、ペプチドプールを使ってパルスされたAPCに対する特異性を試験した。これらアッセイでは、4 $\mu\text{g/ml}$ の関連ペプチドプールまたは $\mu\text{g/ml}$ の無関係ペプチドの何れかが負荷された接着単球がAPCとして用いられた。次に特異的サイトカイン分泌または増殖を示したT細胞株について、プール中に存在する個別のペプチドについての認識を試験した。プールAおよびBより、これらプール由来の個別ペプチドを認識するT細胞株が同定できた。

10

【0581】

プールAからは、細胞株AD9およびAE10がペプチド1 (配列番号862)を特異的に認識し、細胞株AF5がペプチド39 (配列番号861)を認識した。プールBでは、ペプチド58 (配列番号860)を認識する細胞株BC6が同定できた。これら細胞株のそれぞれが特異ペプチドにより刺激され、力価アッセイおよびHEK293細胞にP501Sまたは無関係抗原を発現するアデノウイルスを感染させ生成した細胞溶解物を用いて、ペプチドの特異認識について試験された。

【0582】

これらアッセイでは、APC接着単球は 10^6 、1または0.1 $\mu\text{g/ml}$ の個別P501Sペプチドでパルス処理され、そしてDCは一晚1:5に希釈されたアデノウイルス感染細胞溶解物でパルス処理された。細胞株AD9、AE10およびAF5は0.1 mg/ml の濃度でも関連するP501S由来ペプチドを有意に認識した。さらに細胞株AD9は、アデノウイルスP501S感染細胞由来の溶解物に対しても有意 (8.1倍の刺激指数) 特異活性を示した。これらの結果は、抗親和性CD4T細胞株がP501S由来エピトープに対し生成できること、および少なくとも配列番号862のP501S由来配列に特異的なこれらT細胞のサブセットが、ヒト細胞により自然に処理されるエピトープに対し特異的であることを示している。配列番号860-862のアミノ酸配列をコードするDNA配列はそれぞれ配列番号863-865に示されている。

20

【0583】

AD9のP501S特異的活性をさらに特性分析するために、この細胞株を抗CD3を使ってクローン化した。P501S-1ペプチド (配列番号862)に特異的な1A1、1A9および1F5と呼ばれる3種類のクローンが同定された。P501S-1特異反応に関するHLA拘束アレルを決定するために、これらクローンそれぞれについて増殖およびガンマインターフェロンアッセイを利用したクラスII抗体遮断アッセイおよびHLAミスマッチアッセイを使い試験した。

30

【0584】

抗体遮断アッセイおよびELISAアッセイを利用したガンマインターフェロン産生測定では、3クローン全てのペプチドパルスAPC認識能力が、汎クラスII遮断抗体またはHLA-DR遮断抗体との共インキュベーションにより特異的に遮断されたが、HLA-DQまたは無関係な抗体によっては遮断されなかった。同一細胞を用い同時に実施された増殖アッセイもこの結果を確認した。これらデータは、クローンのP501S特異反応がHLA-DRアレルにより拘束されていることを示す。別の研究はP501S-特異反応に関する拘束アレルがHLA-DRB1501であることを示した。

40

【0585】

実施例13. マイクロアレイ分析による前立腺特異的抗原の同定

この実施例では、特定の前立腺特異的ポリペプチド類の、前立腺腫瘍cDNAライブラリーからの分離について述べる。

上記のヒト前立腺腫瘍cDNA発現ライブラリーを、マイクロアレイ分析を利用し選抜して、前立腺腫瘍および/または正常前立腺の組織において、前立腺以外の正常組織 (精巣を除く)と比較して少なくとも3倍の過剰発現を示すクローンを同定した。372のクローンを同定し、そして319のクローンの配列決定に成功した。

【0586】

50

表IIはこれらクローンの要約を示し、これらのクローンは配列番号：385～400に示してある。これら配列のうち、配列番号：386, 389, 390および392は新規な遺伝子であり、そして配列番号：393と396は、以前に同定された配列である。その外の配列（配列番号：385, 387, 388, 391, 394, 395および397～400）は表IIに示すように既知の配列である。

【 0 5 8 7 】

【 表 2 】

表 II

前立腺腫瘍抗原の要約

既知の遺伝子	以前に同定された遺伝子	新規遺伝子
T細胞の γ 鎖	P504S	23379 (配列番号：389)
カリクレイン	P1000C	23399 (配列番号：392)
ベクター	P501S	23320 (配列番号：386)
CGI-82 タンパク質 mRNA (23319 ; 配列番号：385)	P503S	23381 (配列番号：390)
PSA	P510S	
Ald. 6 Dehyd.	P784P	
Ｌ－イジトール－２デヒドロゲナーゼ (23376 ; 配列番号：388)	P502S	
Ets 転写因子 PDEF (22672 ; 配列番号：398)	P706P	
hTGR (22678 ; 配列番号：399)	19142. 2, bangur. seq (22621 ; 配列番号：396)	
KIAA0295 (22685 ; 配列番号：400)	5566. 1 Wang (23404 ; 配列番号：393)	
前立腺酸性ホスファターゼ (22655 ; 配列番号：397)	P712P	
トランスグルタミナーゼ (22611 ; 配列番号：395)	P778P	
HDLBP (23508 ; 配列番号：394)		
CGI-69 タンパク質 (23367 ; 配列番号：387)		
KIAA0122 (23383 ; 配列番号：391)		
TEEG		

10

20

30

40

【 0 5 8 8 】

50

続く研究は、配列番号329 (P554Sとも称する) のクローンのための拡張されたcDNA配列の単離を誘導した。この拡張された配列は、配列番号967で提供され、そしてその対応するアミノ酸配列は、配列番号968で提供される。

【0589】

CGI-82は、前立腺組織内で、試験を行った他の正常組織と比べて4.06倍の過剰発現を示した。CGI-82は、前立腺腫瘍の43%および正常前立腺の25%で過剰発現を行い、試験を行った他の正常組織には検出されなかった。L-イジトール-2-デヒドロゲナーゼは、前立腺組織中で、試験を行った他の正常組織と比べて4.94倍の過剰発現を示した。L-イジトール-2-デヒドロゲナーゼは、前立腺腫瘍の90%で過剰発現し、正常前立腺の100%で過剰発現し、試験を行った他の正常組織中には検出されなかった。Ets転写因子PDEFは

10

【0590】

Ets転写因子PDEPは、前立腺腫瘍の47%で過剰発現し、正常前立腺の25%で過剰発現し、そして試験を行った他の正常組織中には検出されなかった。hTGR1は、前立腺組織中で、試験を行った他の正常組織と比べ9.11倍の過剰発現を示した。hTGR1は、前立腺腫瘍の63%で過剰発現し、正常前立腺を含む試験を行った正常組織には検出されなかった。KIAA0295は、前立腺組織中で、他の被検正常組織と比べて5.59倍の過剰発現を示した。KIAA0295は、前立腺腫瘍の47%で過剰発現し、正常前立腺組織を含む被検正常組織中では発現が低く検出できなかった。前立腺酸性ホスファターゼは、前立腺組織中で、他の被検正常組織と比べて9.14倍の過剰発現を示した。

20

【0591】

前立腺酸性ホスファターゼは、前立腺腫瘍の67%で過剰発現し、正常前立腺の50%で過剰発現し、そして他の被検正常組織中には検出されなかった。トランスグルタミナーゼは、前立腺組織中で、他の被検正常組織と比べて14.84倍の過剰発現を示した。トランスグルタミナーゼは、前立腺腫瘍の30%の過剰発現し、正常前立腺の50%で過剰発現し、そして他の被検正常組織中には検出されなかった。高密度リポタンパク質結合タンパク質 (HDLBP) は、前立腺組織内で、他の被検正常組織と比べて28.06倍の過剰発現を示した。

【0592】

HDLBPは、前立腺腫瘍の97%で過剰発現し、正常前立腺の75%で過剰発現し、そして、他のすべての被検正常細胞には検出できなかった。CGI-69は、前立腺組織内で、他の被検正常組織と比べて3.56倍の過剰発現を示した。CGI-69は低存在度 (low abundant) 遺伝子であり、前立腺腫瘍の90%及び正常前立腺組織の75%に検出される。この遺伝子の正常組織内での発現は非常に低かった。KIAA0122は、前立腺組織内で、他の被検正常組織に比べて4.24倍の過剰発現を示した。KIAA0122は、前立腺腫瘍の57%で過剰発現し、そして正常前立腺組織を含むすべての正常組織中には検出できなかった。

30

【0593】

19142.2 bangurは、前立腺組織内で、他の被検正常組織と比べて23.25倍の過剰発現を示した。19142.2 bangurは、前立腺腫瘍の97%および正常前立腺の100%で過剰発現した。19142.2 bangurは、他の被検正常組織では検出できなかった。5566.1 Wangは、前立腺組織内で、他の被検正常組織と比べて3.31倍の過剰発現を示した。5566.1 Wangは、前立腺腫瘍の97%及び正常前立腺の75%で過剰発現し、そして正常な骨髄、脾臓および活性化PBMC内でも過剰発現した。新規のクローン23379 (P553Sとも呼称する) は前立腺組織中で、他の被検正常組織と比べて、4.86倍の過剰発現を示した。

40

【0594】

クローン23379は、前立腺腫瘍の97%及び正常前立腺の75%で検出できたが、他のすべての被検正常組織内では検出できない。新規のクローン23399は、前立腺組織内で、他の被検正常組織と比べて4.09倍の過剰発現を示した。クローン23399は、前立腺腫瘍の27%で過剰発現し、正常な前立腺組織を含むすべての被検正常組織内に検出できなかった。新規なクローン23320は、前立腺組織内で他の被検正常組織と比べて3.15倍の過剰発現を示した。クローン23320は、すべての前立腺腫瘍におよび正常前立腺組織の50%に検出でき

50

た。またクローン23320は、正常な結腸および気管内でも発現した。他の正常細胞は、この遺伝子を、高レベルでは発現しない。

【0595】

標準の方法を利用して続いて行ったP553Sに関する完全長クローン化試験によって、このクローンが、不完全なスプライスされた形態のP501Sであることが明らかになった。P553Sの四つのスプライス変異体の決定されたcDNA配列は、配列番号：702～705に示してある。配列番号：705がコードするアミノ酸配列は、配列番号：706に示してある。配列番号：702のcDNA配列は、二つのオープンリーディングフレーム（ORF）を含有していることが分かった。これら二つのORFがコードするアミノ酸配列は配列番号：707と708に示してある。

【0596】

実施例14．電子サブトラクション法（electronic subtraction）による前立腺特異的抗原の同定

この実施例では、電子サブトラクション法を使用して行う前立腺特異的抗原の同定について説明する。

GenBankのヒトESTデータベース中の潜在前立腺特異的遺伝子（potential prostate-specific gene）を、電子サブトラクション法（Vasmatzisら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 95 : 300-304, 1998に記載されているのと類似の方法）で同定した。各種の前立腺ライブラリーから誘導したESTクローン（43, 482）の配列を、GenBankのパブリックヒトESTデータベースから得た。各前立腺EST配列を、ヒトESTデータベースに対するBLASTN（National Center for Biotechnology Information）サーチの際の質問配列（query sequence）として使用した。

【0597】

同一とみなされたすべてのマッチ（match）（マッチング配列の長さ>100塩基対、この領域の同一マッチの密度>70%）を、一つのクラスターにまとめた（並べた）。200以上のESTを含有するクラスターは、恐らく、反復要素またはリボソームタンパク質の遺伝子のような高度に発現される遺伝子であるから廃棄した。二つ以上のクラスターがコモunkラスターを共有する場合、それらのクラスターを「スーパークラスター」にまとめて、4,345の前立腺スーパークラスターを得た。

【0598】

GenBank release中の479のヒトcDNAライブラリーの記録を、ダウンロードして、これらcDNAライブラリーの記録のデータベースをつくった。これら479のcDNAライブラリーを、次の三つのグループにまとめた。すなわち、プラスグループ（発現が望ましい正常な前立腺と前立腺腫瘍のライブラリーおよび乳房（breast）細胞系ライブラリー）、マイナスグループ（発現が望ましくない他の正常成人の組織からのライブラリー）、ならびにその他のグループ（発現が関連性がない（irrelevant）と考えられる、胎児組織、乳児組織、女性にのみ見られる組織、前立腺以外の腫瘍および前立腺細胞系以外の細胞系からのライブラリー）である。これらライブラリーのグループの要約を表IIIに示す。

【0599】

10

20

30

【表 3】

表Ⅲ

前立腺 cDNA のライブラリーと EST

ライブラリー	ライブラリーの数	EST の数
プラスグループ	25	43,482
正常	11	18,875
腫瘍	11	21,769
細胞系	3	2,838
マイナスグループ	166	
その他のグループ	287	

10

20

【0600】

各スーパークラスターを、そのスーパークラスター内のESTについて分析した。各ESTクロンの組織源に注目し利用してスーパークラスターを次の四グループに分類した。すなわちタイプ1 - 前記プラスグループのライブラリーのみで見られるESTクロンであって、前記マイナスまたはその他のグループのライブラリーには発現が検出されないESTクロン；タイプ2 - 前記プラスおよびその他のグループのライブラリーのみから誘導されるESTクロンであって、前記マイナスグループでは発現が検出されないESTクロン；タイプ3 - 前記プラス、マイナスおよびその他のグループのライブラリーから誘導されるESTクロンであって、前記プラスグループから誘導されるESTの数が前記マイナスまたはその他のグループより高いESTクロン；ならびにタイプ4 - 前記プラス、マイナスおよびその他のグループのライブラリーから誘導されるESTクロンであって、前記プラスグループから誘導される数が、前記マイナスグループから誘導される数より高いESTクロンである。この分析によって、4,345の乳房のクラスターが同定された（表IV参照）。これらのクラスターから、3,172のESTクロンを、Research Genetics, Inc.に発注し、そして96ウェルプレートの冷凍グリセリンストックとして受け取った。

30

【0601】

【表4】

表IV
前立腺クラスターの要約

タイプ	スーパークラスターの数	発生した EST の数
1	688	677
2	2899	2484
3	85	11
4	673	0
合計	4345	3172

10

20

【0602】

ESTクローンの挿入断片を、Synteniマイクロアレイ分析用のアミノ連結PCRプライマーを使用してPCR増幅した。2以上のPCR産物を特定のクローンについて得たとき、そのPCR産物は発現分析に使用しなかった。電子サブトラクション法由来の合計2,528のクローンを、マイクロアレイ分析で分析して、腫瘍組織mRNA対正常組織mRNAのレベルが高い電子サブトラクションのプレストクローンを同定した。

【0603】

このようなスクリーンは、Synteni（米国カリフォルニア州パロ・アルト）のマイクロアレイを使用し、生産者の指示にしたがい、そして事実上、Schenら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 93 : 10614-10619, 1996およびHellerらProc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 94 : 2150-2155, 1997に記載されているようにして実施した。これらの分析において前記クローンをチップ上に配列し、次にそのチップを、正常前立腺と腫瘍前立腺のcDNAおよび各種の他の正常組織からつくった蛍光プローブでプローブした。そのスライドガラスを走査してその蛍光強度を測定した。

30

【0604】

発現比が3より大きいクローン（すなわち、前立腺腫瘍と正常前立腺のmRNAのレベルが他の正常組織mRNAのレベルの少なくとも3倍であるクローン）を、前立腺腫瘍特異的配列として同定した（表V）。これらクローンの配列は配列番号：401～453に示してあり、特定の新規な配列は、配列番号：407, 413, 416～419, 422, 426, 427および450に示してある。

40

【0605】

【表 5】

表 V
前立腺腫瘍特異的クローン

配列番号	配列の呼称	コメント
401	22545	以前に同定された P1000C
402	22547	以前に同定された P704P
403	22548	既知
404	22550	既知
405	22551	PSA
406	22552	前立腺分泌タンパク質 94
407	22553	新規
408	22558	以前に同定された P509S
409	22562	腺カリクレイン
410	22565	以前に同定された P1000C
411	22567	PAP
412	22568	B1006C (乳房腫瘍抗原)
413	22570	新規
414	22571	PSA
415	22572	以前に同定された P706P
416	22573	新規
417	22574	新規
418	22575	新規
419	22580	新規
420	22581	PAP
421	22582	前立腺分泌タンパク質 94
422	22583	新規
423	22584	前立腺分泌タンパク質 94
424	22585	前立腺分泌タンパク質 94
425	22586	既知
426	22587	新規
427	22588	新規
428	22589	PAP
429	22590	既知
430	22591	PSA
431	22592	既知

10

20

30

40

【 0 6 0 6 】

【表 6】

表 V 続き

配列番号	配列の呼称	コメント
432	22593	以前に同定された P777P
433	22594	T細胞受容体のガンマ鎖
434	22595	以前に同定された P705P
435	22596	以前に同定された P707P
436	22847	PAP
437	22848	既知
438	22849	前立腺分泌タンパク質 57
439	22851	PAP
440	22852	PAP
441	22853	PAP
442	22854	以前に同定された P509S
443	22855	以前に同定された P705P
444	22856	以前に同定された P774P
445	22857	PSA
446	23601	以前に同定された P777P
447	23602	PSA
448	23605	PSA
449	23606	PSA
450	23612	新規
451	23614	PSA
452	23618	以前に同定された P1000C
453	23622	以前に同定された P705P

10

20

30

【0607】

配列番号：407 (P1020Cとも呼称される) のクローンについてさらに研究して、配列番号：591に示した伸長 (extended) cDNA配列を単離した。この伸長cDNA配列は、配列番号：592の予測アミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレームを含有することが分かった。P1020C cDNAおよびアミノ酸配列は、ヒト内因性レトロウイルスHERV-Kポル遺伝子およびタンパク質といくらか類似性を示すことが分かった。

【0608】

実施例15. 前立腺特異的抗原の、マイクロアレイ分析によるさらなる同定

この実施例では、追加の前立腺特異的ポリペプチドの、前立腺腫瘍cDNAライブラリーからの単離について述べる。

上記のようなヒト前立腺腫瘍cDNA発現ライブラリーを、マイクロアレイ分析法を使用し選抜して、前立腺腫瘍組織および/または正常前立腺組織内で、前立腺以外の正常組織 (精巣を含まない) と比べて少なくとも3倍の過剰発現を示すクローンを同定した。142のクローンを同定して配列を決定した。これらクローンのうち特定のクローンを配列番号：454~467に示してある。これらの配列のうち、配列番号：459~460は新規の遺伝子である。その他の配列 (配列番号：454~458と461~467) は既知の配列である。

【0609】

40

50

決定されたcDNA配列の配列番号：461は、BLASTプログラムを使ってGenbankデータベースの配列と比較した結果、以前に同定された膜貫通プロテアーゼセリン2（TMPRSS2）と相同性であることが明らかになった。このクローンの完全長cDNA配列は配列番号：894に示してあり、対応するアミノ配列は配列番号：895に示してある。TMPRSS2の第一の209のアミノ酸をコードするcDNA配列は配列番号：896に示し、第一の209のアミノ酸は配列番号：897に示してある。

【0610】

配列番号：462の配列（P835Pと称される）は、関連するオープンリーディングフレーム（ORF）をもっていない以前に同定されたクローンFLJ13518（受託番号AK023643；配列番号：917）であることが分かった。このクローンを使用してGeneseq DNAデータベースをサーチして、七つの膜貫通ドメインが存在することを特徴とするGタンパク質共役型受容体タンパク質（DNA Geneseq受託番号A09351；アミノ酸Geneseq受託番号Y92365）として以前に同定されたクローンと一致した。これらドメイン間のフラグメントの配列は配列番号：921～928に示してあり、そして配列番号921，923，925および927は細胞外ドメインを表し、配列番号922，924，926および928は細胞内ドメインを表す。

10

【0611】

配列番号：921～928は、それぞれ、P835Pのアミノ酸1～28，53～61，83～103，124～143，165～201，226～238，263～272および297～381を示す。P835Pの完全長cDNAの配列は配列番号：916に示してある。ストップコドンを含む、P835PのオープンリーディングフレームのcDNA配列を配列番号918に示し、そしてストップコドンなしのオープンリーディングフレームを配列番号：919に示し、そして対応するアミノ酸配列を配列番号：920に示してある。

20

【0612】

実施例16．前立腺特異的抗原P710Pのさらなる特性決定

この実施例では、P710Pの完全長クローニングについて述べる。

上記前立腺cDNAライブラリーを上記P710Pフラグメントでスクリーニングした。100万個のコロニーを、LB/アンピシリンプレート上に平板培養した。ナイロン膜フィルターを使用してこれらのコロニーを持ち上げ、次いでこれらフィルターでピックアップされたcDNAを、UV光で変性して、該フィルターに架橋させた。そのP710Pフラグメントを放射能で標識し、そのフラグメントを使用して該フィルターとハイブリッドを形成させた。

30

【0613】

正のcDNAクローン（positive cDNA clone）を選択し、それらcDNAを回収し次いで自動Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Sequencerによって配列を決定した。四種の配列が得られ、配列番号：468～471に示してある。これらの配列は、P710P遺伝子の異なるスプライス変異体のようである。続いて、P710PのcDNA配列を、Genbankの配列と比較したところ、DD3遺伝子（Genbank受託番号AF103907およびAF103908）と相同であることが明らかになった。DD3のcDNAの配列は配列番号：690に示してある。

【0614】

実施例17．前立腺特異的抗原のタンパク質発現

本実施例は、E.coli、バキュロウイルス及び哺乳動物の細胞内での前立腺特異的抗原の発現及び精製を記載する。

40

a) E.coli内でのP501Sの発現

PS501Sの全長の発現を、pET17b内のM. tuberculosis抗原Ra12の最初の30アミノ酸（配列番号484）から下流にリーダー配列をもたないP501S（配列番号113のアミノ酸36～553）をまずクローニングすることにより達成した。特に、P501S DNAを、プライマーAW025（配列番号485）とAW003（配列番号486）を用いてPCRを行うために使用した。AW025は、HindIII部位を含むセンス・クローニング・プライマーである。AW003は、EcoRI部位を含むアンチセンス・クローニング・プライマーである。

【0615】

DNA増幅を、5 μl 10×Pfuバッファー、1 μl 20mM dNTPs、10 μm濃度における1 μlの

50

各PCRプライマー、40 µl水、1 µl Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene, La Jolle, CA) 、及び100ng/µlにおける1 µl DNAを用いて行った。95 における変性を30秒間、その後、10サイクルの95 30秒間、60 1分間、及び72 3分間を行い、20サイクルの95 30秒間、65 1分間、及び72 3分間、そして最後に、1サイクルの72 10分間を行った。このPCR産物を、HindIIIとEcoRIを用いてRa12m/p ET17bにクローニングした。(Ra12-P501S-Fという)得られた融合構築物の配列をDNAシーケンシングにより確認した。

【0616】

この融合構築物をBL21 (DE3) pLysE/pLysS 及びCodonPlus E.coli (Stratagene) 内に形質転換させ、そしてカナマイシンを含むLBプロス中で一夜培養した。得られたカルチャーをIPTGにより誘導した。タンパク質をPVDF膜に転写し、(PBS-Tweenバッファー中) 5 %非脂肪ミルクでブロックし、そして3回洗浄し、そして1時間マウス抗-Hisタグ抗体 (Clontech) とともにインキュベートした。この膜を、3回洗浄し、そして30分間HRP-プロテイン A (Zymed) でプローブした。最後に、この膜を3回洗浄し、そしてECL (Amersham) で発色させた。発現は、Western プロットにより検出されなかった。同様に、Ra12-P501S-F融合がCE6 フェージ (Invitrogen) によるBL21 CodonPlus内での発現のために使用されたとき、Western プロットにより発現は検出されなかった。

10

【0617】

P501SのN-末端断片 (配列番号113のアミノ酸36-325) を、以下のように、PET17b内にM. tuberculosis抗原Ra12の最初の30アミノ酸の下流にクローン化した。P501S DNAを使用して、プライマーAW025 (配列番号485) とAW027 (配列番号487) を使用したPCRを行った。AW027 は、EcoRI部位と終止コドンを含むアンチセンス・クローニング・プライマーである。DNA増幅を本質的に先に記載したように行った。得られたPCR産物を、HindIII部位とEcoRI部位においてpET17b内のRa12にクローニングした。(Ra12-P501S-Nという)融合構築物を、DNAシーケンシングにより確認した。

20

【0618】

本質的に先に記載したように、上記Ra12-P501S-N融合構築物を、BL21(DE3)pLysE, LysS、及びCodonPlus内での発現のために使用した。Western プロット分析を使用して、36kDaの予想分子量においてタンパク質バンドを観察した。おそらく上記組換えタンパク質の凝集に因り、いくつかの高分子量のバンドも観察された。CE6フェージによるBL21 CodonPlus内での発現のためにRa12-P501S-F融合物を使用したとき、Westernプロットにより発現は検出されなかった。

30

【0619】

M. tuberculosis抗原Ra12の最初の30アミノ酸 (配列番号484) の下流によるP501SのC-末端部分 (配列番号113のアミノ酸257~553) を含む融合構築物を、以下のように調製した。P501S DNAを使用して、プライマーAW026 (配列番号488) とAW003 (配列番号486) を使用したPCRを行った。AW026は、HindIII部位を含むセンス・クローニング・プライマーである。本質的に先に記載したようにDNA増幅を行った。得られたPCR産物を、HindIII部位とEcoRI部位においてpET17b内のRa12にクローン化した。(Ra12-p501S-Cという)融合構築物のための配列を確認した。

40

【0620】

先に記載したように、上記Ra12-P501S-C融合構築物を、BL21(DE3)pLysE、pLysS、及びCodonPlus内での発現のために使用した。少量のタンパク質がWesternプロットにより検出され、いくつかの分子量も観察された。CE6フェージにより誘導されるBL21 CodonPlus内での発現のために上記Ra12-P501S-C融合物を使用したとき、Westernプロットによっても発現が検出された。

【0621】

M. tuberculosis抗原Ra12の下流にあるP501Sの断片 (配列番号113のアミノ酸36~298) を含む融合構築物 (配列番号848) を、以下のように調製した。P501S DNAを使用して、プライマーAW042 (配列番号849) とAW053 (配列番号850) を用いたPCRを行った。AW042は、EcoRI部位を含むセンス・クローニング・プライマーである。AW053は、終止部位とXho

50

I部位をもつアンチセンス・プライマーである。DNA増幅を、先に記載したように行った。得られたPCR産物を、EcoRI部位とXhoI部位においてpET17b内のRa12にクローン化した。(Ra12-P501S-E2といわれる)得られた融合構築物を、室温で2時間TB培地中B834(DE3)pLysS E.coli宿主細胞内で発現させた。

【0622】

発現されたタンパク質を、封入体を洗浄することにより精製し、そしてNi-NTAカラム上を流した。この精製されたタンパク質は、20mM Tris-HCl (pH8), 100mM NaCl, 10mM -M e、及び5%グリセロールを含有するバッファー中に可溶のままであった。上記の発現された融合タンパク質に関する決定されたcDNA配列とアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号851と852に提供する。

【0623】

b) バキュロウイルス内でのP501Sの発現

昆虫細胞内でP501Sタンパク質を発現させるために、Bac-to-Bacバキュロウイルス発現系(BRL Life Technologies, Inc.)を使用した。全長P501S(配列番号113)を、PCRにより増幅し、そしてドナー・プラスミドpFastBacIのXbaI部位内にクローン化した。組換えbacmidとバキュロウイルスを、製造者の指示に従って調製した。この組換えバキュロウイルスをsf9細胞内で増幅させ、そして高力価のウイルス保存株を、High Five細胞(Invitrogen)を感染させて組換えタンパク質を製造するために使用した。全長タンパク質の同定を、上記組換えタンパク質のN-末端シークエンシングにより、そしてWesternブロット分析により確認した(図7)。

【0624】

特に、6ウェル・プレート内で60万個のHigh Five細胞を、未処理対照ウイルスBV/ECD-PD(レーン2)か又は異なる量又はMOIsにおけるP501Sのための組換えバキュロウイルスで感染させ(レーン4-8)、あるいは感染させなかった(レーン3)。細胞溶解産物を還元条件下でSDS-PAGE上で造らせ、そして(以下に記載するように調製した)抗-P501Sモノクローナル抗体P501S-10E3-G4D3によるWesternブロットにより分析した。レーン1は、ビオチン化されたタンパク質量マーカー(BioLabs)である。

【0625】

昆虫細胞内での組換えP501Sの局在化を以下のようにして調べた。P501Sを過剰発現する昆虫細胞を、核、ミトコンドリア、膜、サイトゾルの画分に分画した。各画分からの等量のタンパク質を、P501Sに対するモノクローナル抗体によるウェスタン・ブロットにより分析した。分画のスキームに因り、核画分とミトコンドリア画分の両者が、いくつかの血漿膜成分を含有する。しかしながら、上記膜画分は、ミトコンドリアと核を基本的に含有しない。P501Sは、上記膜成分を含有する全ての画分中に存在することが判った。これは、P501Sが、上記組換えタンパク質を発現している昆虫タンパク質の血漿膜に会合されいるかもしれないということを示唆している。

【0626】

c) 哺乳動物細胞内でのP501Sの発現

全長P501S(553アミノ酸;配列番号113)を、pCEP4(Invitrogen)、pVR1012(Vicol, San Diego, CA)、及びpBIBという、レトロウイルス・ベクターpBMNの修飾形態を含む、さまざまな哺乳動物発現ベクター内にクローン化した。HEK293線維芽細胞内へのP501S/pCEP4とP501S/pVR1012のトランスフェクションを、Fugeneトランスフェクション試薬(Boehringer Mannheim)を用いて行った。簡単に言えば、2µlのFugene試薬を、100µlの無血清培地内で希釈し、そして5~10分間室温でインキュベートした。この混合物を、1µgのP501SプラスミドDNAに添加し、短時間混合し、そして室温で30分間インキュベートした。このFugene/DNA混合物を、細胞に添加し、そして24~48時間インキュベートした。トランスフェクトされたHEK293線維芽細胞内での組換えP501Sの発現を、P501Sに対するモノクローナル抗体を用いたWesternブロットにより検出した。

【0627】

CHO-K細胞(American Type Culture Collection, Rockville, MD)内へのP501S/pCEP4

10

20

30

40

50

のトランスフェクションを、GenePorterトランスフェクション試薬 (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) を用いて行った。簡単に言えば、15 μ l のGene Porterを、500 μ l の無血清培地中で希釈し、そして10分間室温でインキュベートした。このGene Porter / 培地混合物を、2 μ g のプラスミドDNAに添加し、これを500 μ l の無血清培地中で希釈し、短時間混合し、そして室温で30分間インキュベートした。CHO-K細胞を、PBS 中で濯いで血漿タンパク質を除去し、そして上記Gene Porter/DNAミックスを添加し、そして5時間インキュベートする。次に、トランスフェクトされた細胞に、等容精の2倍培地を与え、そして24~48時間インキュベートした。

【0628】

P501Sにより一過性に感染されたCHO-K細胞のFACS分析は、P501S の表面発現を証明した。以下に記載するような、P501Sペプチドに対するウサギ・ポリクローナル抗血清を用いて発現を検出した。フロー・サイトメトリーによる分析を、FaCScan (Becton Dickinson) を用いて行い、そしてそのデータをthe Cell Questプログラムを用いて分析した。

【0629】

d) パキユロウイルスにおけるP703Pの発現

複数の隣接する制限部位を有する完全長P703P-DE5 (配列番号326) のcDNAは、プラスミドpCDNA703を制限エンドヌクレアーゼXbaI及びHindIIIで消化することによって得た。生じた制限フラグメント (約800塩基対) を、同一の制限酵素で消化したトランスファーベクター内にライゲーションした。インサートの配列はDNA配列決定で確認した。組換えトランスファープラスミドpFBP703は、Bac-To-Bacパキユロウイルス発現系 (BRL Life Technologies) を用いて、パキミドDNA及びパキユロウイルスを作製するために使用した。High Five細胞は、上述の様に組換えP703Pタンパク質を得るために、組換えウイルスBVP703に感染した。

【0630】

e) E . コリにおけるP788Pの発現

C末端性6 x Hisタグを融合したP788Pの短いN末端部分 (配列番号777の残基1~644 ; P788P-Nとも称する) を以下の様にE . コリで発現した。P788PのcDNAを、プライマーAW080及びAW081 (配列番号815及び816) を用いて増幅した。AW080は、NdeI部位を有するセンスのクローニングプライマーである。PCR増幅した788P、及びベクターpCRX1をNdeI及びXhoIで消化した。ベクターとインサートをライゲーションし、そしてNova Blue細胞を形質転換した。コロニーをインサートについて無作為にスクリーニングし、そして次に配列決定した。

【0631】

P788P-Nクローン#6は、設計したコンストラクトと同一であることが確認された。発現コンストラクトP788P-N #6/pCRX1で、E . コリ BL21 CodonPlus-RILコンピテント細胞を形質転換した。誘導後、ほとんどの細胞が良好に生育し、3時間後にOD600が2.0以上に達した。クーマシー染色したSDS-PAGEは、約75kDに過剰発現したバンドを示した。6 x Hisタグ抗体を用いるウェスタンブロット解析は、当該バンドがP788P-Nであることを確認した。P788P-Nに関して決定されたcDNA配列を配列番号817に示し、同時に相当するアミノ酸配列を配列番号818を示す。

【0632】

f) E . コリにおけるP510Sの発現

P510Sタンパク質は9個の潜在的な膜貫通ドメインを有し、そして原形質膜に存在すると推定される。このタンパク質のC末端ドメイン、及び推定されるP510Sの第3の細胞外ドメインは、以下の様にE . コリで発現した。

【0633】

Ra12-P501S-Cと称される発現コンストラクトは、N末端に6 Hisタグ、続いて結核 (M. tuberculosis) 抗原Ra12 (配列番号819) 及びP510SのC末端部分 (配列番号538のアミノ残基1176~1261) を有する様に設計された。完全長のP510Sは、プライマーAW056及びAW057 (それぞれ配列番号820及び821) を用いるPCRによって、P510S-Cフラグメントを増幅す

10

20

30

40

50

るために使用した。AW056はEcoRI部位を有するセンスのクローニングベクターである。AW057は、停止部位及びXhoI部位を有するアンチセンスのプライマーである。増幅したP501Sフラグメント及びRa12/pCRX1をEcoRI及びXhoIで消化し、そして次に精製した。インサートとベクターを共にライゲーションし、そしてNova Blueを形質転換した。

【0634】

コロニーをインサート及び配列に関して無作為にスクリーニングした。タンパク質の発現のために、発現コンストラクトでE. コリBL21 (DE3) を形質転換した。ミニ誘導スクリーニングは、発現条件を最適化するために実施した。誘導後、当該細胞は良好に生育し、3時間後にはOD600nmが2.0以上に達した。クーマシー染色したSDS-PAGEは、約30kDの高度に過剰発現したバンドを示した。これは推定した分子量以上であるが、ウェスタンプロット解析はポジティブであり、このバンドがHisタグ含有タンパク質であることを示した。最適化した培養条件は以下の通りである。

【0635】

一晚の培養液 / 昼間の培養液 (LB + カナマイシン + クロラムフェニコール) を、1 L の 2 × YT に対して 25 ml の培養液の比率で、2 × YT (カナマイシン及びクロラムフェニコールを有する) 中で希釈する。37 °C で OD600 = 0.6 となるまで生育させる。T0 の試料としてアリコートを採用する。1 mM の IPTG を加え、そして 30 °C で 3 時間生育させる。T3 試料を採用し、細胞を遠心沈澱させ、そして -80 °C で保存する。Ra12-P510S-C コンストラクトに関して決定した cDNA 及びアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 822 及び 825 に示す。

【0636】

発現コンストラクト P510S-C は、5' 側に加えられた開始コドン及びグリシン (GGA) コドン、そして次に P510S C 末端フラグメント、続いてインフレームの 6 × ヒスチジンタグ及び pET286 ベクター由来の停止コドンを有する様に設計された。クローニング戦略は Ra12-P510S-C で使用したものと類似しているが、但し、利用した PCR プライマーは、それぞれ配列番号 828 及び 829 に示したものであり、そして pET28b において NcoI / XhoI 切断を使用した。配列番号 828 のプライマーは 5' 側の NcoI 部位を作製し、そして開始コドンを加えた。

【0637】

配列番号 829 のアンチセンスプライマーは、P510S C 末端フラグメント上に XhoI 部位を作製する。クローンは配列決定で確認した。タンパク質発現のために、発現コンストラクトで E. コリ BL21 (DE3) CodonPlus-RIL コンピテント細胞を形質転換した。2.0 以上の OD600 は、誘導から 30 時間後に得られた。クーマシー染色した SDS-PAGE は、約 11 kD の過剰発現したバンドを示した。ウェスタンプロット解析は、当該バンドが N 末端のタンパク質配列決定を行った場合に、P510S-C であることを確認した。最適化した培養条件は以下の通りである：

【0638】

一晚の培養液 / 昼間の培養液 (LB + カナマイシン + クロラムフェニコール) を、1 L の 2 × YT に対して 25 ml の培養液の比率で、2 × YT (カナマイシン及びクロラムフェニコールを有する) 中で希釈する。37 °C で OD600 = 0.6 となるまで生育させる。T0 の試料としてアリコートを採用する。1 mM の IPTG を加え、そして 30 °C で 3 時間生育させる。T3 試料を採用し、細胞を遠心沈澱させ、そして -80 °C で精製まで保存する。P510S-C コンストラクトに関して決定した cDNA 及びアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 823 及び 826 に示す。

【0639】

P510S の推定される第 3 の細胞外ドメイン (P510S-ES ; 配列番号 538 の残基 328 ~ 676) を以下の通りに E. コリで発現させた。P510S フラグメントは、配列番号 830 及び 831 に示すプライマーを用いる PCR によって増幅した。配列番号 830 のプライマーは、pPDM にライゲーションする際に使用するために、NdeI 部位を有するセンスプライマーである。配列番号 831 のプライマーは、pPPM にライゲーションする際に使用するために加えられた XhoI 部位を有するアンチセンスプライマーである。生じたフラグメントは、NdeI 及び XhoI 部位で pPDM にクローニングされた。クローンは配列決定によって確認した。タンパク質の発現のために、当該クローンで E. コリ BL21 (DE3) CodonPlus-RIL コンピテント細胞を形質転換した

10

20

30

40

50

。

【0640】

誘導から3時間後にはOD600nmが2.0以上に達した。クーマシー染色したSDS-PAGEは、約39kDの過剰発現したバンドを示し、そしてN末端の配列決定は、P510S-E3であることを確認した。最適化した培養条件は以下の通りである。一晚の培養液/昼間の培養液(LB+カナマイシン+クロラムフェニコール)を、1Lの2×YTに対して25mlの培養液の比率で、2×YT(カナマイシン及びクロラムフェニコールを有する)中で希釈する。37℃でOD600=0.6となるまで生育させる。T0の試料としてアリコートを採用する。1mMのIPTGを加え、そして30℃で3時間生育させる。T3試料を採用し、細胞を遠心沈澱させ、そして精製まで-80℃で保存する。P501S-E3コンストラクトに関して決定したcDNA及びアミノ酸配列を、それぞれ配列番号824及び827に示す。

10

【0641】

g) E. コリでのP775Sの発現

抗原P775Pは、多類のオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。配列番号483のタンパク質をコードする第3のORFは、最良なエモーチフ(emotif)スコアを有する。結核抗原Ra12(配列番号819)及びN末端の6×Hisタグを有するP775P-ORF3は以下の通りに調製した。P775P-ORF3は、配列番号832のセンスPCRプライマー及び配列番号833のアンチセンスプライマーを用いて増幅した。P775P及びRa12/pCRX1のPCR増幅フラグメントは、制限酵素EcoRI及びXhoIで消化した。ベクターとインサートをライゲーションし、そして次にN ovaBlue細胞を形質転換した。

20

【0642】

コロニーをインサートについて無作為にスクリーニングし、そして次に配列決定した。所望の配列を有するクローンでE. コリBL21(DE3)CodonPlusコンピテント細胞を形質転換した。誘導から2時間後、細胞密度は約1.8のOD600に達した。クーマシー染色したSDS-PAGEは、約31kDの過剰発現したバンドを示した。6×Hisタグ抗体を用いるウエスタンブロットは、当該バンドがRa12-P775P-ORF3であることを確認した。融合コンストラクトに関して決定されたcDNA及びアミノ酸配列を、それぞれ配列番号834及び835に示す。

【0643】

h) E. コリにおけるP703P Hisタグ融合タンパク質の発現

P703Pのコード領域に関するcDNAは、配列番号836及び837のプライマーを用いるPCRによって調製した。PCR産物はEcoRI制限酵素で消化し、ゲル精製し、そしてEco72I及びEcoRI制限酵素で消化した、インフレームでHisタグを有する修飾型pET28ベクター内にクローニングされた。正確なコンストラクトはDNA配列解析によって確認し、そして次にE. コリBL21(DE3)pLys S発現宿主細胞を形質転換した。発現した組換えP703Pに関して決定されたアミノ酸及びcDNA配列を、それぞれ配列番号838及び839に示す。

30

【0644】

i) E. コリにおけるP705P Hisタグ融合タンパク質の発現

P705Pのコード領域に関するcDNAは、配列番号840及び841のプライマーを用いるPCRによって調製した。PCR産物はEcoRI制限酵素で消化し、ゲル精製し、そしてEco72I及びEcoRI制限酵素で消化した、インフレームでHisタグを有する修飾型pET28ベクター内にクローニングされた。正確なコンストラクトはDNA配列解析によって確認し、そして次にE. コリBL21(DE3)pLys S及びBL(DE3)CodonPlus発現宿主細胞を形質転換した。発現した組換えP705Pに関して決定されたアミノ酸及びcDNA配列を、それぞれ配列番号842及び843に示す。

40

【0645】

j) E. コリにおけるP711P Hisタグ融合タンパク質の発現

P711Pのコード領域に関するcDNAは、配列番号844及び845のプライマーを用いるPCRによって調製した。PCR産物はEcoRI制限酵素で消化し、ゲル精製し、そしてEco72I及びEcoRI制限酵素で消化した、インフレームでHisタグを有する修飾型pET28ベクター内にクローニングされた。正確なコンストラクトはDNA配列解析によって確認し、そして次にE. コリB

50

L21 (DE3) pLys S 及びBL21 (DE3) CodonPlus発現宿主細胞を形質転換した。発現した組換えP711Pに関して決定されたアミノ酸及びcDNA配列を、それぞれ配列番号846及び847に示す。

【0646】

k) E. coliでのP767Pの発現

P767Pの全長コード領域(配列番号:590のアミノ酸2-374)を、プライマーPDM-4680及びPDM-469(それぞれ、配列番号:935及び936)を用いてPCRにより増幅した。DNAの増幅は、10 μ Lの10 \times Pfu緩衝液、1 μ Lの10mM dNTP、2 μ LづつのPCRプライマー10 μ M濃度、83 μ Lの水、1.5 μ LのPfu DNAポリメラゼ(Stratagene, La Jolla, CA)、及び1 μ LのDNA 100ng/ μ Lにより行なわれた。変性を96 $^{\circ}$ Cにて2分間行い、次に96 $^{\circ}$ Cにて20秒、66 $^{\circ}$ Cにて15秒及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間の40サイクルを行い、最後に72 $^{\circ}$ Cにて4分間を1サイクル行なった。

【0647】

PCR生成物はXho I により消化し、そしてEco72 I 及びXho I 似より消化された5'末端に末端を合せたヒスチジンタグと共に、修飾されたpET28にクローニングした。配列分析を通して、構築物が正しいことを確認し、そして大腸菌BL21 pLysS及びBL21 CondonPlus

RP細胞に形質転換した。組換えB767Pタンパク質のcDNAコード領域を配列番号:938に記載し、そして対応するアミノ酸配列を配列番号:041に示す。全長P767Pは、検出又は精製のために十分な高レベルで発現しなかった。

【0648】

P767Pの端が切られたコード領域(B767P-B;配列番号:590のアミノ酸47-374)は、プライマーPDM-573及びPDM-469(それぞれ、配列番号:937及び936)、並びに全長P767Pについて前記したPCR条件を用いてPCRにより増幅した。PCR生成物をXho I により消化し、そして、Eco72 I 及びXho I により消化した修飾されたpET28ベクターにクローニングした。配列分析により構築物が正しいことを確認し、そして大腸菌BL21 pLysS及びBL21 CondonPlus RP細胞に形質転換した。封入体ペレット中にタンパク質が発現されることが見出された。発現されたB767P-Bタンパク質のコード領域を配列番号:939に記載し、対応するアミノ酸配列を配列番号:940に示す。

【0649】

l) 哺乳類細胞におけるP767Pの発現

哺乳類細胞における組換え発現に関しては、十分な長さのP767P cDNA(配列番号587)を、FLAGエピトープ標識を含むよう修飾された哺乳類発現ベクター-pCEP4(Invitrogen)中にサブクローン化した。この構造体を、Fugene 6試薬(Roche)を用いて、HEK293細胞(American Type Culture Collection)中にトランスフェクトした。手短かに言及すれば、HEK細胞を、10%FBS(Hyclone)を含むDMEM(Gibco)において、100,000細胞/mlの密度でプレートし、そして一晩、増殖した。次の日、2 μ lのFugene6を、FBSを含まないDMEM10 μ lに添加し、そして室温で15分間インキュベートした。次に、Fugene6/DMEM混合物を、1 μ gのP767P/pCEP4プラスミドDNAに添加し、そして室温で15分間インキュベートした。次に、Fugene/DNA混合物を、HEK293細胞に添加し、そして7%CO₂下で37 $^{\circ}$ Cで48-72時間インキュベートした。細胞をPBSによりすすぎ、次に集め、そして遠心分離によりペレット化した。

【0650】

P767P発現を、抗-エピトープ標識抗体を用いて、ウェスタンブロット分析により、トランスフェクトされたHEK293完全細胞溶解物において検出した。特に、完全細胞溶解物は、氷上で30分間、Triton-X100包含溶解緩衝液において細胞をインキュベートすることによって生成された。次に、溶解物を、5,000rpmで5分間、4 $^{\circ}$ Cでの遠心分離により透明にした。サンプルを、メルカプトエタノールを含む、SDS-PAGE負荷緩衝液により希釈し、次にSDS-PAGEゲルを負荷する前、10分間、煮沸した。タンパク質を、ニトロセルロースに移し、そして1 μ g/mgの希釈度で、抗-FLAGマウスモノクローナル抗体(Sigma)を用いてプローブした。プロットを、HRPに結合されるロバ抗-マウスIgにより現し、続

10

20

30

40

50

いてECL基質においてインキュベートした。

【0651】

P767Pは、次の通りに、ウサギ抗 - P767P血清を用いて流動細胞計測胞により、トランスフェクトされたHEK293細胞の表面上で発現されることが見出された。細胞を集め、そして氷冷却された染色緩衝液 (PBS + 1 % BSA + アジド) により洗浄した。次に、細胞を、希釈されていない抗 - P767Pウサギポリクローナル血清と共に、氷上で30分間インキュベートした。細胞を染色緩衝液により3度、洗浄し、そして次に、ヤギ抗 - ウサギIg (H+L) - FITC試薬 (Southern Biotechnology) の1 : 100希釈溶液と共に氷上で30分間インキュベートした。3回の洗浄に続いて、細胞をヨウ化プロピジウム (PI)、すなわち浸透性細胞の同定を可能にする活性着色剤を含む染色緩衝液に再懸濁し、そしてFACSにより分析した。

10

【0652】

m) 哺乳類細胞におけるP788Pの発現

哺乳類細胞における組換え発現に関しては、十分な長さのP788P cDNAを、FLAGエピトープ標識を含むよう修飾された哺乳類発現ベクター-pcDNA3.1(Invitrogen) 中にサブクローン化した。この構造体を、Fugene 6試薬 (Roche) を用いて、HEK293細胞 (American Type Culture Collection) 中にトランスフェクトした。手短かに言及すれば、HEK細胞を、10% FBS (Hyclone) を含むDMEM (Gibco) において、100,000細胞/mlの密度でプレートし、そして一晩、増殖した。次の日、2 µlのFugene6を、FBSを含まないDMEM10 µlに添加し、そして室温で15分間インキュベートした。次に、Fugene6/DMEM混合物を、1 µgのP788P / p cDNA3.1プラスミドDNAに添加し、そして室温で15分間インキュベートした。次に、Fugene / DNA混合物を、HEK293細胞に添加し、そして7 % CO₂下で37 °Cで48 - 72時間インキュベートした。細胞をPBSによりすすぎ、次に集め、そして遠心分離によりペレット化した。

20

【0653】

P788P発現を、プローブとしてウサギ抗 - P788P血清を用いて、ウェスタンブロット分析により、トランスフェクトされたHEK293完全細胞溶解物において検出した。特に、完全細胞溶解物は、氷上で30分間、Triton - X100包含溶解緩衝液において細胞をインキュベートすることによって生成された。次に、溶解物を、5,000rpmで5分間、4 °Cでの遠心分離により透明にした。サンプルを、メルカプトエタノールを含む、SDS - PAGE負荷緩衝液により希釈し、次にSDS - PAGEゲルを負荷する前、10分間、煮沸した。タンパク質を、ニトロセルロースに移し、そして1 µg/mgの希釈度で、精製されたウサギ抗 - P788Pポリクローナル血清を用いてプローブした。プロットを、HRP (Jackson ImmunoResearch) に結合されるロバ抗 - ウサギIgにより現し、続いてECL基質においてインキュベートした。

30

【0654】

P788P発現は、ウサギ抗 - P788P血清を用いて流動細胞計測胞により、トランスフェクトされたHEK293細胞の表面上で発現された。細胞を集め、そして氷冷却された染色緩衝液 (PBS + 1 % BSA + アジド) により洗浄した。次に、細胞を、希釈されていない抗 - P788Pウサギポリクローナル血清 (10 µg/mlの最終濃度) と共に、氷上で30分間インキュベートした。細胞を染色緩衝液により3度、洗浄し、そして次に、ヤギ抗 - ウサギIg (H+L) - FITC試薬 (Southern Biotechnology) の1 : 100希釈溶液と共に氷上で30分間インキュベートした。3回の洗浄に続いて、細胞をヨウ化プロピジウム (PI)、すなわち浸透性細胞の同定を可能にする活性着色剤を含む染色緩衝液に再懸濁し、そしてFACSにより分析した。

40

【0655】

実施例18 . 前立腺特異的ポリペプチドに対する抗体の調製及び特性決定

a) P703P、P504S及びP509Sに対するポリクローナル抗体の調製及び特性決定

P703P、P504S、P509S、P501S、P510S-E3、P510S-C、P705P、十分な長さのP703P (P703P FLとも称す)、P711P、P767P、P788P-N、及びP790P及びP775Pのペプチドに対するポリクローナル抗体を以下の通りにして調製した。P790Pペプチド (それぞれP790P89、P790P120、P790P163、P790P180、P790P222、P790P261、P790P287、及びP790P307と称す) のアミノ酸配列は、配列番号949 - 956で提供され、そしてP775Pペプチドのアミノ酸配列は、配列

50

番号957 - 966で提供される。

【0656】

E. コリ組換発現系において発現された各前立腺腫瘍抗原を適当な抗生物質を有するLBプラスの中で一夜、37℃にて振盪インキュベーター内で増殖させた。翌朝、10mlの一夜培養物を2Lのバツフル付きエーレンマイヤーフラスコの中の適当な抗生物質の入った2×YTに加えて500mlにした。この培養物の光学密度(560nmにて)が0.4~0.6に達したら、細胞をIPTG(1mM)で誘導した。IPTGによる誘導から4時間後、細胞を遠心分離により回収した。これらの細胞をリン酸緩衝食塩水で洗い、そして再度遠心分離した。この上清液を捨て、そしてそれらの細胞をその後の使用のために凍結させておくか、又は直ちに処理した。20mlの溶解バッファーを細胞ペレットに加え、そしてボルテックスにかけた。

10

【0657】

E. コリ細胞を破裂させるため、この混合物をフレンチプレスに16,000psiの圧力にかけた。これらの細胞を再度遠心分離し、次いでその上清液及びペレットを組換タンパク質の分配についてSDS-PAGEにより検定した。細胞ペレットに局在したタンパク質については、ペレットを10mMのTris pH8.0, 1%のCHAPSに際懸濁し、そして封入体ペレットを洗浄し、そして再び遠心分離した。この手順を更に2回繰り返した。洗浄した封入体を10mMのTris pH8.0と10mMのイミダゾールを含む8Mの尿素又は6MのグアニジンHCLのいずれかで可溶化させた。

【0658】

この可溶化させたタンパク質を5mlのニッケル-キレート樹脂(Qiagen)に加え、そして室温にて連続攪拌しながら45min~1時間インキュベーションした。インキュベーション後、その樹脂及びタンパク質の混合物をディスポーザブルカラムに通し、そしてフロースルー画分を集めた。次いでこのカラムを10~20カラム容量の可溶化バッファーで洗った。次に抗原を8Mの尿素、10mMのTris pH8.0及び300mMのイミダゾールを用いてカラムから溶出させ、そして3mlのフラクションで集めた。更なる精製のためにどのフラクションをプールするかを決定するためにSDS-PAGEゲルを泳動させた。

20

【0659】

最終精製工程として、強力なアニオン交換樹脂、例えばHiPrepQ(Biorad)を適当なバッファーで平衡にし、そして上記のプールしたフラクションをこのカラムに載せた。各抗原を上昇していく塩勾配を利用してこのカラムから溶出させた。カラムに流しながらフラクションを集め、そしてこのカラムからのどのフラクションをプールするかを決定するために別のSDS-PAGEゲルを泳動させた。このプールしたフラクションを10mMのTris pH8.0に対して透析した。次いでこのタンパク質を0.22ミクロンのフィルターで濾過してからバイアルに詰め、そしてその抗原を免疫のために必要となるまで凍結した。

30

P790P及びP775Pペプチドを合成し、KLHに接合し、そして免疫化のために必要とされるまで、凍結された。

【0660】

400µgづつの前立腺抗原ペプチドを100µgのムラミルジペプチド(MDP)と組合せ、そしてウサギに注入した。。4週間毎にウサギを等容量の不完全フロインドアジュバント(IFA)と混合した抗原/ペプチド100µgでブーストした。各ブーストの7日後、動物の採血を行った。血清は血液を4℃にて12~4時間インキュベーションし、次いで遠心分離することにより作製した。

40

【0661】

96穴プレートに50µl(一般に1µg/µl)の組換タンパク質と4℃で20時間インキュベーションすることによって抗原でコーティングした。このウェルに250µlのBSAブロッキングバッファーを加え、そして室温で2時間インキュベーションした。プレートをPBS/0.01%のTweenで6回洗った。ウサギ血清をPBSに希釈した。55µlの希釈した血清を各ウェルに加え、そして室温で30分インキュベーションした。プレートを上述の通りに洗浄し、1:10000の希釈率の50µlのヤギ抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を加え、そして室温で30分インキュベーションした。プレートを再び上述の通りに洗浄し、そし

50

て100 μ lのTMBマイクロウェルペルオキシダーゼ基質を各ウェルに加えた。暗所にて室温において15分インキュベーション後、比色反応を100 μ lの1 NのH₂SO₄で停止させ、そして450nmで直ちに測定した。全てのポリクローナル抗体が適当な抗原又はペプチドに対して免疫反応性を示した。

【0662】

組織がP509Sを発現するかどうかを決定するために、免疫組織化学(IHC)分析を、種々の範囲の組織切断に対して行なった。組織サンプルを、ホルマリン溶液に12-24時間、固定し、そして8ミクロンの切断にスライスする前、パラフィンに包埋した。0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中、蒸気熱誘発されたエピトープ回復(SHIER)を、最適染色条件のために使用した。切片を、10%血清/PBSと共に5分間インキュベートした。一次抗体を、個々の切片に、示される濃度で25分間、添加し、続いて抗-ウサギ又は抗-マウスビオチニル化された抗体のいずれかと共に25分間インキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性を、水素ペルオキシダーゼと共に3度の1.5分間インキュベーションにより阻止した。アビジンビオチン複合体/ホースラディッシュペルオキシダーゼ(ABC/HRP)システムを、DAB色原体と共に使用し、抗原発現を可視化した。スライドをヘマトキシリンにより対比染色し、細胞核を可視化した。P509S発現は、前立腺癌、PBH、結腸及び腎臓においては検出されたが、しかし心臓、肺及び肝臓においては検出されなかった。

10

【0663】

b) P501Sに対する抗体の調製及び特性決定

前立腺特異的抗原P501Sのカルボキシ末端に対して特異的なネズミモノクローナル抗体を以下の通りにして調製した。

20

P501Sの切頭フラグメント(SEQ ID NO: 113のアミノ酸355~526)を作り、そしてpET28bベクター(Novagen)にクローニングし、そしてE. コリの中でヒスチジンタグの付いたチオレドキシニン融合タンパク質として発現させた。このtrx-P501S融合タンパク質をニッケルクロマトグラフィーにより精製し、トロンピンで消化してtrxフラグメントを除去し、そして酸沈殿手順、それに続く逆相HPLCにより更に精製した。

【0664】

マウスを切頭P501Sタンパク質で免疫した。抗P501Sポリクローナル血清を潜在的に含むマウス由来の採血血清を精製P501S及びtrx-P501Sタンパク質を用いるELISAアッセイを利用し、P501S-特異的反応性について試験した。P501Sと特異的に反応するようである採血血清を次にウェスタン分析によりP501S反応性についてスクリーニングした。P501S特異的抗体成分を含むマウスを殺し、そして脾臓細胞を用い、標準の技法を利用して抗P501S抗体産生ハイブリドーマを作製した。

30

【0665】

ハイブリドーマ上清液をP501S特異的反応性について、まずELISAにより、次いでP501S形質導入細胞との反応性のFACS分析により試験した。これらの結果に基づき、10ESと命名したモノクローナルハイブリドーマを更なるサブクローニングのために選定した。いくつかのサブクローンができ、ELISAを用いてP501Sに対する特異的反応性について試験し、そしてIgGアイソタイプについて分類した。この分析の結果を以下の表VIに示す。試験した16のサブクローンのうち、モノクローナル抗体10E3-G4-DSを更なる研究のために選択した。

40

【0666】

【表 7】

表VI

ネズミ抗 P501S モノクローナル抗体のアイソタイプ分析

ハイブリドーマクローン	アイソタイプ	上清液中の見積り [Ig] (μ g/ml)
4D11	IgG1	14.6
1G1	IgG1	0.6
4F6	IgG1	72
4H5	IgG1	13.8
4H5-E12	IgG1	10.7
4H5-EH2	IgG1	9.2
4H5-H2-A10	IgG1	10
4H5-H2-A3	IgG1	12.8
4H5-H2-A10-G6	IgG1	13.6
4H5-H2-B11	IgG1	12.3
10E3	IgG2a	3.4
10E3-D4	IgG2a	3.8
10E3-D4-G3	IgG2a	9.5
10E3-D4-G6	IgG2a	10.4
10E3-E7	IgG2a	6.5
8H12	IgG2a	0.6

【 0 6 6 7 】

P501S に対する 10E3-G4-D3 の特異性を FACS 分析により調べた。詳しくは、細胞を固定し (2% のホルムアルデヒド、10分)、浸透化させ (0.1% のサポニン、10分)、そして 0.5 ~ 1 μ g/ml の 10E3-G4-D3 で染色し、次いで第二 FITC- 接合ヤギ抗 - マウス Ig 抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) とインキュベーションさせた。次に細胞を Excalibur フルオレセンス活性化セルソーターを用い、FITC 蛍光について分析した。形質導入された細胞の FACS 分析のため、B-LCL に P501S をレトロウィルスの形質導入した。感染細胞の分析のため、B-LCL を P501S を発現する ワクシニアベクターで感染させた。これらのアッセイにおける特異性を実証するため、別の抗原 (P703P) を形質導入した B-LCL 及び非感染 B-LCL ベクターを利

用した。

【0668】

10E3-G4-D3はP501S - 形質導入B-LCLに結合し、更にはP501S感染化B-LCLにも結合するが、非感染細胞又はP703P形質導入細胞とは結合しないことが示された。

10E3-G4-D3により認識されるエピトープが細胞の表層上か又は細胞内区画内に見い出せるかを検討するため、B-LCLにP501S又はコントロール抗原としてのHLA-B8を形質導入し、そして上述の通りに固定及び浸透化させるか、又は上述の通り10E3-G4-D3で直接染色して分析した。10E3-G4-D3によるP501Sの特異的な認識は浸透化を要することが見い出され、この抗体により認識されるエピトープが細胞内にあることが示唆された。

【0669】

10E3-G4-D3と、高、中及び超低レベルのP501Sをそれぞれ発現することで知られる3つの前立腺腫瘍細胞系Lncap、PC-3及びDU-145との反応性を、上述の通り細胞を浸透化させ、そして処理することにより調べた。PC-3よりもLncapとのより高い10E3-G4-D3の反応性が認められ、そしてPC-3との反応性はDU-145との反応性よりも高かった。これらの結果はリアルタイムPCRと一致し、そしてこの抗体がこのような腫瘍細胞系内のP501Sを特異的に認識し、そして前立腺腫瘍細胞系内で認識されるエピトープが細胞内にあることも実証する。

【0670】

10E3-G4-D3のP501Sに対する特異性はウェスタンブロット分析によっても実証された。前立腺腫瘍細胞系Lncap、DU-145及びPC-3、P501Sで過渡的にトランスフェクションされたHEK293細胞及び非トランスフェクションHEK293細胞由来のリゼートを作った。これらのリゼートの10E3-G4-D3によるウェスタンブロット分析はLncap、PC-3及びP501SトランスフェクションHEK細胞内で46kDaの免疫反応性バンドが示されたが、DU-145細胞もしくは非トランスフェクションHEK293細胞では示されなかった。

【0671】

P501S mRNA発現はこれらの結果と一致し、なぜなら半定量PCR分析はP501S mRNAがLncap内で発現され、PC-3ではより弱い検出可能なレベルで発現され、そしてDU-145細胞では全く発現されないことを示したからである。細菌的に発現され、精製された組換えP501S (P501SStr2と称する) は、発現ベクターVR1012又はpCEP4のいずれかを用いてHEK293細胞内で過渡的に発現された全長P501Sと同様に、10E3-G4-D3 (24kDa) により認識された。P501の推定分子量は60.5kDaであるが、トランスフェクションP501S及び「天然」P501Sは共にその疎水性の性質により若干低い移動度で泳動した。

【0672】

前立腺腫瘍及び正常組織切片パネル (前立腺、副腎、胸、頸、結腸、十二指腸、胆嚢、回腸、腎臓、卵巣、膵臓、耳下腺、骨格筋、脾臓及び精巣) に対し免疫組織化学分析を実施した。組織サンプルをホルマリン溶液の中で24時間かけて固定し、そしてパラフィンに包埋し、そして10ミクロンの切片にスライスした。組織切片を浸透化させ、そして10E3-G4-D3抗体と1時間インキュベーションした。HRP - ラベル化抗マウス、それに続くDABクロモゲンとのインキュベーションを利用してP501S免疫反応性を可視化させた。P501Sは正常前立腺及び前立腺腫瘍組織の双方で高度に発現されるが、試験したその他の組織では検出されないことが見い出された。

【0673】

10E3-G4-D3により認識されるエピトープを同定するため、エピトープマッピングアプローチを追究した。10E3-G4-D3を作るのに利用したP501Sのフラグメントを横断 (スパン) する一連の13通りの重複20~21mer (5個のアミノの重複; SEQ ID NO: 489~501) を作った。平底96穴マイクロタイタープレートに、マウスを免疫するのに用いたペプチド又はP501Sフラグメントのいずれかを1 µg/mlにて37 °Cで2時間かけてコーティングした。次にウェルをアスピレーションにかけ、そして1% (w/v) のBSAを含むリン酸緩衝液食塩水で室温で2時間かけてブロッキングし、次いで0.1%のTween 20を含むPBS (PBST) で洗った。精製抗体10E3-G4-D3をPBST中の2倍希釈系列 (1000ng~16ng) で加え、そして室温で30

10

20

30

40

50

分インキュベーションした。

【0674】

その後PBSTで6回洗い、そして1:20000のHRP-接合ロバ抗マウスIgG(H+L) Affinipure F(ab')フラグメント(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)と30分インキュベーションした。次にプレートを洗い、そしてテトラメチルベンジジンの中で15分インキュベーションした。反応を1Nの硫酸の添加により停止させ、そしてプレートをELISAプレートリーダーを用いて450nmで測定した。図8に示すように、SEQ ID NO:496のペプチド(P501Sのアミノ酸439~459に相当)及びP501Sフラグメントとの間で反応性が認められたが、残りのペプチドとは反応性が認められず、10E3-G4-D3により認識されるエピトープがSEQ ID NO:113のアミノ酸439~459に存在することを示す。

10

【0675】

P501Sの組織特異性を更に評価するため、マルチアレー免疫組織化学分析を、全ての主要正常器官を包含する約4700通りのヒト組織及びこれらの組織に由来する新生物に対して実施した。これらのヒト組織サンプルのうちの65が前立腺起源である。直径0.6mmの組織切片をホルマリン固定し、そしてパラフィン包埋した。サンプルを10mMのクエン酸バッファ-pH6.0を用いてHIERで予備処理し、そして10分煮沸した。切片を10E3-G4-D3で染色し、そしてP501S免疫反応をHRPで可視化させた。65の前立腺組織サンプルの全て(5つが正常、55が未処置前立腺腫瘍、5がホルモン難治前立腺腫瘍)が陽性であり、異なる核周囲染色を示した。調べたその他の認識は全てP501S発現に関して陰性であった。

【0676】

20

c) P503Sに対する抗体の調製及び特徴付け

P503S(配列番号:114のアミノ酸113~241)の1つのフラグメントは、P501Sに対して、上に記載したように本質的にバクテリアから発現、及び精製し、ウサギ及びマウスの両者を免疫化するために使用した。マウス・モノクローナル抗体は、上に記載したように、通常ハイブリドーマ技術を使用して単離した。ウサギ・モノクローナル抗体は、イムジエニックス・ファーマソイティカルズ(Immgenics Pharmaceuticals)(バンクーバー、BC、カナダ)において、選択的リンパ球抗体法(Selected Lymphocyte Antibody Method (SLAM))を使用して単離した。下の表VIIは、P503Sに対して開発(developed)されたモノクローナル抗体を列挙する。

【0677】

30

【表 8】

表Ⅶ

抗体	種
20D4	ウサギ
JA1	ウサギ
1A4	マウス
1C3	マウス
1C9	マウス
1D12	マウス
2A11	マウス
2H9	マウス
4H7	マウス
8A8	マウス
8D10	マウス
9C12	マウス
6D12	マウス

10

20

30

【0678】

ウサギ・モノクローナル抗体20D4及びJA1に対する相補性決定領域 (CDRs) をエンコードするDNA配列を決定し、それぞれ、配列番号：502及び503に提供した。

この抗体のそれぞれのエピトープ結合領域をさらに良好に定義するため、一系列の重複ペプチド (overlapping peptides) を産生させたが、それは配列番号：114のアミノ酸109~213にまたがる (span)。これらのペプチドは、以下のようにELISAによって、抗P503Sモノクローナル抗体のエピトープ・マップに使用された。免疫原として使用された、P503Sの組換え型フラグメントは、陽性対照として使用した。96ウェルのマイクロタイター・プレートに、4 で一晩、20ng/ウェルで、ペプチド又は組換え型抗原でコートした。

40

【0679】

プレートを吸引し、さらに室温において2時間、1% (w/v) BSAを含むリン酸で緩衝された食塩水でブロックし、次に0.1% Tween 20 (PBST) を含むPBS中で洗浄した。PBST中に希釈された、精製されたウサギ・モノクローナル抗体を、上記のウェルに添加し、室温で30分、インキュベートした。PBSTで6回洗浄すること、そして、さらに30分間、1:2000希釈のプロテイン-A HRPコンジュゲート (conjugate) でのインキュベーションをこれに続けた。プレートを、PBST中で6回洗浄し、さらに15分間、テトラメチルベンジジン (TMB) 基質でインキュベートした。この反応を、1N硫酸の添加によって停止し、さら

50

にプレートを用いて、ELISAプレート・リーダーを使用して、450nmで読みとった。マウス・モノクローナル抗体を用いたELISAは、組織培養液からの上清を用いて実施したが、この試験法において適切に進行した。

【0680】

上記抗体の全ては、負の対照（ネガティブ・コントロール）SP2上清を例外として、組換え型P503Sフラグメントに結合した。20D4、JA1、及び1D12は、ペプチド#2101（配列番号：504）に厳密に結合したが、このペプチドは配列番号：114のアミノ酸151～169に一致する。1C3は、ペプチド#2102（配列番号：505）に結合したが、このペプチドは、配列番号：114のアミノ酸165～184に一致する。9C12は、ペプチド#2099（配列番号：522）に結合したが、このペプチドは、配列番号：114のアミノ酸120～139に一致する。その他の抗体が結合した領域は、本研究においては、調べられていない。

10

【0681】

エピトープ・マッピングに続いて、抗体を、P503Sを安定して発現した1つの細胞系統に対するFACS分析によって試験し、抗体が細胞表面のエピトープに結合することを確認した。対照のプラスミドで、きちんと形質導入された細胞を、負の対照として使用した。細胞は、生きたまま、固定液を用いずに染色した。0.5ugの抗P503Sモノクローナル抗体を添加し、さらに細胞を30分間、氷上でインキュベートし、FITCラベルされたヤギ抗ウサギ、又はマウス二次抗体で2回の洗浄、及び20分間のインキュベートをした。2回洗浄後、細胞をエクスカリバー蛍光活性化セル・ソーター（Excalibur fluorescent activated cell sorter）で分析した。モノクローナル抗体1C3、1D12、9C12、20D4、及びJA1は、P503の細胞表面エピトープに結合することを発見したが、8D3は結合することが発見されなかった。

20

【0682】

どの組織がP503Sを発現するかを決定するため、本質的には上述のように、通常組織（前立腺、副腎、乳房、頸部（cervix）、大腸、十二指腸、胆嚢、回腸、腎臓、卵巣、膵臓、耳下腺、骨格筋、脾臓、精巣）のパネル上で、免疫組織化学的分析を行った。HRP-標識された抗マウス、又は抗ウサギ抗体を使用し、次にTMBでのインキュベーションを行って、P503Sの免疫反応性を可視化した。P503Sは、前立腺組織中で高度に発現されることが発見され、頸部（cervix）、大腸、回腸、腎臓においては、それより低いレベルの発現であり、副腎、乳房、十二指腸、胆嚢、卵巣、膵臓、耳下腺、骨格筋、脾臓、及び精巣においては、いかなる発現も観測されなかった。

30

【0683】

ウエスタンブロット分析を、抗P503Sモノクローナル抗体の特異性を特徴づけるために使用した。バクテリア中で発現され、かつバクテリアから精製された組換え型（rec）P503S、及び完全長P503Sを形質移入されたHEK293細胞からの可溶化液（ライセート）について、SDS-PAGEを行った。タンパク質をニトロセルロースに移し、そして次に、抗体濃度1μg/mlにおいて、各々の抗P503Sモノクローナル抗体（20D4、JA1、1D12、6D12、9C12）でウエスタンブロットを行った。ヤギ抗マウスモノクローナル抗体、又はプロテイン・A-セファロース（protein A-sepharose）の何れかに複合化（conjugated）された、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（horse radish peroxidase（HRP））を使用して、タンパク質を検出した。モノクローナル抗体20D4は、妥当な分子量14kDaの組換え型P503S（アミノ酸113～241）、及び完全長P503Sを形質移入されたHEK293細胞可溶化液中の23.5kDaの化学種を検出した。他の抗P503Sモノクローナル抗体は、ウエスタンブロットによって、類似の特異性を示した。

40

【0684】

d) P703Pに対する抗体の調製及び特徴付け

ウサギを、組換え型P703Pタンパク質の、切断型（P703PtrI；配列番号：172）又は完全長成熟型（P703Pfl；配列番号：523）のいずれかで免疫化した。このタンパク質は上述のようにバクテリア中で発現され、かつバクテリアから単離された。アフイニティー精製されたポリクローナル抗体は、固体支持体に結合された免疫原P703Pfl又はP703PtrIを使

50

用して作成された。ウサギ・モノクローナル抗体は、イムジェニック・ファーマソイティカル（Immgenics Pharmaceuticals）において、SLAM技術を使用して単離した。下の表VII Iは、P703Pに対して産生されたポリクローナル抗体、及びモノクローナル抗体の両者を列挙する。

【 0 6 8 5 】

【 表 9 】

表Ⅷ

抗体	免疫原	種/タイプ
Aff. Purif. P703P（切断）；#2594	P703PtrI	ウサギ・ポリクローナル
Aff. Purif. P703P（完全長）；#9245	P703Pfl	ウサギ・ポリクローナル
2D4	P703PtrI	ウサギ・モノクローナル
8H2	P703PtrI	ウサギ・モノクローナル
7H8	P703PtrI	ウサギ・モノクローナル

10

20

30

40

50

【 0 6 8 6 】

ウサギ・モノクローナル抗体8H2、7H8、及び2D4に対する相補性決定領域（CDRs）をエンコードするDNA配列を決定し、それぞれ、配列番号：506～508に提供する。

エピトープ・マッピング研究を、上述のように行った。モノクローナル抗体2D4、及び7H8は、それぞれ、配列番号：509（配列番号：172のアミノ酸145～159に一致する）、及び配列番号：510（配列番号：172のアミノ酸11～25に一致する）のペプチドに、特異的に結合することが発見された。ポリクローナル抗体9427が、配列番号：515～517のペプチドに結合することと共に、ポリクローナル抗体2594が、配列番号：511～514のペプチドと結合することが発見された。

【 0 6 8 7 】

抗P703P抗体の特異性は、以下のようにウエスタンブロット分析によって決定した。（1）バクテリアによって発現された組換え型抗原；（2）完全長P703Pを発現しているプラスミドで形質移入されていないか、又は形質移入されたHEK293細胞及びLtk^{-/-}細胞の可溶化液；さらに（3）これらの細胞培養液から単離された上清について、SDS-PAGEを実施した。タンパク質は、ニトロセルロースに移し、さらに次に、抗P703Pポリクローナル抗体#2594を、1 ug/mlの抗体濃度で使用して、ウエスタンブロットを行った。

【 0 6 8 8 】

タンパク質は、抗ウサギ抗体に複合化されたホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）を使用して検出した。35kDaの免疫反応性バンドが、組換え型P703Pについて観測された。組換え型P703Pは、わずかに高分子量で移動するのは、それがエピトープをぶら下げているからである。完全長P703Pを形質移入された細胞からの可溶化液及び上清中、P703Pに一致する30kDaのバンドが観測された。特異性を確実にするため、対照プラスミドで確実に形質移入されたHEK293細胞からの可溶化液をさらに試験したが、P703P発現に対して陰性であった。他の抗P703P抗体は、類似の結果を示した。

【 0 6 8 9 】

抗P703Pモノクローナル抗体を使用して、免疫組織化学的研究を上述のように行った。P703Pは、正常な前立腺、及び前立腺腫瘍組織中で、高いレベルで発現されることが発見さ

れているが、試験した全てのその他の組織（乳ガン、肺ガン、及び正常な腎臓）中では検出されなかった。

【0690】

e) P504Sに対する抗体の調製及び特徴付け

完全長P504S（配列番号：108）は、P501Sに対し、上述のように本質的にバクテリアで発現され、かつ単離され、イムジェニクス・ファーマソイティカル（Immgenics Pharmaceuticals）（バンクーバー、BC、カナダ）で、選択的リンパ球抗体法（SLAM）を使用して、ウサギ・モノクローナル抗体を産生するために使用した。抗-P504Sモノクローナル抗体13H4は、ウエスタンブロットにより、ガン細胞中で、発現された組換え型P504S、及び天然型P504Sの両者に結合することが示された。

10

【0691】

様々な前立腺組織中のP504Sの発現を評価するための、13H4を使用した免疫組織化学的研究を、上述のように行った。前立腺ガン（PC）を伴う根治的前立腺切除術の65症例、前立腺生検の26症例、及び良性の前立腺肥大（BPH）の13症例を含む、全部で104の症例は、抗P504Sモノクローナル抗体13H4で染色した。P504Sは、前立腺切除術において、PCの64/65（98.5%）で、さらに前立腺生検の26/26（100%）において、細胞質顆粒染色を強く示した。P504Sは、ガン（carcinomas）（PCの症例の91.2%において4+、5.5%において3+、2.2%において2+、1.1%において1+）及び前立腺上皮内腫瘍（全ての症例で4+）において、強く、かつ拡散して染色された。

20

【0692】

P504Sの発現は、グレーソン・スコア（Gleason score）に伴って変化しなかった。PCの周りのNP/BPHの症例のわずか17/91（18.7%）、及びBPH症例の1/13（15.4%）が、病巣であり（全ての症例で1+、2+～4+はなし）、かつ、ラージ腺（large glands）中で、P504Sに対し、弱い陽性であった。P504Sの発現は、生検又は前立腺切除術のいずれかにおける小萎縮性腺（small atrophic glands）、ポストアトロフィック過形成（postatrophic hyperplasia）、基底細胞過形成、移行細胞化生（transitional cell metaplasia）においては、発見されなかった。

【0693】

P504Sは、従って、前立腺ガンの全てのグレーソン・スコア（Gleason scores）（98.5～100%の敏感さ）において、過剰発現されていることが発見され、かつ、大きな正常前立腺においては、症例の19/104において（82.3%の特異性）、病巣陽性（focal positivities）のみが示されることが発見された。これらの発見は、P504Sが、前立腺ガンの診断のために有用に使用されうることを示す。

30

【0694】

実施例19．細胞表面発現の特徴付け及び前立腺特異的抗原P501Sの染色体の所在

この実施例は、前立腺特異的抗原P501Sが細胞の表面で発現されることを示す研究を、P501Sの、蓋然性のある染色体の所在を決定するための研究とともに記述する。

タンパク質P501S（配列番号：113）は、11の膜貫通ドメインを有することが示唆される。抗P501Sモノクローナル抗体10E-G4-D3（実施例17中に上述したもの）によって、認識されたエピトープが細胞内にあるという発見に基づき、以下の膜貫通決定因子（transmembrane determinants）は、P501Sの細胞外ドメインの予言を許すだろう。図9は、膜貫通ドメインの予言された所在、及び実施例17中に記述された細胞内エピトープを示す、P501Sタンパク質の図式的表現である。

40

【0695】

下線を付した配列は、予言された膜貫通ドメインを表し、太字の配列は、予言された細胞外ドメインを表し、さらに、イタリックの配列は、予言された細胞内ドメインを表す。太字かつ下線の両者が付された配列は、ポリクローナル・ウサギ血清を産生するために使用された配列を表す。膜貫通ドメインの所在は、トスナディ（Tusnady）及びシモン（Simon）によって記述されたように、HHMTOPTを使用して予言された（Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to Topology P

50

rediction, J. Mol. Biol. 283 : 489 ~ 506, 1998)。

【0696】

図9に基づき、アミノ酸274~295及び323~342に一致する膜貫通ドメインが側面に位置したP501Sドメインは、細胞外であることが予言される。配列番号：518のペプチドは、P501Sのアミノ酸306~320に一致し、予言された細胞外ドメイン中にある。配列番号：519のペプチド、これは、アスパラギニンとヒスチジンの置換を除いて、配列番号：518のペプチドと同一であるが、上述のように合成した。担体タンパク質に対する結合を容易にするため、このペプチドのC末端にCys-Glyが付加された。

【0697】

固体支持体からのペプチドの開裂は、以下の開裂混合物を使用して行った：トリフルオロ酢酸：エタジオール：チオアニソール：水：フェノール（40：1：2：2：3）。2時間の開裂の後、このペプチドを、冷エーテル中で沈殿させた。ペプチドの粒は、次に10%（v/v）酢酸中に溶解し、C18逆相hplcによって精製する前に、凍結乾燥した。水（0.05% TFAを含む）中、5~60%アセトニトリル（0.05% TFAを含む）のグラジエント（gradient）を使用し、このペプチドを溶離した。ペプチドの純度は、phlc及びマス・スペクトルによって確認し、>95%であることを決定した。精製したペプチドは、上述のように、ウサギ・モノクローナル抗体抗血清を産生するために使用した。

【0698】

P501Sの表面発現をFACS分析により試験した。細胞を10 µg/mlのポリクローナル抗P501Sペプチド血清により染色し、洗浄し、2次FITCコンジュゲート・ヤギ・抗ウサギ・Ig抗体（ICN）と一緒にインキュベートし、洗浄し、そしてExcalibur蛍光細胞分析分離装置を用いてFITC蛍光について分析した。形質導入細胞のFACS分析のために、B-LCLをレトロウイルス的にP501Sにより形質導入した。これらの分析の特異性を証明するために、関連性のない抗原（P703P）により形質導入したB-LCL又は形質導入しなかったB-LCLを平行して染色した。

【0699】

前立腺癌細胞株のFACS分析のために、Lncap、PC-3、及びDU-145を使用した。前立腺癌細胞株を細胞分離メジウムを用いて組織培養皿から分離し、そして前記のとおり染色した。全てのサンプルをFACS分析の前にヨウ化プロピジウム（PI）により処理し、そしてデータをPI-排除（すなわち、無傷の、そして非透過性）細胞から得た。配列番号519のペプチドに対して製造されたウサギ・ポリクローナル血清は、ポリクローナル血清により認識されるエピトープが細胞外のものであることを証明する、P501Sを発現するために形質導入された細胞の表面の特異的な認識を示した。

【0700】

P501Sが細胞表面に発現されているとき、生化学的に測定するために、Lncap細胞の周辺膜を分離し、そしてウエスタン・プロット分析に供した。具体的には、Lncap細胞を5 mlの均質化バッファー（250mMスクロース、10mM HEPES, 1 mM EDTA, pH8.1、1つの完全プロテアーゼ阻害剤錠（Boehringer Mannheim））中、ダウンス（dounce）・ホモジナイザーを用いてすりつぶした。ライゼート・サンプルを1000 g、5分間4 で遠心分離した。次にその上清を8000 g、10分間、4 で遠心分離した。8000 gの遠心分離からの上清を回収し、そして30分間、4 での100,000 gの遠心分離に供して周辺膜を回収した。

【0701】

次にサンプルをSDS-PAGEにより分離し、そして前記の条件を用いたマウス・モノクローナル抗体10E3-G4-D3（実施例17中に前記）によりウエスタン・プロットした。組換え精製P501S、並びにP501により形質導入し、そしてそれを過剰発現するHEK293細胞をP501S検出の陽性対照として含んだ。LCL細胞ライゼートを陰性対照として含んだ。P501Sを、Lncap全細胞ライゼート中、8000 g（内膜）画分中、及び100,000 g（原形質膜）画分中にも検出することができた。これらの結果は、P501Sが周辺膜で発現され、そしてそこに配置されていることを示している。

【0702】

10

20

30

40

50

配列番号519のペプチドに対して製造されたウサギ・ポリクローナル抗血清が、このペプチド並びに配列番号518の対応の天然ポリペプチドを特異的に認識することを証明するために、ELISA分析を実施した。この分析のために、平底96ウェル・マイクロタイター・プレートを配列番号519のペプチド、完全に予測された細胞外ドメインに及び配列番号520のより長いポリペプチド、P501S特異的抗体10E3-G4-D3により認識されるエピトープを表す配列番号521のペプチド、又は免疫性ペプチド配列を含まない（配列番号113の355～526アミノ酸に対応の）P501S断片のいずれかにより1 µg/mlで2時間37 °Cでコートした。

【0703】

ウェルを吸引し、1% (w/v) BSA含有リン酸緩衝生理食塩水により室温で2時間ブロックし、そして続いて0.1% Tween 20含有PBS (PBST) により洗浄した。精製抗P501Sポリクローナル・ウサギ血清をPBST中に2倍希釈 (1000ng～125ng) で加え、そして室温で30分間インキュベートした。引き続きこれをPBSTにより6回洗浄し、1:20000でHRPコンジュゲート・ヤギ抗ウサギIgG (H+L) Affinipure F (ab') 断片と一緒に30分間インキュベートした。次にプレートを洗浄し、そしてテトラメチル・ベンジジン中、15分間インキュベートした。1 N 硫酸の添加により反応を停止させ、そしてプレートをELISAプレート・リーダーを用いて450nmで読んだ。図11に示すとおり、抗P501Sポリクローナル・ウサギ血清は、免疫に用いた配列番号519のペプチド、並びに配列番号520のより長いペプチドを特異的に認識したが、しかし関連のないP501S由来のペプチド及び断片は認識しなかつた。

10

【0704】

さらなる研究において、ウサギをP501Sの配列由来のポリペプチドにより免疫し、そして図9に示すとおり細胞外又は細胞内のいずれかであるかを予測した。前記のとおり、ポリクローナル・ウサギ血清を分離し、そしてその血清中のポリクローナル抗体を精製した。P501Sとの特異的反応性を測定するために、P501S若しくは関連性のない抗原P703Pにより形質導入したB-LCL、又はワクシニア・ウイルス発現P501Sを注入したB-LCLのいずれかを用いたFACS分析を使用した。表面発現のために、死細胞及び損傷細胞を前記のとおり分析から除外した。細胞内染色のために、前記のとおり細胞を固定し、そして透過化処理した。P501Sの181～198アミノ酸に対応の配列番号548のペプチドに対して産生されたウサギ・ポリクローナル血清がP501Sの表面エピトープを認識することが分かった。

20

【0705】

異なる実験において無傷又は透過化処理細胞がこのポリクローナル血清により認識されたので、P501Sの543～553アミノ酸に対応の配列番号551のペプチドに対して産生されたウサギ・ポリクローナル血清は、細胞外又は細胞内いずれかの可能性をもつエピトープを認識することがわかった。同様の推理的な論法に基づき、それぞれP501Sの109～122、539～553、509～520、37～54、342～359、295～323、217～274、143～160、及び75～88アミノ酸に対応する配列番号541～547、549、及び550の配列は抗体に認識される潜在的な表面エピトープであると考えられうる。

30

【0706】

さらなる研究において、マウス・モノクローナル抗体を細胞外ドメインと予測されるP501Sの296～322アミノ酸に対して作った。A/JマウスをP501S/アデノウイルスにより免疫し、続いてP501Sの296～322アミノ酸を含むP501Nと称するE. coli (E. coli) 組換えタンパク質、及びKLHと結合した296～322ペプチド (配列番号898) により追加免疫した。続いてマウスを、抗ペプチド・ハイブリドーマ産生のための脾臓B細胞融合のために利用した。4F4 (IgG1、カッパ)、4G5 (IgG2a、カッパ)、及び9B9 (IgG1、カッパ) と称する、結果として得られた3種のクローンを抗体製造のために生育させた。4G5mAbを、その上清をProtein A-セファロース・カラムを通過させ、続いて0.2 M グリシン、pH 2.3を用いて溶出することで精製した。精製抗体を1 M トリス、pH 8の添加により中和し、そしてバッファーをPBSに交換した。

40

【0707】

ELISA分析のために、96ウェル・プレートを、全て2 µg/mlの濃度でP501Sペプチド296

50

~322 (長P501Sと称する)、関連のないP775ペプチド、P501S~N、P501TR2、長P501S-KLH、P501Sペプチド306~319 (短P501と称する)-KLH又は関連のないペプチド2073-KLHによりコートし、37℃で60分間インキュベートした。コーティング後、0.1% Tween含有PBSにより5回洗浄し、そして次に0.5% BSA、0.4% Tween 20含有PBSにより室温で2時間ブロッキングした。

【0708】

上清又は精製mAbの添加に続き、そのプレートを室温で60分間インキュベートした。プレートを前記のとおり洗浄し、そしてロバ抗マウスIgHRP結合2次抗体を添加し、そして室温で30分間インキュベートし、引き続き前記のとおり最後の洗浄をした。TMB基質を加え、そして暗闇の中室温で15分間インキュベートした。前記反応を1N H₂SO₄の添加により停止させ、そして吸光度を450nmで読んだ。3種のハイブリッド・クローンの全てが296~322ペプチド、及び組換えタンパク質P501Nを認識するmAbを分泌した。

10

【0709】

FACS分析のために、HEK293細胞を、Fugene 6 試薬を用いてP501S/VR1012発現構築物により一時的に形質導入した。培養2日後細胞を採取し、そして洗浄し、次に精製4G5 mAbと一緒に水上で30分間インキュベートした。PBSによる数回の洗浄の後、0.5% BSA、0.01% アザイド、ヤギ抗マウスIg-FITCを前記細胞に添加し、そして氷上30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、そして1% ヨウ化プロピジウム含有洗浄バッファーにより再懸濁し、そしてFACS分析に供した。FACS分析は、P501Sの296~322アミノ酸が細胞外ドメイン内に存在し、そして細胞表面に発現されていることを確かにした。

20

【0710】

P501Sの染色体配置を、Gene Bridge 4 Radiation Hybridパネル (Research Genetics) を用いて決定した。配列番号528及び529のPCRプライマーを製造者の指示に導きハイブリッド・パネルからのDNAプールによるPCRに使用した。38サイクルの増幅の後、反応産物を1.2% アガロース・ゲルにより分離し、そしてその結果をWhitehead Institute/MIT Center for Genome Research web server (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rh_mapper.pl) を通して分析し、有望な染色体配置を決定する。この方法を用いて、P501Sを第1染色体の長腕、WI-9641のq32~q42の間に位置付けた。第1染色体のこの領域は、遺伝性前立腺癌において前立腺癌感受性に関連している (Smith et al. Science 274 : 1371-1374, 1996、及びBerthon et al. Am. J. Hum. Genet. 62 : 1416-1424, 1998) これらの結果は、P501Sが前立腺癌悪性腫瘍において役割を担っていることを示唆する。

30

【0711】

実施例20 . 前立腺特異性抗原P501Sの発現調節

ステロイド (アンドロゲン) ホルモン調節は前立腺癌における一般的な治療の様相である。多くの前立腺組織特異性抗原の発現がアンドロゲンに対応することはこれまでに証明されている。アンドロゲン処理に対する前立腺特異性抗原P501Sの対応を以下の組織培養系により試験した。

【0712】

前立腺癌細胞株LNCaPからの細胞を 1.5×10^6 細胞 / T75フラスコ (RNA分離用) 又は 3×10^5 細胞 / 6ウェル・プレートのウェル (FACS分析用) で播種し、そして10% チャコール・ストリップ (charcoal-stripped) 牛胎児血清 (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) 含有RPMI 1640培地中で一晚培養した。さまざまな時点で加えた1nMの合成アンドロゲン・メチルトリエノロン (R1881 ; New England Nuclear) とともに10% チャコール・ストリップ牛胎児血清含有RPMI 1640培地中、さらに72時間細胞培養を続けた。次にRNA分離及びFACS分析のためにアンドロゲン添加後0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 28、及び72時間で細胞を採取した。FACS分析を抗P501S抗体10E3-G4-D3及び透過化細胞を用いて実施した。

40

【0713】

ノザン分析のために、5~10 µgの総RNAをホルムアルデヒド変性ゲルにより泳動し、Hybond-Nナイロン膜 (Amersham Pharmacia Biothech, Piscataway, NJ) に転写し、交差結合し、そしてメチレン・ブルーにより染色した。次にそのフィルターをChurch'sバッファ

50

ー (250mM Na₂HPO₄, 70mM H₃PO₄, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 1 % BSA, pH7.2) により65 で1時間プレハイブリダイズした。P501S DNAをHigh Primeランダム・プライムDNAラベリング・キット (Boehringer Mannheim) を用いて³²Pにより標識した。組み込まれていない標識をMicro Spin S300-HRカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて除去した。

【0714】

次に前記RNAフィルターを標識cDNAを含む新しいChurch'sバッファーにより一晩ハイブリダイズさせ、1 × SCP (0.1M NaCl, 0.03 M Na₂HPO₄ · 7 H₂O, 0.001 M Na₂EDTA)、1 % サルコシル (n - ラウロイルサルコシン) により洗浄し、そしてX線フィルムに感光させた。

FACS及びノザン分析の両者を用いて、P501Sメッセージ及びタンパク質レベルがアンドロゲン処理に対応して減少することが分かった。

【0715】

実施例21 . 前立腺特異的抗原の融合タンパク質の調製

この実施例は前立腺特異的抗原P703Pと端を切り取った形の既知の前立腺抗原PSAとの融合タンパク質の調製を記載する。端を切り取った形のPSAは活性セリン部位のあたりに21アミノ酸の欠失を有する。融合タンパク質についての発現構築体も停止コドンの直前である3 末端に制限部位を有し、追加の抗原のためのcDNAを加えることについて援助する。

【0716】

PSAについての全長cDNAを配列番号607及び608のプライマーを用いてヒト前立腺腫瘍組織からのRNAのプールからRT-PCRにより得て、pCR - ブランドII-TOPOベクター中にクローン化した。得られたcDNAを鋳型として用いて、2組のプライマー (配列番号609及び610並びに配列番号611及び612) を用いてPCRにより、PSAの2つの異ったフラグメントを作成した。予測したサイズを有するPCR生成物を鋳型として用いて配列番号611及び613のプライマーを用いてPCRにより、端を切り取った形のPSAを作成した。これはPSAを生じた (アミノ酸中のデルタ208~218)。5 末端に6 × ヒスチジン標識を有する成熟した形のP703PについてのcDNAをP703P及び配列番号614及び615のプライマーを用いてPCRにより調製した。

【0717】

次いで、P703Pと端を切り取った形のPSAとの融合についてのcDNA (FOPPという) を、改変したP703P cDNA及び端を切り取った形のPSA cDNAを鋳型として、配列番号614及び615のプライマーを用いて得た。FOPP cDNAを発現ベクターpCRX1のNdeI部位及びXhoI部位中にクローン化し、DNA配列決定により確認した。融合構築体FOPPについての決定したcDNA配列を配列番号616として提供し、アミノ酸配列を配列番号617として提供した。

【0718】

融合FOPPを以下のように大腸菌中に単一組換えタンパク質として発現させた。発現プラスミドpCRX1FOPPを大腸菌株BL21 - コドンプラスPIL中に形質転換した。形質転換体は1 mMのIPTGを用いる誘発によりFOPPタンパク質を発現することが分かった。対応する発現クローンの培養を50 µg/mlのカナマイシン及び34 µg/mlのクロラムフェニコールを含有する25 mlのLBブロス中に接種し、約1のOD600までの37 で増殖させ、4 で一夜貯蔵した。培養を50 µg/mlのカナマイシン及び34 µg/mlのクロラムフェニコールを含有する1リットルのTB LB中に希釈し、0.4のOD600まで37 で増殖させた。1 mMの最終濃度となるまでIPTGを加え、培養を30 で3時間インキュベートした。

【0719】

細胞を5,000RPMで8分間遠心分離することによりペレット化した。タンパク質を精製するために、細胞ペレットを25mlの10mMのトリス - Cl pH8.0, 2 mMのPMSF (完全なプロテアーゼ阻害剤) 及び15 µgのリゾチーム中に懸濁した。細胞を4 で30分間溶解させ、数回超音波処理し、溶解物を10,000 × gで30分間遠心分離した。封入体を含有する沈澱物を10 mMのトリス - Cl pH8.0及び1 %のCHAPSで2回洗浄した。封入体を40mlの10mMのトリス - Cl pH8.0, 100mMのリン酸ナトリウム及び8 Mの尿素に溶解した。

【0720】

10

20

30

40

50

溶液を 8 ml の NiNTA (Qiagen) に室温で 1 時間結合させた。混合物を 25ml のカラムに注ぎ、50ml の 10mM の トリス - Cl pH6.3, 100mM の リン酸ナトリウム、0.5% の DOC 及び 8 M の尿素で洗浄した。結合タンパク質を 350mM の イミダゾール、10mM の トリス - Cl pH8.0, 100mM の リン酸ナトリウム及び 8 M の尿素で溶出させた。FOPPタンパク質を含有する分画を一緒にして、10mM の トリス - Cl pH4.6 に対して広範囲にわたって透析し、分取し、-70 で貯蔵した。

【0721】

実施例22. 前立腺がん患者の末梢血中の前立腺特異的抗原P501SのリアルタイムのPCR特性付け

正常な個体及び転移前立腺がん患者の新鮮な血液から、循環する上皮細胞を単離し、mRNAを単離し、リアルタイムPCR手順を用いてcDNAを調製した。リアルタイムPCRを遺伝子発現レベルを決定するために遺伝子特異的プライマーとプローブの両方を用いて、Taqman (商標) 手順で実施した。

免疫磁性ビーズ分離法 (Dynal A.S., ノルウェー国オスロ) を用いて血液サンプルから上皮細胞を富化した。単離細胞を溶解させ、磁性ビーズを除去した。次いで、溶解物を Oligo (dT) 25 で被覆した磁性ビーズを用いてポリ A + mRNA 単離のために処理した。緩衝液中のビーズを洗浄した後、ビーズ / ポリ A + RNA サンプルを 10mM の トリス HCl pH8.0 に懸濁し、逆転写をさせた。

【0722】

生じた cDNA を遺伝子特異的プライマーを用いるリアルタイムPCRにかけた。ベータアクチン含量も測定し、標準化のために用いた。正常のサンプルの平均 + 3 標準偏差よりも多い P501S を有するサンプルは陽性と考えた。血液サンプルについてのリアルタイムのPCRを Taqman (商標) 手順を用いるが、ただし、前進及び逆向プライマー並びに P501S に特異的なプローブを用いて 50 サイクルまで拡大して実施した。試験した 8 サンプル中、6 つのサンプルは P501S 及び - アクチンシグナルに陽性であった。残りの 2 つのサンプルには - アクチンまたは P501S は検出されなかった。4 つの試験した正常なサンプル中には P501S シグナルは認められなかった。

【0723】

実施例23. SCIDマウス継代前立腺腫瘍における前立腺特異的抗原P703P及びP501Sの発現

前立腺がんの治療における抗原の有効性を考える時、アンドロゲン切除療法中の腫瘍における抗原の継続した存在が重要である。テストステロンの存在下で SCID マウスにおいて増殖した前立腺腫瘍サンプル中の前立腺特異的抗原 P703P 及び P501S の存在を次のように評価した。

【0724】

骨まで転移した 2 つの前立腺腫瘍を患者から除去し、SCID マウスに移植し、テストステロンの存在下に増殖させた。腫瘍を SYBR グリーンアッセイ法を用いる定量リアルタイムPCRを用いて、P703P、P501S 及び PSA の mRNA 発現について評価した。前立腺腫瘍中の P703P 及び P501S の発現を陽性の対照として、正常な腸及び正常な心臓におけるその不存在を負の対照として用いた。両方の場合において、特異的 mRNA は遅い継代腫瘍において存在した。骨の転移はテストステロンの存在において増殖したので、これは、これらの遺伝子の存在はアンドロゲン切除療法中になくならなかったであろうということを暗示する。

【0725】

実施例24. 前立腺癌患者におけるP501S及びP703P - 特異的抗体の同定

前立腺癌患者は正常な健康ドナーの血清における前立腺抗原 P501S 又は P703P に対して特異的に抗体応答を次の通りに試験した。

血清のウェスタンブロット分析及び ELISA 分析の両者を、P501S ペプチド (配列番号 985 - 987) 及び P703P ペプチド (配列番号 988 - 990) を用いて行った。配列番号 985, 986 及び 987 は、P501S のそれぞれの アミノ酸 231 - 250, 246 - 266 及び 492 - 521 を表す。配列番号 988, 989, 990, 1030, 1031, 1032 及び 1033 は、P703P のそれぞれ アミノ酸 110 - 124, 140 - 154, 190 - 204, 62 - 76, 91 - 106, 200 - 214 及び 229 - 245 を表す。

10

20

30

40

50

【0726】

その結果は、何人かの前立腺癌患者が、P501S又はP703Pのいずれか同じペプチド（すなわち、同じエピトープ）を認識する抗体を有し、そしてそれらの共通するエピトープは、正常ドナーからの血清により認識されないか又は有意に低いレベルで認識されたことを示した。そのデータは、48人の前立腺癌患者のうち少なくとも14人がP501S - 特異的抗体を有し、そして48人の前立腺癌患者のうち3人がP703P - 特異的抗体を有し、そしてP501Sに対して特異的な抗体及びP703に対して特異的な抗体の両者を有する患者は存在しないことを示した。

【0727】

実施例25 . 抗 - P503Sモノクローナル抗体はインビボにおける腫瘍の増殖を阻害する
抗 - P503Sモノクローナル抗体20D4のネズミにおける腫瘍形成を抑制する能力を次のように調べた。

10匹のマウスにP503Sを発現したHEK293細胞を皮下注射した。5匹のマウスは0日、5日及び9日（腫瘍細胞の注射時）に150 µgの20D4を静脈注射で受け取った。腫瘍のサイズを50日間測定した。20D4を受け取らなかった5匹のマウスの内、3匹は約2週間後に検出可能な腫瘍を形成し、それは研究の間中大きくなり続けた。それに対して、20D4を受け取った5匹のマウスのいずれもが腫瘍を形成しなかった。これらの結果は、抗 - P503S Mab 20D4がインビボにおける強力な抗 - 腫瘍活性を発揮することを示す。

【0728】

実施例26 . P501S特異的T細胞クローンからのT細胞受容体クローンの特徴付け

T細胞は限定された寿命を有する。しかしながら、T細胞受容体（TCR）鎖のクローン化及びそれに続く転移はT細胞特異性の無限の伝播を本質的に可能にする。腫瘍抗原TCR鎖のクローン化は、TCR MHC-制限アレルを共有する患者から単離されたT細胞にその特異性の転移を可能にする。次いで、このようなT細胞を発達させ、抗原を発現する腫瘍を担う患者に腫瘍抗体特異性を導入するために選択の転移環境で用いることができるだろう。前立腺特異的抗原P501Sに特異的なCD8

T細胞クローンからのT細胞受容体アルファ及びベータ鎖を以下のように単離し、配列決定した。

【0729】

CTLクローン4E5（前記実施例12に記載された）からの 2×10^6 細胞からの全mRNAをTrizol試薬を用いて単離し、cDNAを合成した。このクローン中のVa及びVb配列を決定するために、一連のVa及びVbサブタイプ特異的プライマーを合成し、各クローンから生じたcDNAとのRT-PCR反応に用いた。RT-PCR反応は、各クローンがVb7サブファミリーに対応する共通のVb配列を発現したことを示した。さらに、そのクローンから生じたcDNAを用いて、発現したVa配列はVa6であると決定された。クローン4E5から全長TCRアルファ及びベータ鎖をクローン化するために、開始及び停止コードTCRヌクレオチドにわたるプライマーを設計した。

【0730】

プライマーは次のとおりであった：TCR Vアルファ₆ 5'（センス）：GGATCC---GC CGCCACC - ATGTCACCTTTCTAGCCTGCT（配列番号899）BamHI部位Kozak TCRアルファ配列TCRアルファ₃（アンチセンス）：GTCGAC---TCAGCTGGACCACAGCCGCGAG（配列番号900）SalI部位TCRアルファ不変配列TCR Vベータ₇ 5'（センス）：GGATCC---GCCGCCACC--ATGGGC TGCAGGCTGCTCT（配列番号901）BamHI部位Kozak TCRアルファ配列TCRベータ₃（アンチセンス）：GTCGAC---TCAGAAATCCTTTCTC TTGAC（配列番号902）SalI部位TCRベータ不変配列。CTLクローン及び上記プライマーから合成したcDNAを用いて、校正熱安定性ポリメラーゼPWO（Roche、ニュージャージー州ナットレイ）を用いて標準的な35サイクルのRT-PCR反応を確立した。

【0731】

得られた特異的なバンド（アルファについては約850塩基対、ベータについては約950塩基対）をPCRプラントベクター（Invitrogen）に連結し、大腸菌に形質転換した。全長の

10

20

30

40

50

アルファ及びベータ鎖を含有するプラスミドを形質転換された大腸菌を同定し、対応するプラスミドの大規模調製を引き起こした。全長のTCRアルファ及びベータ鎖を含有するプラスミドを配列決定のために提出した。配列決定反応Vb及びVa鎖について決定されたcDNA配列を有する全長のTCRアルファ及びベータ鎖のクローン化がそれぞれ配列番号903及び904で示されることを証明した。対応するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号905及び906に示す。Va配列はVa6.2と99%同一(348/348)であり、VbはVb7(336/338)と99%同一であることがヌクレオチド配列アラインメントで分かった。

【0732】

実施例27. 前立腺抗原P503Sを用いての前立腺特異的細胞の捕捉

上記の通り、P503Sは前立腺細胞の表面に見出される。マウスIgGに特異的な二次被覆マイクロスフェアビーズを、精製されたP503S - 特異的モノクローナル抗体1D12に連結した。次に、結合されたP503S抗体を用いて、組換えP503Sを発現するHEK細胞を捕捉した。これは、血液中の前立腺細胞の検出、従って前立腺癌の検出において通常使用することが出来る、前立腺 - 特異的細胞捕捉のためのモデル系を提供する。

10

【0733】

P503SでトランスフェクトしたHEK細胞を取得し、そして洗浄緩衝液(PBS、0.1%BSA、0.6%クエン酸ナトリウム)中に適当な体積で再溶解しサンプル当たり少なくとも5細胞とした。ビーズを用いる全ての手法のために丸底エッペンドルフチューブを用いた。ストック濃度は表IXに示すとおりである。

20

【0734】

【表10】

表IX

ストック濃度	サンプル濃度	必要量
上皮細胞濃縮ビーズ4 ⁸ ビーズ/ml (DynaI Biotech. Inc. Lake Success, NY)	1 ⁷ ビーズ/ml	5ml体積当り125 μ lストック
1D12腹水抗体2mg/ml	0.1 μ g/ml (0.1 \times) ~ 5 μ g/ml (5 \times) タイトレーション	サンプル当り0.05 μ l ~ 2.5 μ lストック
α -哺乳類Mu 0.9mg/ml	1 μ g/ml (1 \times)	サンプル当り1.1 μ lストック
パン-マウスIgGビーズ4 ⁸ ビーズ/ml (DynaI Biotech)	1 ⁷ ビーズ/ml	5ml体積当り125 μ lストック

30

【0735】

ブロックされた免疫磁気(イムノマグネティック)ビーズを次のようにして前洗浄した: 必要な全てのビーズをプールし、そして1mLの洗浄緩衝液で1回洗浄した。ビーズを、1%のBSA(v/v)を含む洗浄緩衝液3体積中に再懸濁し、そして4にて15分間回転させながらインキュベートした。次に、ビーズを2体積の洗浄緩衝液で3回洗浄し、元の体積に再懸濁した。ブロックされていないビーズをプールし、2体積の洗浄緩衝液で3回洗浄し、そして元の体積に再懸濁した。

40

【0736】

一次抗体を二次ビーズと共に、新たなエッペンドルフ中で4にて30分間、回転させながらインキュベートした。サンプルの均一な混合のため、約200 μ Lの戦場緩衝液を加えて全体積を増加させた。抗体 - ビーズ溶液を新たなエッペンドルフに移し、同体積の洗浄緩衝液で2回洗浄し、そして元体積に再懸濁した。各サンプルに標的細胞を加え、そして4

50

にて45分間回転させながらインキュベートした。チューブをマグネットの移し、ビーズを攪拌しないように注意しながら上清を除去、そして1 mLの洗浄緩衝液で2回洗浄した。次に、サンプルを、Dynabeads mRNA direct microkit (DynaL Biotech) を用いるRT-PCRのために準備した。

【0737】

上皮細胞濃縮物をマグネット内に置き、そして上清を除去した。次に、上皮細胞濃縮ビーズを、ルナシン (Runasin) (サンプル当り 2 U/μL) を添加した細胞溶解/結合緩衝液 100 μL 中に再懸濁し、そして使用するまで -70 °C で貯蔵した。Oligo(dT₂₅) Dynabeads を次のようにして前洗浄した：必要な全てのビーズをプルし (23 μL/サンプル)、過剰体積の細胞溶解/結合緩衝液で3回洗浄し、そして元の体積に再懸濁した。細胞溶解上清をマグネットにより分離し、そして新たなエペンドルフに移した。サンプル当り 20 μL の Oligo(dT₂₅) Dynabeads を添加し、そして室温にて5分間回転させた。マグネットを用いて上清を分離し、そして廃棄し、mRNA をビーズにアニールさせた。ビーズ/mRNA複合体を緩衝液で洗浄し、そして冷Tris-HCl中に再懸濁した。

10

【0738】

RT-PCRのため、Tris-HCl上清を分離し、そしてMPRをもちいて廃棄した。15個以下の細胞を含む各サンプルにつき、次のものを加えて全量30 μLとした：1.5 μLの水、1.5 μLのBSA、6 μLの第1鎖緩衝液、0.75 mLの10 mM dNTP混合物、3 μLのルナシン (Runasin)、3 μLの0.1 M dTT、及び1.5 μLのSuperscript II。得られた溶液を42 °Cにて1時間インキュベートし、水中に1:5で希釈し、80 °Cにて2分間加熱して、cDNAをビーズから脱着させ、そしてすぐにMPS上に置いた。cDNAを含有する上清を新たなチューブに移し、そして-20 °Cで貯蔵した。

20

表Xは、P503SでトランスフェクトしたHEK細胞の捕捉のパーセントをRT-PCRにより測定した結果を示す。

【0739】

【表11】

表X

30

	捕捉% P503SがトランスフェクトされたHEK細胞	捕捉% LnCAP細胞
0.1 μg/ml P503S Mab	36.90	0.00
0.5 μg/ml P503S Mab	67.40	2.93
1 μg/ml P503S Mab	40.22	0.00
5 μg/ml P503S Mab	13.11	0.00
抗-Muビーズのみ、 ブロックなし	1.42	0.00
抗-Muビーズのみ、 ブロックあり	15.65	20.21
絶対対照捕捉細胞なし	100.00	100.00

40

【0740】

実施例28. 組換えP703Pによるマウスの免疫化

インビボ免疫原性研究を、種々のP703P組換えタンパク質配合物を用いて行なった。特に、マウスグループを、下記表XIに示されるP703P配合物により免疫化し、前記表におい

50

ては、“C’アミド化P703”とは、C末端でアミド化されたP703を表し；“切断されたP703P”とはP703Pの切断された形を表し、そして“FOPP”とは、P703P及びPSAの融合を表す。

【0741】

【表12】

表X I

グループ	抗原	用量	源	アジュバント	経路
1	C’アミド化されたP703P	20 ug	E. コリ	AS1	Im, sq (fp)
2	切断されたP703P	20 ug	E. コリ	AS1	Im, sq (fp)
3	C’アミド化されたP703P	20 ug	ピチア	AS1	Im, sq (fp)
4	P703P	20 ug	ピチア	AS1	Im, sq (fp)
5	FOPP	20 ug	E. コリ	AS1	Im, sq (fp)
6	P703P	10 ⁷ pfu		なし	Sq base of tail
7	C’アミド化されたP703P	20 ug	E. コリ	MPL-SE	Im, sq (fp)
8	切断されたP703P	20 ug	E. コリ	MPL-SE	Im, sq (fp)
9	C’アミド化されたP703P	20 ug	ピチア	MPL-SE	Im, sq (fp)
10	P703P	20 ug	ピチア	MPL-SE	Im, sq (fp)
11	FOPP	20 ug	E. コリ	MPL-SE	Im, sq (fp)
12	対照				

10

20

30

【0742】

個々のタンパク質免疫化を、4種の部位において、すなわち両フットパッドにおいて皮下的に（sq）及び脚において筋肉内的に（im）行なった。個々の免疫化は3週離れて行なわれ、そして血清+脾臓及びリンパ節（LN）細胞を、最後の免疫化の10日後に収穫した。

T細胞増殖及びインターフェロン-アッセイを、次の通りに行なった。250,000の脾臓又は100,000のLN細胞を、96ウェルプレートにプレートし、そして1-10µg/mlの抗原により刺激した。試験される抗原は、上記に列挙される5種のタンパク質、バキュロウィルスにおいて発現されるP703P、NS1対照タンパク質、PSA（FOPPグループのみのための）及びP703Pペプチドプールを包含する。ペプチドプールは、6-8のペプチドを含む個々のプールと共に、15個のアミノ酸によりオーバーラップする20-マーペプチドから成る。Con Aは、正の対照として使用された。培養物を、増殖をアッセイするために、培養の開始後4日でH³-チミジンによりパルスした。ELISAによりIFNレベルをアッセイするために、上清液をまた、4日目で採取した。さらに、血清をプールし、そして上記に列挙される組換えタンパク質に対するIgG抗体についてELISAによりアッセイした。

40

【0743】

すべての免疫原はその免疫原に対して強い抗体応答を誘発した。すべての場合、それらの応答は、他のP703Pタンパク質源と反応し、例えばP703Pのピチア形及びバキュロウィルス形の両者と強く反応した。ASIアジュバントは、MPL-SEよりも強い抗体応答を誘発した。P703Pのピチア及びバキュロウィルス形に対する応答の点での最良の免疫原はFOPPであ

50

るが、しかしすべての免疫原は、E. コリ由来のP703Pに対して強い反応性のP703P抗体応答を誘発した。増殖及びインターフェロン - アッセイにおいては、すべての免疫原は、その免疫原のかなり良好なT細胞応答を誘発し、そしてそれらの免疫原に対する検出できる応答を有するほとんどの動物はまた、他のP703Pタンパク質源に対して応答する。再び、AS1アジュバントは、MPL - SEよりも良好なT細胞応答を誘発した。

【 0 7 4 4 】

実施例29 . 免疫組織化学 (IHC) による前立腺癌及び正常組織におけるP702P発現の分析
前立腺癌抗原P702Pのタンパク質発現を、抗 - P703Pポリクローナル及びモノクローナル抗体のアレイを用いて、IHC分析により、前立腺癌及び正常組織において分析した (表XIIを参照のこと) 。 P703Pタンパク質発現をまた、同じ抗 - P703P抗体を用いて、流動細胞計測法及びウェスタンブロット分析により、HEK293/P703Pトランスフェクトにおいて分析した。 P703 - R087及びP703P - 2059抗体は、流動細胞計測分析によりHEK293/P703Pトランスフェクタントを染色した。 P703P - 2594を、ウェスタンブロット分析のために使用した。

【 0 7 4 5 】

【表 1 3】

表XII

抗体	ロット#	種/型	免疫原	精製
P703P-2594	370-84	ウサギポリクローナル	細菌由来の切断されたP703P(c-末端159aa)	免疫原
P703P-9245	690.46	ウサギポリクローナル	細菌由来の十分な長さのP703/NS1融合体	タンパク質A
P703-2D4		ウサギモノクローナル	細菌由来の切断されたP703P(c-末端159aa)	タンパク質A
P703-8H2		ウサギモノクローナル	細菌由来の切断されたP703P(c-末端159aa)	タンパク質A
P703-7H8		ウサギポリクローナル	細菌由来の切断されたP703P(c-末端159aa)	免疫原
P703P-2059	690.88	ウサギポリクローナル	バキュロウィルス由来の十分な長さの形	タンパク質A
P703P-R087		ウサギモノクローナル	バキュロウィルス由来の十分な長さの形	タンパク質A
P703P-R080		ウサギモノクローナル	バキュロウィルス由来の十分な長さの形	タンパク質A
PA-P703P-9245	858-130	ウサギポリクローナル	細菌由来の十分な長さのP703/NS1融合体	タンパク質A
AP-P703P-9245	858-109	ウサギポリクローナル	細菌由来の十分な長さのP703/NS1融合体	バキュロウィルス、十分な長さ

【0746】

前立腺癌抗原P703Pタンパク質の組織発現をさらに評価するために、免疫組織化学(IHC)分析を、種々の範囲の組織切片に対して行なった。組織サンプルを、ホルマリン溶液に12-24時間、固定し、そして8ミクロンの切断にスライスする前、パラフィンに包埋した。0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中、蒸気熱誘発されたエピトープ回復(SHIER)を、最適染色条件のために使用した。切片を、10%血清/PBSと共に5分間インキュベートした。一次抗体を、個々の切片に、示される濃度で25分間、添加し、続いて抗-ウサギピオチニル化された抗体と共に25分間インキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性を、水素ペルオキシダーゼと共に3度の1.5分間インキュベーションにより阻止した。

アビジンビオチン複合体/ホースラディッシュペルオキシダーゼ (ABC/HRP) システムを、DA B色原体と共に使用し、抗原発現を可視化した。

【0747】

スライドをヘマトキシリンにより対比染色し、細胞核を可視化した。ウェスタンブロット分析に関しては、全細胞溶解物を、Triton - X100含有溶解緩衝液において細胞を、氷上で30分間インキュベートすることによって生成した。次に溶解物を、10,000rpmで5分間、4 で遠心分離することにより透明にした。サンプルを、 -メルカプトエタノールを含むSDS - PAGE負荷緩衝液により希釈し、次に、SDS - PAGEゲルの負荷の前、10分間、煮沸した。タンパク質を、ニトロセルロースに移し、そして1 µg/mlの精製された抗 - P703 Pウサギポリクローナル血清2594 (ロット番号370 - 84) 又はウサギモノクローナルP703P - R087を用いてプローブした。プロットを、結合されるヤギ抗 - ウサギIgを用いて、続いてECL基質においてインキュベートすることにより表わした。

10

【0748】

FACS分析に関しては、P703P/HEK293トランスフェクタントの単一の細胞懸濁液を生成し、そして細胞を、浸透緩衝液 (PBS + サポニン + BSA) において室温でインキュベートした。次に細胞を、10 µg/mlの精製された抗 - P703Pポリクローナル血清又はポリクローナル抗体と共に30分間インキュベートした。浸透緩衝液による3回の洗浄の後、細胞を、ヤギ抗 - ウサギIg (H+L) - FITC (Southern Biotechnology) の1 : 100希釈溶液と共にRTで30分間インキュベートした。3回の洗浄の後、細胞を、緩衝液に懸濁し、そしてFACSにより分析した。

20

【0749】

最適IHC結果は、熱回復、及び十分な長さのP703に対する親和性精製されたAP - P703P - 9245抗体を用いて得られた。この抗体と共に上記方法を用いてのIHC分析は、6/23の転移性前立腺癌切片において弱い染色を示した。24/33の一次前立腺癌切片がこの抗体に関して陽性の染色を示した。さらに、染色は、種々の前立腺癌における悪性管、良性 (正常管)、種々の前立腺癌における基底、筋上皮細胞、肥満細胞において、及びリポフスチン顆粒に関連して観察された。

正常組織、例えば脳、乳房、子宮、耳下腺、脾臓、肝臓、卵巣、副腎、頸部、扁桃、食道、気管支、肺、腎臓、膵臓、骨格筋、結腸、小腸、皮膚及び甲状腺切片はすべて陰性であった。

30

【0750】

実施例30. 細胞捕獲技法を用いての末梢血液における循環前立腺細胞の検出

前立腺癌、良性前立腺過形成 (BPH)、膀胱及び他の前立腺疾患を有するものとして診断された55人の泌尿器患者の末梢血液を採血し、そして転移性腫瘍細胞を特異的に捕獲するために上皮 特異的抗体Ber - EP4により被覆された磁気ビーズを使用するDynal Epithelial Enrichキットを用いて処理した。次に、全RNAを、QIAGEN Rneasy Miniキット (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて単離し、DNアーゼ処理し、そして第1鎖cDNAを、Life Technologies Superscript II Rnase H 逆転写酵素 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて、細胞捕獲画分から合成した。

【0751】

同時PCRを、対照としてハウスキーピング遺伝子、すなわちアクチン、 - 2 - マイクログロブリン及びサイトケラチン19を用いて、前立腺腫瘍遺伝子P501S (L1 - 12、例えば配列番号110としても言及される)、P703P (例えば配列番号524)、P503S (L1 - 12、例えば配列番号110としても言及される)、P703P (例えば配列番号524)、P503S (N1 - 1862、例えば配列番号111とも称する)、P504S (F1 - 12、例えば配列番号107とも称する)、P510S (例えば配列番号535及び536)、及びP1020C (22553、例えば配列番号591とも称する) の発現のレベルを評価するために行なった。

40

【0752】

P501S及びP504Sの発現パターンを組合すことによって、本発明者は、膀胱及び他の前立腺患者グループについての平均的シグナルに比較して、10/24の前立腺癌患者及び4/25のB

50

PH患者について組合された2種の遺伝子の少なくとも2倍の過剰発現を検出することができた。少なくとも2倍の平均過剰発現がまた、BPH、及び遺伝子P501S、P503S、P703、P504S及びP510Sについて膀胱癌/他の前立腺患者グループに比較して、癌グループにも検出された。さらに、同じサンプルを、P501S、P504S及びP510Sにより同定した。従って、細胞獲得に続いて、血液サンプルにおいて同定される前立腺腫瘍配列の発現サンプルを、患者における循環腫瘍細胞、例えば転移性腫瘍細胞の検出において、診断手段として利用することができる。

【0753】

実施例31 . P703P由来のCD4⁺ T細胞エピトープの同定

P703Pタンパク質配列のアミノ酸47~254に及び10個のアミノ酸によりオーバーラップする合計40の15-マーペプチドを、標準方法により生成した。樹状細胞(DC)を、標準方法により、GMCSF及びIL-4を用いて、正常な女性のドナーのPBMCから誘発した。CD4 T細胞を、MACSビーズ及び負の選択を用いて、DCと同じドナーから生成した。CDを、それぞれ0.24 µg/mlの最終濃度での10の152-ペプチドを含むプールにより一晩パルスした。パルスされたDCを洗浄し、そして 1×10^4 細胞/ウェルで、96-ウェル丸底プレートにプレーンし、そして精製されたCD4 T細胞を 1×10^5 /ウェルで添加した。培養物を、60ng/mlのIL-6及び10ng/mlのIL-12により補充し、そして37°Cでインキュベートした。培養物を、上記のようにして再刺激し、そして5ng/mlのIL-7及び10 µg/mlのIL-2により補充された、上記のように精製され、そしてパルスされたCDを、APCとして用いて、特定の増殖について試験した。

【0754】

5回のインビトロ刺激サイクルに続いて、系(個々の系は1つのウェルに対応する)を、P703P配列に由来するペプチドの不適切なプールに対する、刺激プールに反応して増殖及びサイトカイン生成についてアッセイした。刺激ペプチドプールに反応して、特定の増殖(標準のトリチウム化されたチミジン増殖アッセイにお測定される)及びサイトカイン生成(γ-インターフェロンELISAアッセイにおいて測定される)を示す12の系を同定した。それらの系はさらに、ペプチドの特定の認識、プールにおける個々のペプチドの特定の認識、及び組換えP703Pタンパク質の特定の認識について試験された。このアプローチを用いて、MHCクラスIIに関連してCD4⁺ T細胞により認識される、前立腺腫瘍特異タンパク質、P703Pに由来するペプチドエピトープが同定された。そのペプチドは、配列番号525のP703Pのタンパク質配列のアミノ酸145-159に反応し、そして配列GNSCLVSGWGLLANG(配列番号992)を有する。このエピトープをコードするcDNA配列は、配列番号991で示される。

【0755】

実施例33 . P706P拡張された配列の同定

前立腺-特異的発現パターンを有する関連するクローンを、上記例1において同定した(例えば、配列番号46, 212, 213, 214, 215, 288及び415)。さらなる分析に基づいて、それらのクローンについての拡張された配列を次の通りに同定した。配列特異的プライマーを用いて、前立腺腫瘍ライブラリーからの生成物を増殖し、クローン8B6-P3(配列番号993)及び8B6-P4(配列番号994)の同定をもたらした。両クローンをを用いて、適切な細胞を形質転換し、単離し、配列決定し、そして得られる配列を、Genbank配列データベースを調べるために使用した。

【0756】

この調査は、8B6-P3及び8B6-P4、及び他の関連するEST配列が同じゲノム7g21 BACクローンの成分であることを示した。ゲノム主鎖にそっての密接した接近性及び類似する発現プロフィールに基づけば、それらの成分は、本明細書においてP706Pとして言及される、同じ遺伝子の一部であることが結論づけられる。ノザン分析は、前立腺腫瘍及び前立腺組織における高い過剰発現を示し、そしてまた、脳及び卵巣における発現も示した。本明細書に開示される4種の配列(配列番号993-997)は、ゲノム主鎖にそってのcDNA-由来の配列の4種の最長の連続した断片の代表である。入手できるEST配列を用いての、ク

ローン8B6.P3 (配列番号993) 及び 8 - B5.P4 (配列番号994) の接近性が、配列番号995に示される拡張されたP706P配列同定を可能にした。

【0757】

実施例34 . P713P拡張された配列の同定

P219とも称する配列番号146の同定は、上記に記載された。この例は、このクローンについての拡張された配列の同定、及び十分な長さのcDNA及びそれを含むタンパク質配列の生物情報科学的同定を記載する。十分な長さの実験クローニング努力を、EST調査及び一列整列により開始した。このアプローチにより同定される配列を、5' RACEアッセイ (Clontech; Chenchikなど., 1995を参照のこと) により確かめ、ここで前記アッセイにおいて、アダプター連結された前立腺腫瘍cDNAのライブラリーが、5' アダプタープライマー及び遺伝子特異的3' プライマーを用いて、遺伝子の所望する5' 末端を増幅するために鋳型とともに使用される。

10

【0758】

追加の配列を、核酸に基づくスクリーンを用いて同定し、ここでファゲミド前立腺腫瘍ライブラリーを、ブランクを増殖し、ナイロンフィルター上に移し、そして固定し、そして放射性遺伝子特異的プローブによりハイブリダイズすることによりスクリーンした。次に、フィルターをフィルムに暴露し、そして放射性暴露された陽性ヒットに対応するブランクを採取し、そしてDNA単離のために調製した。上記アプローチを用いて同定されたDNA配列は、元のクローン配列を確かめ、そしてさらに、追加の5' 配列を生成した。P713Pとも称する、拡張されたcDNA配列は、配列番号998で示される。別の分析においては、P713Pが前立腺分泌タンパク質 (PSP) として言及されるタンパク質に対応することが決定されており、その十分な長さのcDNA配列は、配列番号1000で示されるアミノ酸配列をコードする配列番号999で示される。

20

【0759】

実施例35 . P1E拡張された配列の同定

P1Eとも称する、配列番号620、621及び622で示されるcDNA配列の同定は、上記例1に記載された。それらの配列は、血清学的発現クローニング努力及びその同じcDNA発現ライブラリーの続く核酸スクリーニングに起因した。発現cDNAライブラリーを、通常の方法を用いて、前立腺腫瘍抽出されたmRNAから構成した。このライブラリーは、自己由来の患者血清によりスクリーンされた。(前立腺腫瘍及び患者血清は同じ個人からであった)。10,000pfuを、6個の大きなLB寒天プレート上にプレートし、6時間までの増殖を可能にし、そしてIPTG - 注入されたフィルターを適用し、それらが生成されるにつれて、発現及び固定されたタンパク質を誘発した。フィルターをプレートに配向し、そして12時間後、除去した。フィルターを、PBS 1% Tweenにおいて阻止し、そして次に、患者の血清と共に4で12時間インキュベートした。洗浄されたフィルターを、1~125の接合されたタンパク質Aにおいて室温で1時間インキュベートし、再び洗浄し、そしてフィルターに一晚、暴露した。自己由来の血清により認識される、発現されたタンパク質を示すフィルター上の暴露されたスポットを取り、精製し、プラスミドを切除し、そしてDNA単離及び続く配列決定のために調製された。この方法は、クローンPT44A22の同定に起因した。

30

【0760】

プライマーを、同じ発現ライブラリーをさらにスクリーンするために、PT44A配列から企画した。プローブラベリングのために、元のPT4A22 DNAフラグメントのPCR増幅を、放射性ヌクレオチドの存在下で行なった。プローブを、発現ライブラリーの10000 - 15000のクローンのDNAが固定されているナイロンフィルターと共にインキュベートした。Church ハイブリダイゼーション緩衝液における65での数時間のハイブリダイゼーションの後、フィルターを1x SCP、1% サルコシルの溶液において洗浄した。フィルムを、洗浄されたフィルターに一晚、暴露し、そして陽性シグナルを、適切なコロニーを採取するために使用した。それぞれ約50のコロニーを含むそれらの収穫物をさらに、前に記載された方法により精製し、純粋なコロニー収穫物をもたらし、次に、増殖し、そしてプラスミドDNAを調製した。興味あるクローンを含むプラスミドをフラグメントサイズのために消化し、

40

50

そして挿入体を、フランキングプロモータープライマーを用いて、配列決定した。この方法が、クローンPT44.P2をもたらした。全体として、PT44A22及びPT44.P2は、配列番号1005で示されるアミノ酸配列をコードする、配列番号1004として本明細書に開示される拡張されたP1E配列を構成する。

【0761】

実施例36 . P510Sの免疫組織化学的分析

前立腺特異的遺伝子P510Sの同定は、上記に記載される(例1)。P510Pタンパク質発現を評価するために、免疫組織化学(IHC)分析を、種々の範囲の組織切片に対して行った。組織サンプルを、ホルマリン溶液において12-24時間、固定し、そしてパラフィンに包埋し、その後、8ミクロンの切片にスライスした。0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)中、蒸気熱誘発せられたエピトープ回復(SHIER)を、最適染色条件のために使用した。切片を、10%血清/PBSと共に5分間インキュベートした。一次抗体を、示される濃度で24分間、個々の切片に添加し、続いて、抗-ウサギビオチニル化された抗体と共に25分間インキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性を、水素ペルオキシダーゼと共に3回の1.5分間のインキュベーションにより阻止した。アビジンビオチン複合体/ホースラディッシュペルオキシダーゼ(ABC/HRP)システムを、DAB染色体と共に使用し、抗原発現を可視化した。スライドを、ヘマトキシリンにより対比染色し、細胞核を可視化した。

【0762】

このアプローチを用いて、P510Sタンパク質発現を、31/32の一次前立腺腫瘍サンプルにおいて、及び8/17の骨転移サンプルにおいて検出した。いくらかの発現をまた、4/5の正常前立腺サンプルにおいて及び3/5の精巣サンプルにおいて検出した。発現をまた、4/5の正常前立腺サンプルにおいて及び3/5の精巣サンプルにおいて検出した。発現は、甲状腺、脾臓、子宮、卵巣、膵臓、肺、肝臓、心臓、胃、大腸、小腸、脳及び副腎には検出されなかった。

【0763】

実施例37 . 前立腺抗原P504Sの診断評価

前立腺特異的配列P504Sの同定は、上記に記載されている(例えば、例1)。P504Sタンパク質発現を評価するために、免疫組織化学(IHC)分析を、種々の範囲の組織切片に対して行った。組織サンプルを、ホルマリン溶液において12-24時間、固定し、そしてパラフィンに包埋し、その後、8ミクロンの切片にスライスした。0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中、蒸気熱誘発せられたエピトープ回復(SHIER)を、最適染色条件のために使用した。切片を、10%血清/PBSと共に5分間インキュベートした。一次抗体を、示される濃度で24分間、個々の切片に添加し、続いて、抗-ウサギビオチニル化された抗体と共に25分間インキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性を、水素ペルオキシダーゼと共に3回の1.5分間のインキュベーションにより阻止した。アビジンビオチン複合体/ホースラディッシュペルオキシダーゼ(ABC/HRP)システムを、DAB染色体と共に使用し、抗原発現を可視化した。スライドを、ヘマトキシリンにより対比染色し、細胞核を可視化した。

【0764】

A . 結腸癌におけるP504S発現：腫瘍等級及び患者生存性との相互関係：

この例は、P504の免疫反応性が正常結腸及び侵襲性結腸癌に存在することを評価し、そしてまた、P504発現と腫瘍等級、段階及び患者生存性との間の相互関係を評価する。通常通りに処理された切除された結腸癌(n=44)、絨毛性腫瘍(V, n=4)、及び管状及び管状絨毛腫瘍(TA/TVA, n=24)を、5µmで切除し、そしてアビジン/ビオチン複合体(ABC)染色方法を用いて、TechMate 1000 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) 自動化されたイムノステインナー上でP504により免疫染色した。細胞質における正の免疫染色は次のように等級された：0=負の染色；1+=33%までの陽性細胞；2+=34-66%；3+=66%以上。腫瘍を、H&E染色されたスライドの再考に基づいて等級化し、そして段階、位置及び追跡調査を、病理学的報告及び患者チャートから得た。

【0765】

侵襲性癌は、18人の男性及び26人の女性、年齢45-87、右結腸(23)、横断結腸(6)、左結腸(14)及び未知のもの(1)からであった。腫瘍段階は、I(4)、II(17)、III(18)及びIV(5)であった。腫瘍等級は、等級1(23)、2(9)及び3(12)であった。残りのポリブは、7種の癌に存在した。P504Sについての免疫染色は、正常結腸の表面上において弱い陽性であった。癌においては、P504は、0(16)、1+(6)、2+(8)及び3+(14)の等級であった。腫瘍の上層領域と深層領域との間に差異は存在しなかった。残るポリブは、4人の患者において2+又は3+であり、3人の患者において0であった。P504Sの個々の等級についての陽性の癌の%は、腫瘍等級及び患者生存率と反比例した。P504S発現とTNM段階又は全体的段階との間に相互関係は存在しなかった。ほとんどの腫瘍(25/35)は、組織型に関係なく、2+又は3+であった。

10

【0766】

従って、P504Sは、腺腫及び十分に分化された結腸癌及び十分に分化された結腸癌において高く発現され、そして正常結腸粘膜及びそれほど分化されていない癌においては弱く又は不在であった。P504S発現は、患者生存率と反比例した。それらの結果においては、P504Sにおける免疫染色は、結腸癌の診断評価における予後有意性を伴ったの有用な付加物を表す。

【0767】

B. 前立腺の非典型的腺腫性過形成におけるP504Sの発現

腺疾患としても知られている非典型的な腫瘍性過形成(AAH)は、異常構造パターンであるが、前立腺腺上皮における有意な細胞学的異型性を有さないことによって特徴づけられる。AAHは、前立腺腺癌の前駆体損傷を表す。P504Sは、前立腺腺癌においては高く発現されるが、しかし良性前立腺上皮においては発現されないことが見出されている。この例においては、P504Sの発現を、AAHにおいて評価した。

20

【0768】

26人のAAH(前立腺切除:N=18、生検:N=6及び経尿道切除:N=2)、Gleason評点2+2=4を有する腺癌の10人の患者、及び良性前立腺過形成(BPH)の10人の患者を包含する合計46人の患者を、P504S及び高分子量サイトケラチン34 E12についての免疫組織化学により試験した。34 E12染色は、AAHのすべての26人の患者においてパッチ状の基底細胞の存在を確かめた。P504Sは、すべての(10/10)低等級癌、及びAAHの26人の患者のうち4人(15%)において強い細胞質顆粒染色を示した。BPH、又は癌及びAAHに隣接する良性腫は、P504Sに関して陽性ではなかった。拡散性P504S染色パターンは、低等級癌に見出され、そして集中的P504SはAAHにおいて見出された。

30

【0769】

従って、P504Sの発現は、すべての低等級癌及び少数%のAAHにおいて見出されたが、しかしBPH又は他の良性腺においては見出されなかった。それらの発現は、少なくともP504S発現に関して、低等級癌又はBPHとは異なった損傷であることを示唆する。さらに、AAHは、前悪性又は実質的に前悪性損傷として考慮され得る。

【0770】

C. 生検針上での最少前立腺腺癌についての診断マーカーとしてのP504S

生検針上での最少前立腺癌(PC)の診断確立が主要診断挑戦である。前立腺癌に対して特異的なマーカーが、最少疾患を検出する能力を増化するであろう。cDNAサブトラクション及びマイクロアレイ技法により同定されるP504Sは、PCにおいて高く発現されるが、良性前立腺において発現されないことが示されている。この研究の目的は、最少PCを検出するための手段としてP504S発現を評価することであった。

40

【0771】

Gleason評点6(N=51)又は8(N=1)を有する52の最少前立腺腺癌及び59の良性前立腺を包含する、合計111の前立腺生検針を、P504Sに対して特異的な免疫組織化学及び高分子量サイトケラチン(34 E12)を用いることによって試験した。H&E染色上で直径1mm以下の腫瘍病巣として定義される最少PCは、全生検(N=35)においてわずか1つの単一病巣として、又は他の場所に存在する癌(N=18)の他に、1つの針コアにおける1つ

50

の小さな病巣として存在した。

【0772】

P504S免疫陽性は、最少PCの51/52(98%)の患者において見出されたが、しかし悪性腺に隣接する良性腺(0/58)においては見出されなかった。萎縮、基底細胞過形成及び一時的細胞化生は、P504Sに関してすべて陰性であった。P504Sの負の染色を有するPCの唯一の患者は、一時的領域から得られた生検における泡のような癌の特徴を示した。高分子量サイトケラチン(34BE12)免疫染色は、すべての52人の患者において癌の病巣における基底細胞の不在を確かめた。

限定された前立腺腺癌を検出するためのP504Sの高い特異性及び感受性は、臨床学的設定における診断値を示す。従って、免疫組織化学的マーカーとしてのP504Sの使用は、生検針上での最少前立腺腺癌の病理学診断における精度を高めることができる。

10

【0773】

実施例38 . P767Pの免疫組織化学的分析

P767Pタンパク質発現を評価するために、免疫組織化学(IHC)分析を、種々の範囲の組織切片に対して行った。組織サンプルを、ホルマリン溶液において12-24時間、固定し、そしてパラフィンに包埋し、その後、8ミクロンの切片にスライスした。0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中、蒸気熱誘発せられたエピトープ回復(SHIER)を、最適染色条件のために使用した。切片を、10%血清/PBSと共に5分間インキュベートした。一次抗体を、示される濃度で24分間、個々の切片に添加し、続いて、抗-ウサギピオチニル化された抗体と共に25分間インキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性を、水素ペルオキシダーゼと共に3回の1.5分間のインキュベーションにより阻止した。アビジンピオチン複合体/ホースラディッシュペルオキシダーゼ(ABC/HRP)システムを、DAB染色体と共に使用し、抗原発現を可視化した。スライドを、ヘマトキシリンにより対比染色し、細胞核を可視化した。このアプローチを用いて、P767Sタンパク質発現を、7/7の前立腺癌、5/5の正常前立腺、1/1の正常腎臓、1/1の小脳、0/1の正常肝臓、0/1の正常心臓、1/1の正常肺、1/1の正常結腸、1/1の正常扁桃及び1/1の正常皮質において検出した。

20

【0774】

実施例39 . DNA免疫化及び抗体生成のためのP510S及びマップ-P510S

前立腺配列P510Sの同定は、上記(例えば、例1)で同定されている。P510Sを含むプラスミドDNAを、HindIII部位及びKozak配列を有するP501S-AW186、センスプライマー、及びNheI部位及び停止コドンを有するP510S-AW187アンチセンスプライマーを用いて、P510Sのオープンリーディングフレームを増幅するために、PCR反応において鋳型として使用した。PCR生成物を、アガロースゲルから精製し、HindIII及びNheIにより消化し、そして同じ2種の制限酵素により線状化されたJA4304ベクターに連結した。その連結混合物を用いて、E. コリを形質転換し、そしていくつかのクローンをランダムに、制限酵素分析及びDNA配列決定のために選択した。P510S/JA4302 # 2及び# 3クローンは、所望するP510S配列を有することが確認された。この構造体についての決定されたDNA配列は、配列番号1009のポリペプチドをコードする、配列番号1006で示される。

30

【0775】

MAPS-P510Sの構成のためには、pCRX4ベクターを使用した。pCRX4は、MAPS融合構造体のクローニングを促進するために製造されたJA430に基づいてのMAPS融合ベクターである。pCRX4においては、MAPSを、Kozak配列の下流にクローン化し、そして続いて、多クローニング部位が存在した。MAPS-P510S構造体を生成するために、PCR反応を、EcoRI部位を有するMAPS - P510S - AW180センスプライマー、KpnI部位及び停止コドンを有するMAPS - P510SのためのP510S - AW185アンチセンスプライマーを用いて、P510Sコード領域を増幅するために使用した。PCR生成物をアガロースゲルから精製し、EcoRI及びKpnIにより消化し、そして同じ2種の制限酵素により線状化されているpCRX4ベクターに連結した。その連結混合物を用いて、E. コリを形質転換し、そして制限酵素分析及びDNA配列決定のためにランダムに選択した。MAPS + P510S/pCRX4 # 1及び# 3クローンを確認した。この構造体のための決定されたDNA配列は、配列番号1008のポリペプチドをコードする配列番号1007で示

40

50

される。

【0776】

実施例40. 前立腺癌患者及び正常ドナーの血清におけるP501S及びP703P - 特異的抗体の検出

前立腺特異的抗原P501S及びP703Pの同定及び特徴づけは上記に記載されており、それらの代表的形は、それぞれ配列番号113（配列番号110によりコードされる）及び配列番号525（配列番号524によりコードされる）で示される。この例は、前立腺癌患者の血清における、それらの患者に対して特異的な抗体の検出を記載する。患者血清における前立腺抗原 - 特異的抗体についての効果的タンパク質基材のスクリーニングは、タンパク質不安定性及び/又は少量のE. コリ由来のタンパク質の汚染のために問題がある。しかしながら、組換えP501S及びP703Pのカルボキシアミド化が、SDS - PAGEにより確かめられるように、それらのタンパク質のための改良された安定性を提供する。従って、カルボキシアミノ化されたP501S及びP703Pタンパク質が、次の通りに、55人の前立腺癌患者及び13人の正常男性ドナーの血清におけるP501S - 及びP703P - 特異的抗体についてスクリーンするために使用された。

10

【0777】

平底免疫プレートを、インキュベートし、そして室温で少なくとも3時間、又は4で一晩、インキュベートし、そして600ngのカルボキシアミド化されたP501S又は300ngのカルボキシアミド化されたP703Pタンパク質により補充された被覆緩衝液（0.1Nの炭酸緩衝液；pH9.5）により被覆した。0.05% Tween20 - 含有PBSによる少なくとも3度の洗浄及びPBSによる1度の洗浄の後、前立腺癌患者又は正常ドナーからの血清50 µlを、10% NGS（正常ヤギ血清；Gibco BRL, #16210 - 072）含有PBSにより希釈し、添加し、そして室温で3時間、又は4で一晩インキュベートした。

20

【0778】

0.05% Tween含有PBSによる少なくとも3度の洗浄及びPBSによる1度の洗浄の後、100 µlのHRP - 接合された抗 - ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, + #709 - 036 - 149）（10% NFDm/PBS + Superblock）の1 : 1混合物による8000倍の希釈溶液を添加し、そして室温で30 - 60分間インキュベートした。0.05%のTween - 含有PBSによる少なくとも6度の洗浄及びPBSによる1度の洗浄の後、80 - 100 µlのTMB - 基質溶液を添加し、そして室温でインキュベートした。10 - 30分のIgGの標準化に基づいての適切な色を得た後、40 - 50 µl（基質の半分の体積）の0.1Nの硫酸溶液を添加し、酵素反応を停止した。次に、吸光度を、マイクロプレートリーダー（Biotec Instruments）により決定した。

30

【0779】

このアプローチを用いて、P501S - 特異的抗体を、32/55の前立腺癌患者及び5/13の正常ドナーにおいて検出した。P703 - 特異的抗体を24/55の前立腺癌患者及び0/13の正常ドナーにおいて検出した。それらの結果は、P501S及びP703Pのインビボ免疫原性を確かめる。さらに、その結果は、P501S及びP703Pのカルボキシアミド化された形が、ウサギ/マウス抗体、及び前立腺癌患者からの抗体により認識されるエピトープを保持することを示す。

40

【0780】

実施例41. P711Pに対するモノクローナル抗体の生成

P711（配列番号383のタンパク質をコードする配列番号382）の同定及び特徴づけは、上記（例えば、例3）に記載される。抗体生成のために使用されるP711Pタンパク質の生成及び精製のために、組換えP711Pタンパク質を発現するE. コリを、適切な抗生物質と共にLBブイオンを含む、振盪インキュベーターにおいて37で一晩、増殖せしめた。次の朝、その一晩の培養物10mlを、2Lのそらせ板付き三角フラスコにおける500mlの2 × YT + 適切な抗生物質に添加した。培養物の光学密度（560nmでの）が0.4 - 0.6に達する場合、細胞をLPTG（1mM）により誘発した。IPTGと共にインキュベートした後4時間で、細胞を遠心分離により収穫した。次に、細胞を、リン酸緩衝溶液により洗浄し、そして再び遠心分離した。上清液を捨てて、そして細胞をさらなる使用のために凍結するか、又はすぐに処理

50

した。20mlの溶液緩衝液を、細胞ペレットに添加し、そしてその懸濁液をかき混ぜた。

【0781】

E. コリ細胞を分解するために、この混合物を、16,000psiの圧力で、French Pressにゆだねた。次に、細胞を再び遠心分離し、そして上清液及びペレットを、組換えタンパク質の分別のためにSDS - PAGEにより調べた。細胞ペレットに局在するタンパク質のために、ペレットを、10mMのトリス (pH8.0)、1%のCHAPSに再懸濁し、そして封入体ペレットを洗浄し、そして再び遠心分離した。この方法をさらに2度、反復した。洗浄された封入体ペレットを、10mMのトリス (pH8.0) + 10mMのイミダゾールを含む、8Mのウレア又は6MのグアニジンHClにより溶解した。溶解されたタンパク質を、5mlのニッケル - キレート樹脂 (Qiagen) に添加し、そして室温で45分 ~ 1時間、連続した攪拌下でインキュベートした。インキュベーションの後、樹脂及びタンパク質混合物を、使い捨てカラムに注ぎ、そして流動物を集めた。次に、カラムを、10 - 20カラム体積の溶解緩衝液により洗浄した。次に、抗原を、8Mのウレア、10mMのトリス (pH8.0) 及び300mMのイミダゾールを用いてカラムから溶出し、そして3mlの画分に集めた。SDS - PAGEゲルを、決定するために展開し、画分をさらに精製のためにプールした。

10

【0782】

最終精製段階として、強いアニオン交換樹脂、例えばHi - PrepQ (Biorad) を、適切な緩衝液により平衡化し、そして上記からのプールされた画分を、カラム上に負荷した。個々の抗原をカラムから、上昇する塩グラジエントにより溶離した。画分が、カラムが運転されるにつれて集められ、そしてもう1つのSDS - PAGEゲルを運転し、カラムからの画分をプールした。プールされた画分を、10mMのトリス (pH8.0) に対して透析した。次に、この材料を、SDS + PAGE又はHPLCにより決定されるように純度を、Lowryアッセイ又はアミノ酸分析により決定されるように濃度を、アミノ末端タンパク質により決定されるように同一性を評価し、そして内毒素レベルをLimulus (LAL) アッセイにより決定した。次に、タンパク質を、0.22ミクロンのフィルターを通しての濾過の後、ガラス瓶に詰め、そして抗原を、免疫化のために必要とされるまで、凍結した。

20

【0783】

抗 - P711Pマウスモノクローナル抗体を生成するために、マウスを、等量の完全フロイントアジュバント (CFA) によりエマルジョンを形成するために混合された組換えP711Pタンパク質50 µgにより腹腔内 (IP) 免疫化した。3週ごとに、動物を、等量のIFAと共にエマルジョンを形成するために混合された組換えP711Pタンパク質50 µgにより注射した (i. p.)。4回目の注射の後、脾臓を単離し、そして標準のハイブリドーマ融合方法を用いて、抗 - P711Pマウスモノクローナル抗体を生成した。

30

【0784】

抗 - P711Pモノクローナル抗体を、細菌的に発現された組換えP711Pタンパク質を用いて、ELISA分析によりスクリーンした。ELISAによる抗 - P711Pモノクローナル抗体の特徴付けのために、96ウェルプレートを、P711P抗原50 µl (典型的には、約1 µg) と共に4で20時間インキュベートすることをよって、その抗原により被覆した。250 µlのBSAブロッキング緩衝液をウェルに添加し、そして室温で2時間インキュベートした。プレートを、PBS/0.01% Tweenにより6度、洗浄した。50 µlの個々の希釈されていないモノクローナル上清液を個々のウェルに添加し、そして室温で30分間インキュベートした。プレートを、1 : 10000の希釈度でのヤギ抗 - マウスホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 50 µlが添加され、そして室温で30分間インキュベートされる前、上記のようにして洗浄した。

40

【0785】

プレートを、上記のようにして洗浄し、そして100 µlのTMB Microwell Peroxidase Substrateを個々のウェルに添加した。室温で暗室における15分のインキュベーションに続いて、比色反応を、100 µlの硫酸により停止し、そしてすぐに450nmで読み取った。ウェスタンブロット分析のために、組換えP711Pタンパク質を、β -メルカプトエタノールを含むSDS - PAGE負荷緩衝液により希釈し、次にSDS - PAGEゲルの充填の前、10分間、煮沸し

50

た。タンパク質をニトロセルロースに移し、そして個々の抗 - P711Pハイブリッドーマ上清液によりプローブした。抗 - マウス - HRPを、ECL基質におけるインキュベーションにより、抗 - P711P反応性バンドを可視化するために使用した。このアプローチにより、少なくとも7種の抗 - P711Pモノクローナル抗体を生成し、そしてELISA及び/又はウェスタン分析により組換えP711タンパク質と反応性であることを示した。

【0786】

実施例42 . P501S - 特異的T - 細胞によるカルバミドメチル化されたCTLエピトープの認識

前立腺特異的抗原P501Sの同定及び特徴づけは、上記の通りであり、そのための代表的な十分な長さのDNA配列は、配列番号113に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号110で示される。P501Sのペプチドに対して特異的なCTL（ペプチド370 - 378、アミノ酸配列CLSHSVAVV）は、P501S形質導入された標的細胞の認識により示されるように、天然においてプロセッシングされたP501Sを認識することがこれまで示されている。この例においては、マウスを、P501S DNAにより免疫化し、続いて、14日後、P501S - 含有アデノウイルス供給ベクターを用いて第2の免疫化を行なった。35日目、脾臓細胞を収穫し、そして照射されたJurkat A2Kb - P501細胞を用いて、毎週インビトロで刺激した。

【0787】

CTL系を、親Jurkat A2Kb細胞に対する溶解活性についてアッセイし、Jurkat A2Kb細胞をP501Sにより形成導入し、Jurkat A2Kb細胞をp370 - 378によりパルスし、又はJurkat A2Kb T細胞を、カルボキシアミド化されたp370 - 378ペプチドによりパルスした。このアプローチを用いて、p370 - 378特異的T細胞は合成の修飾されていない370 - 378のペプチドを認識するのみならず、また370 - 378のカルバミドメチルされた形も認識することが見出された。それらの結果は、天然においてプロセッシングされたP501、アミノ酸370 - 378に対応する修飾されていない合成ペプチド、P501S、及び修飾された合成ペプチド370 - 378の交差 - 認識を示すために重要である。従って、組換えP501Sのカルバミドメチル化は、このCTLエピトープのT細胞認識を害しない。

【0788】

実施例43 . P501S融合タンパク質の調製

前立腺特異的抗原P501Sの同定及び特徴づけは、上記に記載され、そのための代表的な十分な長さのDNA配列は、配列番号113で示されるアミノ酸配列をコードする、配列番号110で示される。この例においては、例示的なP501S融合構造体が製造され、そしてコードされる融合タンパク質が生成された。配列特異的プライマーを用いて、P501SのC - 末端切断された領域（アミノ酸341 - 527）を、次の条件を用いてPCR増幅した：

【0789】

- 10 µlの10 × Pfu緩衝液
- 1 µlの10mMのdNTP
- 2 µlの10 µMの個々のオリゴ
- 83 µlの無菌水
- 1.5 µlのPfu DNAポリメラーゼ（Stratagene, La Jolla, CA）
- 50ngのDNA
- 96 で2分
- 96 で30秒、72 で1分30秒 × 40サイクル
- 72 で4分。

【0790】

得られるPCR生成物を、NcoI及びNotIにより消化し、そしてNcoI及びNotIによりまた消化された、市販のベクターpET32（Novagen, Madison, WI）中にクローン化した。pET32ベクターは、チオレドキシシンであるTrx抗原、すなわち抗原を発現するために困難な発現を増強し、そしてさらに、得られる融合タンパク質の溶解性を増強することができるE . コリタンパク質とのN - 末端融合体を組込む。このTrx - T501S融合構造体のコード領域についてのその得られるcDNA配列は、配列番号1011で示される融合アミノ酸配列をコードする

10

20

30

40

50

、配列番号1010で示される。

【0791】

実施例44 . P501S免疫原性の評価

前立腺特異的抗原P501Sの同定及び特徴づけは、上記に記載されており、それについての代表的な十分な長さのDNA配列は、配列番号113で示されるアミノ酸配列をコードする、配列番号110で示される。この例は、DNA/アデノウイルスP501S免疫化に比較して、種々のアジュバントと組み合わせたP501Sタンパク質（修飾されていないか又はカルボキシアミド化されている）によるワクチン接種を研究する予備臨床学的インビボ免疫原性研究の結果を記載する。次の実験企画を使用した：

【0792】

10

【表14】

グループ	抗原	アジュバントシステム
1	10 μ gのP501S, 修飾されていない	AS1
2	10 μ gのP501S, 修飾されていない	AS2
3	10 μ gのP501S, 修飾されていない	AS7
4	10 μ gのP501S, カルボキシアミド化された	AS1
5	10 μ gのP501S, カルボキシアミド化された	AS2
6	10 μ gのP501S, カルボキシアミド化された	AS7
7	100 μ gのP501S, DNA/10 ⁸ pfu P501S アデノウイルス	なし
8	緩衝液	AS2.
9	対照	-

3回の免疫化, 2週ごとに;
最後の免疫化の8日後に収穫;
経路=i.m.+f.p. ;
マウス=A2Tg雌 (5/グループ)

20

30

【0793】

続いて、アッセイを、CTL応答、抗体応答及びCD4応答（インターフェロン - & 増殖）を評価するために行なった。この評価の結果は、アジュバントにおいて供給される修飾されていない、及びカルボキシアミド化されたP501Sタンパク質が、抗体及びCD4 T細胞応答により評価される場合、免疫原性であることを示した。タンパク質投与により観察されるCD4及び抗体応答は一般的に、DNA/アデノウイルス免疫化により観察される応答よりも強かった。CTL応答は、試験されるアジュバントシステムでのタンパク質免疫化に続いて、検出されなかった。しかしながら、CTLは、P501Sアデノウイルス免疫に続いて、確実に検出できた。抗体及びCD4応答は、修飾されていないP501S及びカルボキシアミド化により修飾されたP501Sの両者を認識した。種々のアジュバントシステムにより得られる応答の比較評価は、免疫原性に対してほとんど効果を示さず、但しAS7はより強いTh1応答を生成した。

40

【0794】

実施例45 . P501Sのための天然においてプロセッシングされたCTLエピトープの同定

前立腺特異的抗原P501Sの同定及び特徴づけは上記に記載されており、そのための代表的な十分な長さのDNA配列は、配列番号113で示されるアミノ酸配列をコードする、配列番号110で示される。この例においてはプロセッシングされたネズミA2Kb CTLエピトープは、P501Pのために同定されている。このエピトープを、一連のC - 末端欠失構造体、P501P

50

の最後の92個のアミノ酸を含むC - 末端サブクローン、及び興味あるP501S領域に及ぶペプチド組を用いてマッピングした。エピトープをマッピングするために使用されるT細胞クローンを、P501S DNAにより免疫化された及びP501S - アデノウィルスにより免疫化されたC57BL/6 A2Kbトランスジェニックマウスからの脾臓細胞の限界希釈から誘導した。37のT細胞クローンが、CTLアッセイにおいてP501S - 形質導入されたJurkat AZKb標的物に対して反応性であるものとして同定された。

【0795】

しかしながら、この系は、配列番号113のアミノ酸残基370 - 378に対応する、これまでに同定された、天然においてプロセッシングされたP501SエピトープによりパルスされたJurkat AZKb細胞と反応性ではなかった。この観察は、アミノ酸残基370 - 378の9 - マーエピトープ以外の第2エピトープの存在を示した。したがって、T細胞クローンを、FragA - FragEを示したC - 末端の欠失構造体により形質導入されたJurkat A2Kb細胞により試験した。T細胞クローンのどれも、それらの欠失構造体に対するCTL応答を生成せず、このことは、エピトープがP501SのC - 末端の92個のアミノ酸 (461 - 553) 内にたぶんマッピングされたことを示す。

【0796】

6個のT細胞クローンは、P501Sアミノ酸残基462 - 553を発現するJurkat AZKbクローンに対する応答性であることが示された。ネズミELISPOTアッセイを用いて、それらの形質導入された標的物、及び種々の20 - マー、15 - マー、10 - マー、及び9 - マーペプチドによりパルスされたJurkat A2Kb標的物は、配列SACDVSVRVを有し、そして配列番号113のアミノ酸残基464 - 472に反応する、P501Sのための天然においてプロセッシングされたエピトープの同定を可能にした。

【0797】

実施例46 . P790P発現の特徴づけ

前立腺抗原P790Pの同定は上記に記載されており、そのための十分な長さのcDNA配列は、配列番号527で示されるアミノ酸配列をコードする、配列番号526で示される。哺乳類細胞における組換え発現のために、P790Pを、pCEP4及びVR1013 (ポリリンカーにより修飾されたVR1012ベクター) 哺乳類発現ベクター中にサブクローン化した。その構造体を、リポフェクタミン2000 (Gibco) を用いて、HEK293細胞 (ATCC) 中にトランスフェクトした。HEK293細胞を、10% FBS (Hyclone) を含むDMEM (Gibco) において300,000個の細胞/mlの密度で6ウェル皿にプレートし、そして6 - 8時間インキュベートした。次に、1 µgのDNAを、FBSを含まないDMEM100 µlに添加し、そして3 µlのリポフェクタミン2000を、FBSを含まないDMEM100 µlに添加した。両者を、室温で5分間インキュベートした。リポフェクタミン/DMEM混合物を、DNA/DMEM混合物に添加し、そして室温で15分間インキュベートした。次に、リポフェクタミン2000/DNA混合物を、HEK293細胞に添加し、そして7%CO₂下で、37 °Cで48 - 72時間インキュベートした。細胞を集め、そして遠心分離によりペレット化し、そしてPBSにより2度、洗浄した。

【0798】

ウェスタンブロット分析に関しては、全細胞溶解物を、メルカプトエタノールを含むSDS - PAGE負荷緩衝液中にサンプルを直接的に希釈することによって生成し、次に、SDS - PAGEゲルを負荷する前、70で10分間インキュベートした。タンパク質をニトロセルロースに移し、そして10 µg/mlの濃縮で、マウス抗 FLAG抗体 (Kodak Scientific Imaging, カタログ # IB13026) を用いてプローブした。プロットを、ヤギ抗 - マウス - HRPにより検出し、続いてECL基質においてインキュベートした。同一のプロットを、1/1000で抗 - P790ペプチド血清 (3 - 13 - 2001, 3875L) によりプローブした。このプロットを、ヤギ抗 - ウサギ - HRPにより検出し、続いてECL基質においてインキュベートした。このアプローチを用いて、組換えP790Pタンパク質の発現を、抗 - FLAGポリクローナル抗体を用いて、一時的にトランスフェクトされたHEK293細胞において検出した。

【0799】

実施例47 . 前立腺の腺腫過形成におけるP504Sの発現

この例は、前立腺抗原P504Sに対して特異的な抗体が、前立腺癌の検出及びさらに、前立腺癌からの非定型腺腫過形成(AAH)の分化において有用な、重要な診断試薬をいかにして提供するかを記載する。腺疾患としても知られている前立腺のAAHは、異常構造パターンにより特徴づけられるが、しかし前立腺腺上皮において有意な細胞学的異型性を有さない。前立腺癌とAAHとを区別することは、しばしば困難である。さらに、AAHが腺癌の前駆体損傷であることは提供されている。P504S(配列番号107及び108に開示されるDNA及びアミノ酸配列)は、前立腺腺癌において非常に過剰発現されることが示されており、そして従って、前立腺癌のための卓越したマーカーを提供するタンパク質である。

【0800】

ここで、本発明者は、多くの異なった前立腺サンプルにおけるP504Sの発現プロフィールを決定するために、免疫組織化学を用いる。合計80サンプル、例えば40のAAH(前立腺切除; n=30、生検: n=6、及び経尿道切除: n=4)、20の前立腺腺癌及び20の良性前立腺過形成(BPH)を試験した。P504S及び基低細胞特異的マーカー-34 E12のための免疫組織化学が、すべてのサンプルに対して行なわれた。

34 E12染色は、すべての40のAAHにおけるパッチ状基底細胞の存在を確かめた。P504S染色は、20/20の前立腺癌及び6/40のAAH(15%)において強い細胞質顆粒状染色を示した。BPH又は癌に隣接するか又はAAHに隣接する良性前立腺は、P504Aに対して陽性ではなかった。P504Sの拡散性染色パターンが前立腺癌サンプルに見出され、そして集中的な陽性がAAHの陽性患者において見出された。

【0801】

それらの発現は、34 E12及びP504Sを用いての組換え染色が前立腺腺癌とAAHとを区別することにおいて強い診断価値を有し、そして従って、本明細書に記載される種々の例示的な診断及び治療態様のいずれかへのP504Sの使用を有効にすることを示す。

【0802】

実施例48. 例示的P703P融合タンパク質の生成

前立腺特異的抗原P703Pの関連形の同定及び特徴づけは上記に記載されており、そのための1つの代表的なDNA配列は、配列番号172に示されるアミノ酸配列コードする、配列番号171で示される。この例においては、例示的なP703P融合構造体を製造し、そしてコードされた融合タンパク質を生成した。この組換え融合タンパク質を、例えば前立腺癌の検出のための診断方法において及び/及び前立腺癌の予防及び/又は処理のために対象において免疫応答を誘発するために使用され得る。

【0803】

十分な長さのヒトPAP DNAを、プライマー-hPAPF1及びhPAPRV1を用いて、前立腺癌組織cDNAライブラリーからPCRにより得た。それらのプライマーの配列は、次の通りである:

hPAPF1: 5' - CGGCGGATCCGCGCCACCATGAGAGCTGCACCCCTCCTCCT - 3' (配列番号1014)、及び

hPAPRV1: 5' - CGGCCTCGAGCTAATCTGTACTGTCTTCAGTACCTTGATGGCTG - 3' (配列番号1015)

次に、PCR生成物を、PCR BluntII TOPOベクター中にクローン化した。HPAPを修飾するために、第2 PCRを、hPAP/TOPO BluntIIを鋳型として用いて、次のプライマーにより行なった:

FOP2F1: 5' - GAGAAAACCGTCCAGGCCAGTAAGGAGTTGAAGTTTTGTGACTTTTGGTG - 3' (配列番号1016)、及びHPAPRV1(配列番号1015)。

FOPP/PCR1(P703Pを含むDNA)をまた、次のプライマーを用いて修飾した:

FOPPF1: 5' - CGGCGGGCATATGCATCACCATCACCATCACATCATAAACGGCGAGGACTGCAG - 3' (配列番号1017); 及び

FOPP2RV1: 5' - CACCAAAGTCACAACTTCAACTCCTTACTGGCCTGGAGGGTTTTTCTC - 3' (配列番号1018)。

【0804】

最終的に、プライマー-FOPPF1及びhPAPRV1、及び鋳型としての修飾されたhPAP及びP703P

10

20

30

40

50

PCR生成物を用いて、PCRを行ない、FOPP2を生成した。次に、このPCR生成物を、制限酵素切断部位Nde1及びXho1でPCRX1ベクターにクローン化した。FOPP2/PCRX1プラスミドを用いて、E. コリ株Tuner (DE3) pLysSを形質転換し、そしてカナマイシン及びクロラムフェニコールを含むLBプレート上にプレートした。His - Taqに対する抗体と共に、SDS - PAGE分析及びウェルターンプロット分析を用いて、形質転換体は、発現IPTGを用いて誘発される場合、FOPP2タンパク質を発現することが示された。

【 0 8 0 5 】

多量のFOPP2タンパク質を生成するために、発現クローン培養物を、50 µg/mlのカナマイシン及び34 µg/mlのクロラムフェニコールを含むSTB20ml中に接種し、そしてOD600読み取りが約1になるまで、37 °Cで増殖した。次に、培養物を、50 µg/mlのカナマイシン及び34 µg/mlクロラムフェニルコールを含むSTB (1 L) 中に希釈し、そしてOD600読み取りが約0.4になるまで、37 °Cで増殖した。次に、IPTGを添加し、1mMの最終濃度にし、そして培養物を37 °Cで2時間インキュベートした。細胞を5000RPMで8分間、遠心分離し、PBSにより洗浄し、そして-70 °Cで貯蔵した。

10

【 0 8 0 6 】

タンパク質を精製するために、細胞ペレットを、2 mMのPMSF及びプロテアーゼインヒビターを含む10mMのトリス - Cl (pH8.0) 25mlに再懸濁した。細胞を数度、音波処理し、そして溶解物を4000RPMで60分間、遠心分離した。封入体を含む沈殿物を、1 %CHAPSを含む10mMのトリス - HCl (pH8) により2度、洗浄した。封入体を、40mlの結合緩衝液 (10mMのトリス - HCl、pH8.0、100mMのリン酸ナトリウム、及び8 Mのウレア) に溶解した。その溶液を、10mlのNi - NTA樹脂 (Qiagen) と共に、室温で30分間、混合した。この混合物を25mlのカラム中に注ぎ、そして50mlの洗浄緩衝液 (10mMのトリス - Cl、pH6.3、100mMのリン酸ナトリウム、0.5 %DOC及び8 Mのウレア) により洗浄した。次に、結合したタンパク質を、溶出緩衝液 (10mMのトリス - Cl、pH8.0、350mMのイミダゾール、100mMのリン酸ナトリウム及び8 Mのウレア) を用いて溶出した。FOPP2を含む画分を組合し、そして多量のトリス - Cl (pH8.0) を用いて、集中的に透析し、アリコートし、そして-70 °Cで貯蔵した。FOPP2配列を確かめ、そしてそのDNA及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1019及び1020で開示される。

20

【 0 8 0 7 】

実施例49 . E . コリにおける前立腺抗原P501Sの発現

30

この例は、例えば免疫診断及び免疫治療用途において有用であるP501Sポリペプチドの組換え生成を記載する。前立腺特異的抗原P501Sの同定及び特徴づけは、上記に記載されており、そのための代表的な十分な長さのDNA配列は、配列番号113で示されるアミノ酸配列をコードする、配列番号110で示される。この例は、N - 末端ヒスタジン標識及びTAT (ツイン アルギニン トランスロケーター) シグナルペプチド融合体と共に組み合わされたE . コリ発現システムを用いての、組換えP501SC (アミノ酸257 - 553に対応する) 及び尾P501SD (アミノ酸316 - 553に対応する) の発現を記載する。

【 0 8 0 8 】

E . コリにおけるP501SCの発現 :

P501SCコード領域を、次のプライマーを用いてPCR増殖した :

40

PDM - 930 : 5 ' - cttccacggctgcaccagctgtgc - 3 ' (配列番号1023)

PDM - 165 : 5 ' - cacggacgtgaattctacgctgagtatttggcc - 3 ' (配列番号1024)

E . コリにおけるP501SDの発現

P501SDコード領域を、次のプライマーによりPCR増殖した :

PDM - 929 : 5 ' - cactatgatgaaggcgttcggatgggcag - 3 ' (配列番号1025)

PDM - 165 : 5 ' - cacggacgtgaattctacgctgagtatttggcc - 3 ' (配列番号1024) 。

PCRを次の反応成分を用いて行なった :

【 0 8 0 9 】

10 µ l の 10 × Pfu 緩衝液

1 µ l の 10mM の dNTP

50

2 μlの10 μMの個々のプライマー
 83 μlの無菌水
 1.5 μlのPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene, La Jolla, CA)
 50ngのDNA
 PCR増幅を、次の反応条件を用いて行なった：
 96 で2分、続いて下記の20サイクル：
 96 で20秒；
 67 で15秒；及び
 72 で2分、続いて下記段階の最終拡張：
 72 で4分。

10

【0810】

PCR生成物を、EcoRIにより消化し、そしてEco721及びEcoRIでpPDM及びpTAT (TATシグナルペプチドリーダーを用いてのpPDM)中にクローン化した。構造体は、配列分析を通して正しいことが確かめられ、そしてタンパク質発現を確かめるために、BLR (DE3) pLys S, HMS174 (DE3) pLys S, Rosetta (DE3)及びRosetta (DE3) pLys S細胞中に形質転換された。P501S C-His構造体についてのアミノ酸配列が確かめられ、そして配列番号1029で開示され、その対応するDNA配列は配列番号1027で開示された。P501SD - His構造体についてのアミノ酸配列が確かめられ、そして配列番号1028で開示され、そしてその対応するDNA配列は配列番号1026で開示された。それらの組換えP501Sポリペプチドは、例えば免疫診断及び/又は免疫治療態様、例えば本明細書に記載されるそれらの態様に使用され得る。

20

上記したことから、本発明の特定の態様を明細書中に説明のために記載したけれども、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく種々の改変をなし得ることが分かるであろう。したがって、本発明は添付の特許請求の範囲によって以外は制限されない。

【図面の簡単な説明】

【0811】

【図1】図1は、対照の線維芽細胞に比較して、代表的な前立腺 - 特異的ポリペプチドP502Sを発現する線維芽細胞を殺害するT細胞の能力を示す。%溶解性は、示されるように、一連のエフェクター：標的物の比として示される。

【図2A】図2Aは、代表的な前立腺 - 特異的ポリペプチドp502Sを発現する細胞を認識するT細胞の能力を示す。個々の場合、 - インターフェロンスポットの数、異なった数の応答体のために示される。図2Aにおいては、データは、対照E75ペプチドによりパルスされた線維芽細胞に比較して、P2S - 12ペプチドによりパルスされた線維芽細胞について示される。

30

【図2B】図2Bは、代表的な前立腺 - 特異的ポリペプチドp502Sを発現する細胞を認識するT細胞の能力を示す。個々の場合、 - インターフェロンスポットの数、異なった数の応答体のために示される。図2Bにおいては、データは、HER - 2 / neuを発現する線維芽細胞に比較して、P502Sを発現する線維芽細胞について示される。

【図3】図3は、P501Sに由来するP1S # 10ペプチドがHLA - A2を結合することを示すペプチド競争結合アッセイを示す。ペプチドP1S # 10は、TNF開始バイオアッセイにおいてD150M58をCTLクローン化するためにFlu M58ペプチドHLA - A2制限された提供を阻害する。D150M58 CTLは、HLA - A2結合インフルエンザマトリックスペプチドFlu M58に対して特異的である。

40

【図4】図4は、EGFP - トランスダクトされたJurkat A2Kbに比較して、P1S # 10 - パルスされたJurkat A2kb標的物及びP501S - トランスダクトされたJurkat A2kb標的物を特異的に溶解する、P1S # 10免疫化されたマウスから生成されたT細胞の能力を示す。%溶解率は、示されるように一連のエフェクター：標的物の比として示される。

【図5】図5は、代表的な前立腺 - 特異的ポリペプチドP501Sを発現するJurkat A2kb細胞を認識し、そして特異的に溶解するT細胞クローンの能力を示して、それにより、P1S # 10ペプチドがp501Sポリペプチドの天然においてプロセッシングされたエピトープであり得ることを示す。

50

【図 6 A】図 6Aは、代表的な前立腺 - 特異的抗原 (P501S) に対するCD8⁺細胞系 (3A-1) の特異性を示すグラフである。図 6Aは、⁵¹Cr開放アッセイの結果を示す。%特異的溶解率は、示されるように一連のエフェクター：標的物の比として示される。

【図 6 B】図 6Bは、代表的な前立腺 - 特異的抗原 (P501S) に対するCD8⁺細胞系 (3A-1) の特異性を示すグラフである。図 6Bは、示されるような種々のエフェクター：標的物の比で、P501Sによりトランスダクトされた自己由来のB-LCLにより刺激された3A-1細胞によるインターフェロンの生成を示す。

【図 7】図 7は、パキユロウイルスにおけるP501Sの発現を示すウェスタンブロットである。

【図 8】図 8は、P501Sに対するエピトープマッピング研究の結果を示す。

【図 9】図 9は、トランスメンブランドメイン、及び予測される細胞内及び細胞外ドメインの位置を示すP501Sタンパク質の図示である。

【図 10】図10は、染色体22q11.2のCat Eye Syndrome領域内の前立腺遺伝子P775P、P704P、B305D、P712P及びP774Pの位置を示すゲノム地図である。

【図 11】図11は、P501Sに対して生ぜしめられたウサギポリクローナル抗血清の特異性を決定するためのELISAアッセイの結果を示す。

10

【図 1】

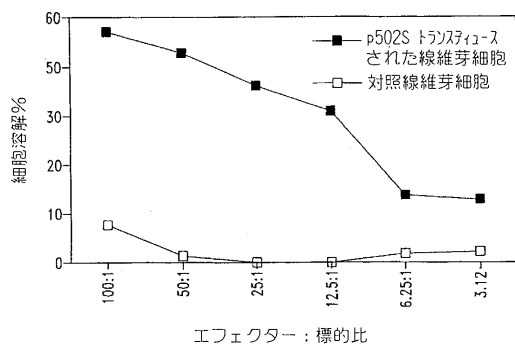


Fig. 1

【図 2 A】

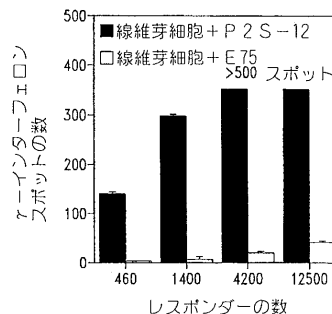


Fig. 2A

【図 2 B】

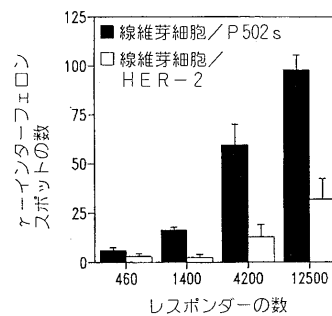


Fig. 2B

【 図 3 】

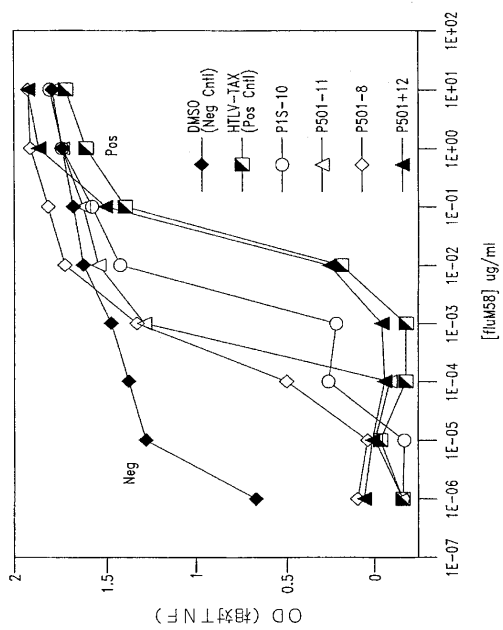


Fig. 3

【 図 4 】

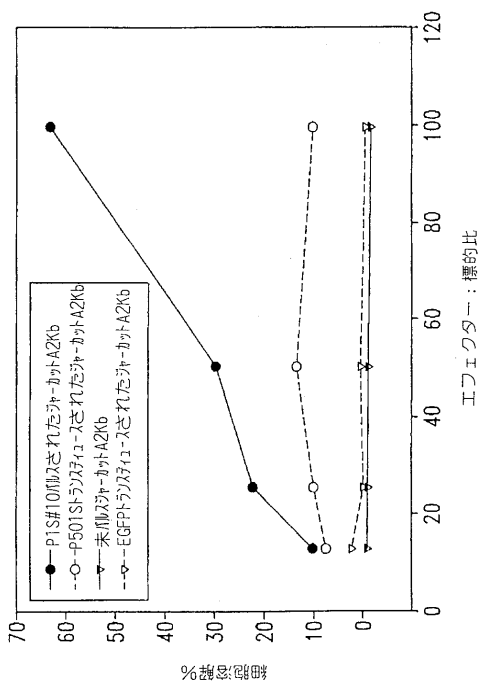


Fig. 4

【 図 5 】

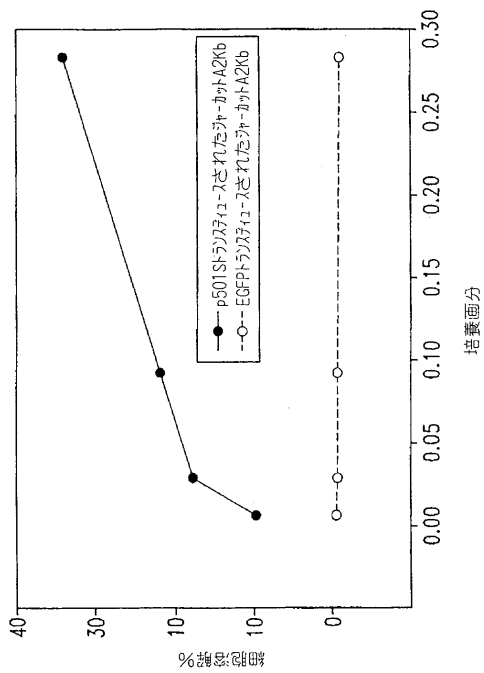


Fig. 5

【 図 6 A 】

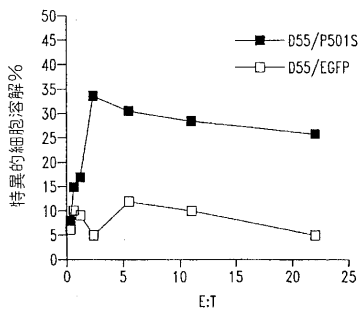


Fig. 6A

【 図 6 B 】

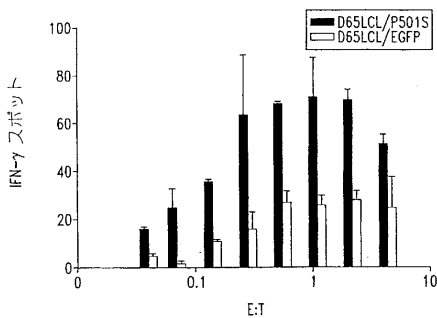
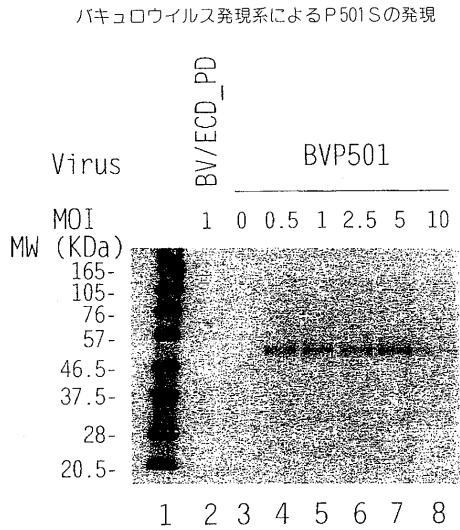


Fig. 6B

【 図 7 】



6-ウエルプレート中60万高5細胞に、無関係対照ウイルスBV/ECD_PD(レーン2)、ウイルスなし(レーン3)又は種々のMOIでのP501についての細換えパキウイルス(レーン4~8)。細胞溶解物を還元条件下SDS-PAGEで泳動させて、Westernブロットにより、P501Sに対するモノクローナル抗体(P501S-10E3-10E3-G4D3)を用いて分析した。レーン1は分子量標準(BioLabs)を示す。

Fig. 7

【 図 8 】

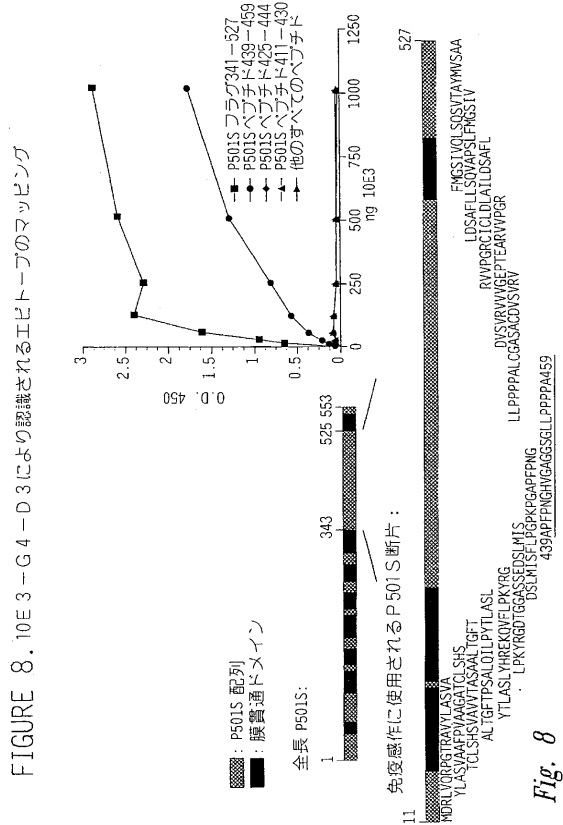


Fig. 8

【 図 9 】

予想される膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン及び細胞外ドメインを有するP501Sの模式図

MVQRLLVSRLLRHRK AQLLLVNLITFGLVCLAGGIT YVPPLLLEVGVEEKFM
TMVLGIGPVLGLVCPYLLGSAS

DHWIRGRYGRRRP FIWALSGLILLSLFLIPRAGWL AGLLCPDPRPLE LALLTLGVGLLDFCGQVCFPTL

EALLSDFRDPDHCRC AYSVYAFMISLGGCLGYLLPAI DWDTALAPYLGTOEE

CLFGLLTLIFLTCVAATLLV AEAAALGPTPEAGLSAPSLSPHCPCPRARLAFRNLGALLPRL

HQLCCRMPTLR LFVAELCSNMALMTFFLTYTDF VGEGLYQGVPRAEPTARRHYDEGVR

MGSLGLFLQCAISLVFSLVM DRLVQRFGTRAVYLAS VAAFPVAAGATCLSHSVAVVTA SAA

LTGFTFESALQILPYTLASLY HREKQVFLPKYRGDTGGASSEDSLMTSFLPGPKPGAPFNGHVGAGGSGL

LPPPPALCGASACDVSIVRVVVEPTEARVVPGRG ICLDLAILDSAFLLSQVAPSLF MGSIVQLSQS

VTAYMVSAAAGLGLVAIYFAT QVVFDKSOLAKYSA

下線を付した配列: 予想される膜貫通ドメイン; 太字: 予想される全ての細胞外ドメイン; イタリック: 予想される細胞内ドメイン; 太字/下線付き: ポリクローナルラビット血清の生成のために使用した部分

HMMTOPを用いての、予想されるドメインの位置決定 (G.E. Tusnady and I. Simon (1998) Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to topology Prediction. J. Mol. Biol. 283, 489-506

Fig. 9

【 図 10 】

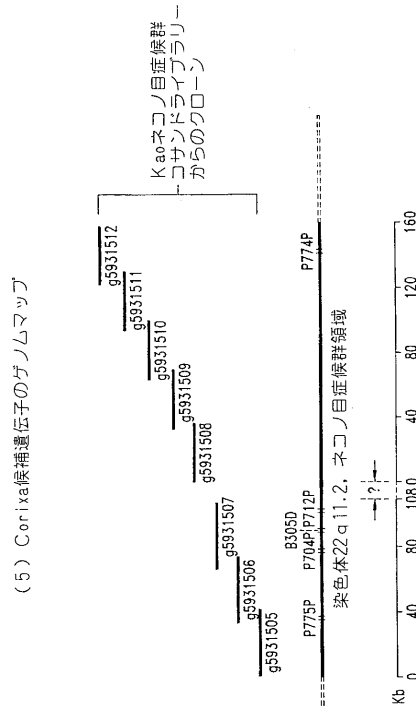


Fig. 10

【 図 1 1 】

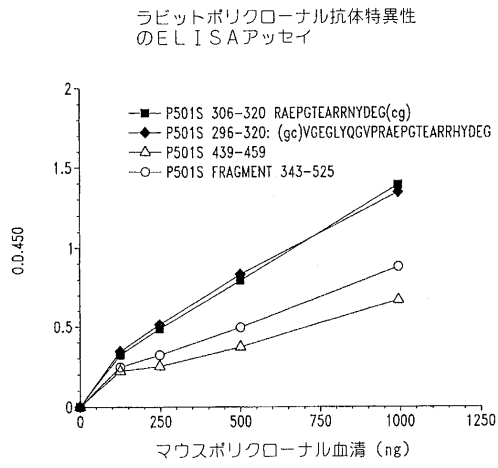


Fig. 11

【 配 列 表 】

2008271978000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A 4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	E
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/574	A

- (72)発明者 シュー, ジアンチュン
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 0 6, ベルビュー, サウス イースト フォーティーサード
プレイス 1 5 8 0 5
- (72)発明者 ディロン, デイビン シー.
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 2 7, イッサカー, ノースウエスト モントロークス ドラ
イブ 1 8 1 1 2
- (72)発明者 ミッチャム, ジェニファー エル.
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 5 2, レッドモンド, ノースイースト エイティーエイス
ストリート 1 6 6 7 7
- (72)発明者 ハーロッカー, スーザン エル.
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 7, シアトル, サーティーンズ アベニュー ノースウエ
スト 7 5 2 2
- (72)発明者 ジアン, ユキウ
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 3 2, ケント, サウス トゥーハンドレッドサーティーセカ
ンド ストリート 5 0 0 1
- (72)発明者 ヘンダーソン, ロバート エー.
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 2 6, エドモンズ, ワンハンドレッドナインティーセカンド
ストリート サウスウエスト 8 9 0 4
- (72)発明者 カロス, マイケル ディー.
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 0 3, シアトル, デイトン アベニュー ノース 8 1 1 6
- (72)発明者 ファンガー, ゲイリー アール.
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 1 2, ミル クリーク, トゥエンティーナインス ドライブ
サウスイースト 1 5 9 0 6
- (72)発明者 レッター, マーク ダブリュ.
アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 1 4, カーネイション, ノースイースト フォーティーサー
ド プレイス 3 3 4 0 2
- (72)発明者 ストルク, ジョン エー.

- アメリカ合衆国, ワシントン 98011, ボセル, ノースイースト ワンハンドレッドフォーティ
 ーフォース プレイス 7436
- (72)発明者 デイ, クレイグ エイチ.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98133, ショアライン, ウォーリングフォード アベニュー ノ
 ース 19020
- (72)発明者 ベドビック, トーマス エス.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98003, フェデラル ウェイ, サウス スリーハンドレッドス
 プレイス 124
- (72)発明者 カーター, ダリック
 アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シアトル, サミット アベニュー イースト 321
- (72)発明者 リー, サミュエル エックス.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98052, レッドモンド, ワンハンドレッドセブンティーフイフ
 ス コート ノースイースト 3608
- (72)発明者 ワン, アイジュン
 アメリカ合衆国, ワシントン 98029, イッサカー, トゥーハンドレッドサーティーンズ プ
 レイス サウスイースト 3106
- (72)発明者 スケイキー, ヤサー エー・ダブル.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98006, ベルビュー, サウスイースト フォーティーセブンス
 プレイス 15106
- (72)発明者 ヘプラー, ウィリアム ティー.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98125, シアトル, サーティーエイズ アベニュー ノースイ
 ースト 12034
- (72)発明者 フラル, ジョン
 アメリカ合衆国, ワシントン 98110, ベインブリッジ アイランド, マンザニタ レーン
 ノースイースト 11770
- (72)発明者 マクネイル, パトリシア ディー.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98003, フェデラル ウェイ, サウス トゥーハンドレッドナ
 インティース プレイス 1333
- (72)発明者 ホートン, レイモンド エル.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98021, ボセル, トゥーハンドレッドフォーティセカンド
 プレイス サウスイースト 2636
- (72)発明者 ビナル イグレック ドゥ バッソル, カルロタ
 ベルギー国, ベ - 1330 リクセンサール, リュ ドゥ ランスティテュ 89
- (72)発明者 フォイ, テレサ エム.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98003, フェデラル ウェイ, サウス トゥーハンドレッドセ
 ブンティーフセブンス プレイス 2104
- (72)発明者 渡部 良広
 アメリカ合衆国, ワシントン 98040, メルサー アイランド, セブンティーフエイズ アベニ
 ュ サウスイースト 2266
- (72)発明者 デン, タ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98026, エドモンズ, セブンティーフシックス アベニュー ウ
 エスト 18209

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 CA04 CA12 DA02 DA03 DA06 EA02
 EA04 GA14 HA12 HA15
 4B063 QA19 QQ02 QQ03 QQ43 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR72 QR82
 QS34 QX02
 4B065 AA26X AA90X AA93X AA93Y AA94X AB01 AC14 BA02 BA03 CA24
 CA46
 4C084 AA02 AA13 AA19 BA01 BA02 BA18 BA23 BA41 MA02 NA05
 NA14 ZA811 ZB022 ZB091 ZB092 ZB261

4C085 AA03 AA13 AA14

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 NA05 NA14 ZA81 ZB26

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 CA44 DA86 EA51 FA58 FA74

GA31 HA01

专利名称(译)	用于治疗 and 诊断前列腺癌的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2008271978A	公开(公告)日	2008-11-13
申请号	JP2008126447	申请日	2008-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	科里克萨有限公司		
申请(专利权)人(译)	Corixa公司公司		
[标]发明人	シュージャンチュン デイロンデイビンシー ミッチャムジェニファーエル ハーロツカースーザンエル ジアンユキウ ヘンダーソンロバートエー カロスマイケルディー ファンガーゲイリーアール レッターマークダブリュ ストルクジョンエー デイクレイグエイチ ベドビックトーマスエス カーターダリック リーサミュエルエックス ワンアイジュン スケイキーヤサーエーダブル ヘプラーウィリアムティー フラルジョン マクネイルパトリシアディー ホートンレイモンドエル ビナルイグレックドウバツソルカルロタ フォイテレサエム 渡部良広 デンタ		
发明人	シュー, ジアンチュン デイロン, デイビン シー. ミッチャム, ジェニファー エル. ハーロツカー, スーザン エル. ジアン, ユキウ ヘンダーソン, ロバート エー. カロス, マイケル ディー. ファンガー, ゲイリー アール. レッター, マーク ダブリュ. ストルク, ジョン エー. デイ, クレイグ エイチ. ベドビック, トーマス エス. カーター, ダリック リー, サミュエル エックス. ワン, アイジュン スケイキー, ヤサー エーダブル. ヘプラー, ウィリアム ティー. フラル, ジョン マクネイル, パトリシア ディー. ホートン, レイモンド エル.		

ビナル イグレック ドウ バッソル,カルロタ
 フォイ,テレサ エム.
 渡部 良広
 デン,タ

IPC分类号	C12N15/09 C07K7/06 C07K7/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K19/00 C12N5/06 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68 A61K38/00 A61K48/00 A61K39/395 A61K35/12 A61K39/00 A61K45/00 A61P37/04 A61P35/00 A61P13/08 G01N33/53 G01N33/574 C12N5/07 C12N5/0783 C12N5/09
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/06 C07K7/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K19/00 C12N5/00.E C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68.A A61K37/02 A61K48/00 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K35/12 A61K39/00.H A61K45/00 A61P37/04 A61P35/00 A61P13/08 G01N33/53.M G01N33/574.A A61K35/17.Z A61K35/76 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/03 A61K38/08 A61K38/10 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.202.L C12N5/00.202.U C12N5/0783 C12N5/09 C12N5/10
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA811 4C084/ZB022 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB261 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB64 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA81 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/CA44 4H045/DA86 4H045/EA51 4H045/FA58 4H045/FA74 4H045/GA31 4H045/HA01
代理人(译)	荒井英一
优先权	09/852911 2001-05-09 US 09/895814 2001-06-29 US 10/012896 2001-12-10 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：提供治疗和诊断癌症，特别是前列腺癌的组合物和方法。解决方案：该组合物包含一种或多种前列腺特异性多肽，其免疫原性部分，编码此类多肽的多核苷酸，表达此类多肽的抗原呈递细胞，以及对表达此类多肽的细胞特异的T细胞。 Z

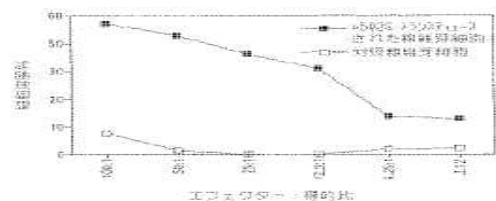


Fig. 1