

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 542768

(P2002 - 542768A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/02	ZNA	A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76		39/00	G 4 B 0 6 3
38/00		39/395	D 4 B 0 6 4
39/00			E 4 B 0 6 5
39/395			N 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全173数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 606630(P2000 - 606630)

(86)(22)出願日 平成12年3月15日(2000.3.15)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月19日(2001.9.19)

(86)国際出願番号 PCT/AU00/00189

(87)国際公開番号 W000/56770

(87)国際公開日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(31)優先権主張番号 PP 9321

(32)優先日 平成11年3月19日(1999.3.19)

(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)

(71)出願人 セント・ヴィンセンツ ホスピタル シドニー リミテッド
オーストラリア国 ニューサウスウェールズ 2010,ダーリングハースト,ヴィクトリア ストリート

(72)発明者 ワード, ロビン, リン
オーストラリア国 ニューサウスウェールズ 2025,ウォールラーラ,モンカー ストリート 20

(74)代理人 弁理士 廣江 武典

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 - p 5 3 抗体

(57)【要約】

本発明は、脊椎動物において p 5 3 蛋白質に対する抗体のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、およびそれらのヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドおよび抗体 (またはその断片) に関する。また、本発明は、診断および治療組成物の開発で用いられるヌクレオチド配列およびポリペプチド配列、および p 5 3 の異常性を呈する癌、慢性関節リウマチおよび他の病気状態の診断および治療でそれらの診断および治療組成物を用いる方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離され精製された核酸配列であって、該抗体（またはその断片）が脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有し、ここに、該核酸配列は天然に生じる病気に対する免疫応答を発現する脊椎動物宿主から得られることを特徴とする該核酸配列。

【請求項2】 該免疫応答が少なくとも1つのp53抗体の発現によって特徴付けられる請求項1記載の核酸配列。

【請求項3】 脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有するF_{ab}抗体断片（またはその断片）をコードするポリヌクレオチド配列を含む請求項1または2記載の核酸配列。

【請求項4】 配列番号1ないし30よりなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離され精製された核酸配列。

【請求項5】 該核酸配列がDNAである請求項1ないし4いずれか1記載の核酸配列。

【請求項6】 該核酸配列がRNAである請求項1ないし4いずれか1記載の核酸配列。

【請求項7】 該核酸配列が、抗体断片またはその他の免疫学的に活性な断片をコードするポリヌクレオチド配列またはそのアナログであり、ここに、該抗体（またはその断片）が脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する請求項1ないし6いずれか記載の核酸配列。

【請求項8】 該抗体断片または他の免疫学的に活性な断片が少なくとも1つの相補的な決定領域を含む請求項7記載の核酸配列。

【請求項9】 該抗体断片が少なくとも1つの機能的抗原-結合ドメインを含む請求項7または8記載の核酸配列。

【請求項10】 該抗体断片がF_v、F_{ab}、F(a_b)₂、scF_v（一本鎖F_v）、dAb（単ドメイン抗体）、二特異的抗体、ジアボディおよびトリアボディよりなる群から選択される請求項7ないし9いずれか1記載の核酸配列

。

【請求項11】 該抗体（またはその断片）がp53蛋白質またはその部分のN-末端、C-末端または中央ドメインのうちの1以上の残基に対する結合親和性を有する請求項1ないし10のいずれか1記載の核酸配列。

【請求項12】 該抗体（またはその断片）がp53蛋白質またはその部分のN-末端の残基に対する結合親和性を有する請求項1ないし11いずれか1記載の核酸配列。

【請求項13】 該抗体（またはその断片）がp53蛋白質またはその部分のN-末端の残基約10ないし約55に対する結合親和性を有する請求項1ないし12いずれか1記載の核酸配列。

【請求項14】 該抗体（またはその断片）がp53蛋白質またはその部分のN-末端の残基約10ないし約25に対する結合親和性を有する請求項1ないし12いずれか1記載の核酸配列。

【請求項15】 該抗体（またはその断片）がp53蛋白質またはその部分のN-末端の残基約40ないし約50に対する結合親和性を有する請求項1ないし12いずれか1記載の核酸配列。

【請求項16】 該抗体（またはその断片）がp53蛋白質またはその部分のN-末端の残基約27ないし約44に対する結合親和性を有する請求項1ないし12いずれか1記載の核酸配列。

【請求項17】 該抗体（またはその断片）がp53蛋白質またはその部分のN-末端の残基約40ないし約44に対する結合親和性を有する請求項1ないし12いずれか1記載の核酸配列。

【請求項18】 該抗体（またはその断片）がp53蛋白質の中央ドメインまたはその部分の残基に対する結合親和性を有する請求項1ないし11いずれか1記載の核酸配列。

【請求項19】 該配列が、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここに、該ポリヌクレオチド配列が、免疫グロブリンの軽鎖可変領域ポリペプチドまたは免疫グロブリンの重鎖可変領域ポリペプチドをコードする請求項1ないし18いずれか1記載の核酸配列。

【請求項20】 該配列が、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここに、該核酸配列が、免疫グロブリンの軽鎖可変領域をコードする第1のポリペプチド配列、および免疫グロブリンの重鎖可変領域ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド配列を含む請求項1ないし19いずれか1記載の核酸配列。

【請求項21】 該脊椎動物がヒト、非 - ヒト霊長類、ネズミ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、ウサギ、トリ、ネコおよびイヌよりなる群から選択される請求項1ないし20いずれか1記載の核酸配列。

【請求項22】 該脊椎動物がヒトである請求項1ないし21いずれか1記載の核酸配列。

【請求項23】 請求項1ないし22いずれか1記載の核酸配列のアナログを含み、ここに、該アナログは該ポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと機能的に同一である生物学的活性を有するポリペプチドをコードする単離され精製された核酸配列。

【請求項24】 該病気が癌、慢性関節リウマチおよび冠心臓病よりなる群から選択される請求項1ないし23いずれか1記載の核酸配列。

【請求項25】 該病気が癌である請求項24記載の核酸配列。

【請求項26】 該癌が発癌性腫瘍；結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管 / 生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍；肉腫のごとき間葉腫瘍；およびB細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍よりなる群から選択される請求項25記載の核酸配列。

【請求項27】 脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）のポリペプチドであって、ここに、該ポリペプチドが天然に生じる病気に対する免疫応答を発現する脊椎動物宿主から得られる該ポリペプチド。

【請求項28】 該免疫応答が少なくとも1つのp53抗体の発現によって特徴付けられる請求項27記載のポリペプチド。

【請求項29】 該ポリペプチドが、請求項1ないし26いずれか1記載の核酸配列によってコードされる単離され精製されたポリペプチド。

【請求項30】 配列番号31ないし60よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離され精製されたポリペプチド。

【請求項31】 該ポリペプチドがF_v、F_{ab}、F(ab)₂、scFv（一本鎖F_v）、dAb（単ドメイン抗体）、二特異的抗体、ジアボディおよびトリアボディよりなる群から選択される請求項27ないし30いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項32】 該ポリペプチドがp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する請求項27ないし31いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項33】 該ポリペプチドが、p53蛋白質のN-末端、C-末端または中央ドメインあるいはその部分の1以上の残基に対する結合親和性を有する請求項27ないし32いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項34】 該ポリペプチドがp53蛋白質のN-末端またはその部分の残基に対する結合親和性を有する請求項27ないし33いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項35】 該ポリペプチドがp53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約10ないし約55に対する結合親和性を有する請求項27ないし34いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項36】 該ポリペプチドがp53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約10ないし約25に対する結合親和性を有する請求項27ないし34いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項37】 該ポリペプチドがp53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約40ないし約50に対する結合親和性を有する請求項27ないし34いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項38】 該ポリペプチドがp53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約27ないし約44に対する結合親和性を有する請求項27ないし34いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項39】 該ポリペプチドがp53蛋白質のN-末端またはその部分

の残基約40ないし約44に対する結合親和性を有する請求項27ないし34いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項40】 該ポリペプチドがp53蛋白質の中央ドメインまたはその部分の残基に対して結合親和性を有する請求項27ないし33いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項41】 請求項27ないし40いずれか1記載のポリペプチドの相同ポリペプチドである単離され精製されたポリペプチド。

【請求項42】 該ポリペプチドが請求項27ないし40いずれか1記載のポリペプチドに対して少なくとも45%相同である請求項41記載のポリペプチド。

【請求項43】 該ポリペプチドが請求項27ないし40いずれか1記載のポリペプチドに対して少なくとも75%相同である請求項41記載のポリペプチド。

【請求項44】 該ポリペプチドが請求項27ないし40いずれか1記載のポリペプチドに対して少なくとも95%ないし99%相同である請求項41記載のポリペプチド。

【請求項45】 該病気が癌、慢性関節リウマチおよび冠心臓病よりなる群から選択される請求項27ないし44いずれか1記載のポリペプチド。

【請求項46】 該病気が癌である請求項45記載のポリペプチド。

【請求項47】 該癌が発癌性腫瘍；結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管 / 生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍；肉腫のごとき間葉腫瘍；およびB細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍よりなる群から選択される請求項46記載のポリペプチド。

【請求項48】 配列番号31ないし60いずれか1つのポリペプチドのペプチド断片であって、該ペプチド断片は脊椎動物に投与された場合に免疫応答を誘導する該ペプチド断片。

【請求項49】 該ペプチド断片が配列番号31ないし60いずれか1つの約5および約50の間の隣接アミノ酸を含む請求項48記載のペプチド断片。

【請求項50】 該ペプチド断片が配列番号31ないし60いずれか1つの約5および約30の間の隣接アミノ酸を含む請求項48または49記載のペプチド断片。

【請求項51】 該ペプチド断片が配列番号31ないし60いずれか1つの約8および約20の間の隣接アミノ酸を含む請求項48または50いずれか1記載のペプチド断片。

【請求項52】 該ペプチド断片が相補性決定領域に由来する請求項48記載のペプチド断片。

【請求項53】 該免疫応答がイディオタイプ応答である請求項48ないし52いずれか1記載のペプチド断片。

【請求項54】 該脊椎動物がヒトである請求項48ないし53いずれか1記載のペプチド断片。

【請求項55】 脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体またはその断片であって、該抗体は天然に生じる病気に対する免疫応答を発現する脊椎動物宿主から得られる該抗体またはその断片。

【請求項56】 該免疫応答がp53抗体の発現によって特徴づけられる請求項55記載の抗体またはその断片。

【請求項57】 脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有し、請求項27ないし47いずれか1記載のポリペプチドよりなる抗体またはその断片。

【請求項58】 脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有し、請求項1ないし26いずれか1記載の核酸配列によってコードされる抗体またはその断片。

【請求項59】 該断片が免疫学的に活性な断片である請求項55ないし58いずれか1記載の抗体断片。

【請求項60】 該断片が少なくとも1つの相補性決定領域を含む請求項55ないし59いずれか1記載の抗体断片。

【請求項61】 該断片がF_v、F_{a_b}、F(a_b)₂、s_cF_v(一本鎖F_v)、dAb(単ドメイン抗体)、二特異的抗体、ジアボディおよびトリアポ

ディよりなる群から選択される請求項55ないし60いずれか1記載の抗体断片。

【請求項62】 ポリクローナル抗体である請求項55ないし61いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項63】 モノクローナル抗体である請求項55ないし61いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項64】 該抗体またはその断片がp53蛋白質のN-末端、C-末端または中央ドメインあるいはその部分のうちの1以上の残基に対する結合親和性を有する請求項57ないし63いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項65】 該抗体またはその断片がp53蛋白質のN-末端またはその部分の残基に対する結合親和性を有する請求項57ないし64いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項66】 該抗体またはその断片がp53蛋白質のN-末端の残基約10ないし約55あるいはその部分に対する結合親和性を有する請求項57ないし65いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項67】 該抗体またはその断片がp53蛋白質のN-末端の残基約10ないし約25あるいはその部分に対する結合親和性を有する請求項57ないし65いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項68】 該抗体またはその断片がp53蛋白質のN-末端の残基約40ないし約50あるいはその部分に対する結合親和性を有する請求項57ないし65いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項69】 該抗体またはその断片がp53蛋白質のN-末端の残基約27ないし約44あるいはその部分に対する結合親和性を有する請求項57ないし65いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項70】 該抗体またはその断片がp53蛋白質のN-末端の残基約40ないし約44あるいはその部分に対する結合親和性を有する請求項57ないし65いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項71】 該抗体またはその断片がp53蛋白質の中央ドメインまたはその部分の残基に対する結合親和性を有する請求項57ないし64いずれか1

記載の抗体またはその断片。

【請求項72】 該病気が癌、慢性関節リウマチおよび冠心臓病よりなる群から選択される請求項55ないし71いずれか1記載の抗体またはその断片。

【請求項73】 該病気が癌である請求項72記載の抗体またはその断片。

【請求項74】 該癌が発癌性腫瘍；結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管 / 生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍；肉腫のごとき間葉腫瘍；およびB細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍よりなる群から選択される請求項73記載の抗体またはその断片。

【請求項75】 請求項1ないし26いずれか1記載の核酸配列を含むベクター。

【請求項76】 該ベクターがウイルス、プラスミド、バクテリオファージ、ファゲミド、コスミド、細菌、人工染色体および酵母人工染色体よりなる群から選択される請求項75記載のベクター。

【請求項77】 該バクテリオファージがgt10およびgt11およびファージ提示ベクターよりなる群から選択される請求項76記載のベクター。

【請求項78】 該ファージ提示ベクターがpCOMBベクターに由来するベクター類から選択される請求項77記載のベクター。

【請求項79】 該ファージ提示ベクターがMCO群のものである請求項76または77記載のベクター。

【請求項80】 該ファージ提示ベクターがMCO1、MCO3およびMCO6ベクターよりなる群から選択される請求項77ないし79いずれか1記載のベクター。

【請求項81】 該ファージ提示ベクターがMCO3である請求項77ないし80いずれか1記載のベクター。

【請求項82】 該ベクターが哺乳動物発現ベクターである請求項75記載のベクター。

【請求項83】 該哺乳動物発現ベクターがpG1D102 - MCOまたはpKN100 - MCOである請求項82記載のベクター。

【請求項84】 請求項75ないし83いずれか1記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項85】 該宿主細胞が*E. coli*、*Bacillus*、*Streptomyces*、*Pseudomonas*、*Salmonella*および*Serratia*よりなる群から選択される請求項84記載の宿主細胞。

【請求項86】 該宿主細胞が酵母、菌類、植物、昆虫細胞および哺乳動物細胞よりなる群から選択される請求項84記載の宿主細胞。

【請求項87】 該哺乳動物細胞がCHO細胞系、COS細胞系、HeLa細胞、L細胞、ネズミ3T3細胞、c6神経膠腫細胞および骨髓腫細胞系よりなる群から選択される請求項86記載の宿主細胞。

【請求項88】 該哺乳動物細胞がCHO DG44細胞である請求項86または87記載の宿主細胞。

【請求項89】 請求項84ないし88いずれか1記載の宿主細胞を含む非-ヒト脊椎動物。

【請求項90】 医薬上許容される担体、アジュバントおよび/または希釈剤と共に、請求項27ないし47いずれか1記載のポリペプチド、請求項48ないし54いずれか1記載のペプチド断片、または請求項55ないし74いずれか1記載の抗体またはその断片を含む医薬組成物。

【請求項91】 該ポリペプチドがポリペプチド/キレート、ポリペプチド/薬物、ポリペプチド/プロドラッグ、ポリペプチド/トキシン、ポリペプチド/イメージングマーカー、抗体/キレート、抗体/薬物、抗体/プロドラッグ、抗体/トキシンおよび抗体/イメージングマーカーよりなる群から選択される形態である請求項90記載の医薬組成物。

【請求項92】 該キレートが³⁰Y、¹³¹Iおよび¹⁸⁸Reよりなる群から選択される請求項91記載の医薬組成物。

【請求項93】 該薬物が細胞毒性薬物である請求項91記載の医薬組成物。

【請求項94】 該細胞毒性薬物がアドリアマイシン、メルファラン、シスプラチン、タキソール、フルオロウラシル、シクロフォスファミドよりなる群か

ら選択される請求項93記載の医薬組成物。

【請求項95】 該プロドラッグが抗体指向性プロドラッグ療法またはAD EPTである請求項91記載の医薬組成物。

【請求項96】 該トキシンがリシン、アブリン、ジフテリアトキシンおよびシュードモナスエンドトキシン(PE40)よりなる群から選択される請求項91記載の医薬組成物。

【請求項97】 該イメージングマーカが ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{189}Re および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ よりなる群から選択される請求項91記載の医薬組成物。

【請求項98】 該イメージングマーカがガドリニウムである請求項91記載の医薬組成物。

【請求項99】 医薬上許容される担体、アジュバントおよび/または希釈剤と共に、請求項1ないし26いずれか1記載の核酸配列またはその断片、または請求項27ないし47いずれか1記載のポリペプチド、または請求項48ないし54いずれか1記載のペプチド断片、または請求項55ないし74いずれか1記載の抗体またはその断片を含むワクチン。

【請求項100】 該ワクチンがイディオタイプワクチンである請求項99記載のワクチン。

【請求項101】 該ワクチンが経口、吸入、局所または非経口経路を介する投与用に処方される請求項99または100記載のワクチン。

【請求項102】 免疫学的に有効な量の請求項27ないし47いずれか1記載のポリペプチド(またはそのペプチド断片)、または請求項48ないし54いずれか1記載のペプチド断片、または請求項55ないし74いずれか1記載の抗体(またはその断片)、または請求項90ないし98いずれか1記載の医薬組成物、または請求項99ないし101いずれか1記載のワクチンを脊椎動物に投与することを特徴とする脊椎動物において病気に対する免疫応答を誘導する方法。

【請求項103】 該ポリペプチド、ペプチド断片または抗体(またはその断片)が医薬上許容される担体、アジュバントおよび/または希釈剤と共に投与

される請求項102記載の方法。

【請求項104】 治療上有効量の請求項27ないし47いずれか1記載のポリペプチド（またはそのペプチド断片）、または請求項48ないし54いずれか1記載のペプチド断片、または請求項55ないし74いずれか1記載の抗体（またはその断片）、または請求項90ないし98いずれか1記載の医薬組成物、または請求項99ないし101いずれか1記載のワクチンを脊椎動物に投与することを特徴とする、治療および/または予防を必要とする脊椎動物において病気を治療および/または予防する方法。

【請求項105】 該病気が癌、慢性関節リウマチおよび冠心臓病よりなる群から選択される請求項102ないし104いずれか1記載の方法。

【請求項106】 該病気が癌である請求項102ないし105いずれか1記載の方法。

【請求項107】 該癌が発癌性腫瘍；結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管/生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍；肉腫のごとき間葉腫瘍；およびB細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍よりなる群から選択される請求項106記載の方法。

【請求項108】 診断上許容される担体および/または希釈剤と共に、請求項55ないし74いずれか1記載の抗体（またはその断片）を含む、脊椎動物においてp53遺伝子によってコードされたポリペプチドの検出用の診断キット。

【請求項109】 (a) 請求項55ないし74いずれか1記載の抗体（またはその断片）を含有する第1の容器および

(b) 検出可能な標識と共に該抗体（またはその断片）の結合パートナーを含むコンジュゲートを含有する第2の容器を含む請求項108記載の診断キット。

【請求項110】 (a) 脊椎動物からの試料を、請求項1ないし26いずれか1記載の核酸配列、またはそのオリゴヌクレオチド断片を含む核酸プローブと接触させ、次いで、

(b) 核酸試料およびポリヌクレオチド配列の間のハイブリダイゼーションを

検出することを特徴とする脊椎動物において病気をスクリーニングする方法。

【請求項111】 該オリゴヌクレオチド断片が長さが約10ないし約100ヌクレオチドの間で請求項110記載の方法。

【請求項112】 該オリゴヌクレオチド断片が長さが約15ないし約30ヌクレオチドの間で請求項110または111記載の方法。

【請求項113】 非-ハイブリダイゼーションと比較したハイブリダイゼーションが病気を示す請求項110ないし112いずれか1記載の方法。

【請求項114】 該病気が癌である請求項110ないし113いずれか1記載の方法。

【請求項115】 ハイブリダイゼーションが低、中程度または高ストリンジェンシー下で行われる請求項110ないし114いずれか1記載の方法。

【請求項116】 ハイブリダイゼーションが高ストリンジェンシー下で行われる請求項110ないし115いずれか1記載の方法。

【請求項117】 (a) 脊椎動物からの試料を、請求項55ないし74いずれか1記載の抗体(またはその断片)を接触させ、次いで、

(b) p53ポリペプチドに結合した抗体(またはその断片)の存在を検出することを特徴とする脊椎動物において病気をスクリーニングする方法。

【請求項118】 該病気が癌である請求項117記載の方法。

【請求項119】 (a) 請求項1ないし26いずれか1記載の核酸配列、または請求項75ないし83いずれか1記載のベクターを宿主細胞に挿入し；(b) 形質転換細胞において核酸配列を発現させることを特徴とする遺伝子治療方法。

【請求項120】 該ベクターが発現ベクターである請求項119記載の方法。

【請求項121】 (a) 請求項1ないし26いずれか1記載の核酸配列を脊椎動物から単離し；

(b) 該核酸配列をベクターにクローニングし；

(c) 抗体断片ライブラリーを構築し、次いで、

(d) 注目する抗体を発現するクローンにつき該ライブラリーをスクリーニン

グする；

ことを特徴とする脊椎動物において、p 5 3 蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）の製法。

【請求項 1 2 2】 該抗体（またはその断片）が、脊椎動物において、p 5 3 蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する請求項 1 2 1 記載の方法。

【請求項 1 2 3】 該核酸配列が病気にかかった器官、または病気の発現についての収集点から得られる請求項 1 2 1 記載の製法。

【請求項 1 2 4】 該器官がリンパ節である請求項 1 2 3 記載の製法。

【請求項 1 2 5】 該ベクターがファージ提示ベクターである請求項 1 2 1 ないし 1 2 4 いずれか 1 記載の製法。

【請求項 1 2 6】 該ベクターが M C O 1、M C O 3 および M C O 6 よりなる群から選択される請求項 1 2 5 記載の製法。

【請求項 1 2 7】 該ベクターが M C O 1 である請求項 1 2 5 または 1 2 6 記載の製法。

【請求項 1 2 8】 請求項 1 ないし 2 6 いずれか 1 記載の核酸配列またはそのオリゴヌクレオチド断片を用い、脊椎動物において p 5 3 蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を突き止める方法。

【請求項 1 2 9】 (a) 生物学的試料を、請求項 1 ないし 2 6 いずれか 1 記載の核酸配列またはそのオリゴヌクレオチド断片と接触させ、次いで、

(b) 該核酸配列またはオリゴヌクレオチド断片にハイブリダイズする生物学的試料中のヌクレオチド配列を同定することを含む請求項 1 2 8 記載の方法。

【請求項 1 3 0】 該オリゴヌクレオチド断片が長さが約 1 0 ないし約 1 0 0 の間のヌクレオチドである請求項 1 2 9 記載の方法。

【請求項 1 3 1】 該オリゴヌクレオチド断片が長さが約 1 5 ないし約 3 0 の間のヌクレオチドである請求項 1 2 9 または 1 3 0 記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、脊椎動物においてp53蛋白質に対する抗体のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、およびそれらのヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドおよび抗体（またはその断片）に関する。また、本発明は診断および治療組成物の開発で用いられるヌクレオチド配列およびp53の異常性を呈する癌、慢性関節リウマチおよび他の病気状態の診断および治療においてそれらの診断および治療組成物を用いる方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

p53遺伝子はヒト腫瘍の50%を超えて突然変異されている(1)。中央DNA結合ドメイン中の点突然変異は最も頻繁に観察される突然変異であり(2)立体配座変化による機能の喪失をもたらす(3)。突然変異した蛋白質の半減期は、通常、腫瘍細胞におけるp53の蓄積の増大した結果となる。突然変異体蛋白質のこの蓄積は、幾人かの癌患者において当該蛋白質に対する免疫応答の発生で因子を意味する(4)。野生型p53の立体配座は静的ではなく、野生型および突然変異体の表現型または立体配座の間の変化は、例えば、イン・ビトロにおいて緩衝液条件、モノクローナル抗体、キナーゼおよび酵素によって、あるいはイン・ビボにてキナーゼ、ホスファターゼおよび他のp53調節蛋白質によって誘導される。

【0003】

抗-p53血清抗体は、癌およびある範囲の種々の腫瘍を持つ個体の30%までで検出されている。p53に対するモノクローナル抗体(MAb)は、p53の機能および腫瘍形成におけるその役割の調査において価値あるものであった。

【0004】

Ma bの発生に対する分子的アプローチは、EBV形質転換またはハイブリドーマ技術のごとき伝統的な方法よりも優れたいくつかの利点を提供する。部分的には、これは、ヒトにおいてはこれらの伝統的方法がしばしばあるB細胞集団に

対する偏りおよび、不安定であるかまたは低レベルの抗体を生産するにすぎない細胞系の創製の結果となるからである(5)。対照的に、分子遺伝学アプローチは、入手できるBリンパ球のいずれかの源からの遺伝物質の使用が、クローン化された重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子のランダムな組合せを創製するのを可能とする。

【0005】

癌患者におけるp53に対する免疫応答の従前の研究は血清分析に頼ってきた。これらの研究は、抗-p53免疫応答の発生における臨床的重要性、エピトープの優性遺伝および蛋白質過剰発現の役割に対して重要な情報を生み出してきた。しかしながら、いくつかの非常に重要な問題が未解決のまま残されている。現在、通常の細胞不滅化方法または分子生物学的手法いずれかによってヒト抗-p53 Mabは単離されていない。よって、ヒト抗-p53抗体V遺伝子用法、体細胞突然変異の程度および抗-p53抗体の構造的特徴について入手できる情報はない。そのような情報は、p53に対する液性免疫応答の性質および重要性の有意義な理解に非常に有用である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は抗-p53抗体の単離を記載する。これらの抗体のヌクレオチド配列および遺伝子用法を調べた。これらの抗体は、正常および病気状態において、並びにイディオタイプワクチンを含めたワクチンの開発において、当該蛋白質の機能的研究、p53の診断評価で用いる豊富な源である。

【0007】

【課題を解決するための手段】

1. p53に対する抗体またはその断片のポリペプチドをコードする核酸。

本発明の第1の具体例によると、抗体(またはその断片)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離され精製された核酸配列が提供され、ここに、該抗体(またはその断片)は脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対して結合親和性を有し、ここに、該核酸配列は天然に生じる病気に対する免疫応答を発現する脊椎動物宿主から得られる。

【0008】

典型的には、免疫応答は少なくとも1つのp53抗体の発現によって特徴付けられる。

【0009】

典型的には、核酸分子は、脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有するF_{ab}抗体断片（またはその断片）をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0010】

本発明の第2の具体例によると、配列番号1ないし30よりなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離され精製された核酸分子が提供される。

【0011】

以下の特徴は本発明の第1および第2の具体例に関する。

【0012】

典型的には、核酸分子はDNAまたはRNA分子に対応する。

【0013】

一般に、核酸分子が、抗体断片または相補性決定領域のごとき他の免疫学的に活性なその断片をコードするポリヌクレオチド配列またはそのアナログを含み、ここに、該抗体（またはその断片）は脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対して結合親和性を有する。

【0014】

典型的には、抗体断片は機能的抗原-結合ドメインを有する。なおより典型的には、抗体断片はF_v、F_{ab}、F(ab)₂、scFv（一本鎖Fv）、dAb（単ドメイン抗体）、二特異的抗体、ジアボディおよびトリアボディよりなる群から選択される形態で存在することができる。

【0015】

典型的には、抗体（またはその断片）はp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する。より典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端、C-末端または中央ドメインあるいはその部分のうちの1以上の残基に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体（またはその断片

)は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基に対する結合親和性を有する。さらにより典型的には、抗体(またはその断片)は残基約10ないし約55に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体(またはその断片)は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約10ないし約25、または約40ないし約50、または約27ないし約44、あるいはp53蛋白質のN-末端あるいはその部分の約40ないし約44に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体(またはその断片)は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約27ないし約44に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体(またはその断片)は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約40ないし約44に対する結合親和性を有する。

【0016】

なおより典型的には、抗体(またはその断片)は、p53蛋白質の中央ドメインまたはその部分の残基に対する結合親和性を有する。

【0017】

典型的には、核酸分子は、脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体(またはその断片)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここに、該ポリヌクレオチド配列は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域ポリペプチドまたは免疫グロブリンの重鎖可変領域ポリペプチドをコードする。

【0018】

より典型的には、核酸分子は、脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体(またはその断片)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここに、該核酸分子は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド配列、および免疫グロブリンの重鎖可変領域ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド配列を含む。

【0019】

典型的には、免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列は、免疫グロブリン軽鎖可変(V領域)および連結(J領域)セグメントをコー

ドするポリヌクレオチド配列を含む。

【0020】

典型的には、免疫グロブリン重鎖可変領域ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチド配列は、免疫グロブリン重鎖可変（V領域）、多様性（D領域）および連結（J領域）セグメントをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0021】

より典型的には、また、核酸分子が、免疫グロブリン重鎖可変もしくは免疫グロブリン軽鎖領域と作動可能に連結した1以上の免疫グロブリン定常領域をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0022】

なおより典型的には、免疫グロブリン定常領域の少なくとも1つは、免疫グロブリン可変領域が由来する源とは異なる源に由来することができる。なおより典型的には、免疫グロブリン定常領域が由来する源がヒトである。

【0023】

典型的には、p53蛋白質またはその部分は野生型または突然変異体p53遺伝子によってコードされる。

【0024】

典型的には、脊椎動物はヒト、非-ヒト霊長類、ネズミ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、ウサギ、トリ、ネコおよびイヌよりなる群から選択される。より典型的には、脊椎動物はヒト、非-ヒト霊長類またはネズミである。なおより典型的には、脊椎動物はヒトである。

【0025】

典型的には、また、核酸分子は、その範囲内に、本発明の第1または第2の具体例に関して定義されたポリヌクレオチド配列のアナログを含み、ここに、該アナログは本発明の第1または第2の具体例に関して定義されたポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと機能的に同一である生物学的活性を有するポリペプチドをコードし、ここに、該ポリヌクレオチド配列は、過度の試験および実験なくして分子生物学における標準的な技術を用いて位置決定し、単離することができる。

【0026】

典型的には、また、核酸分子は、その範囲内に、本発明の第1および第2の具体例に関して定義されたポリヌクレオチド配列のアナログを含み、これはそのように定義されたポリヌクレオチド配列に対して少なくとも45%相同性を有する。より典型的には、ポリヌクレオチド配列のアナログは少なくとも55%相同性を有し、なおさらに典型的には、アナログは少なくとも60%相同性を有し、なおより典型的には、アナログは少なくとも75%相同性を有し、なおさらに典型的には、アナログは少なくとも85%相同性を有し、なおより典型的には、アナログは少なくとも90%相同性を有し、なおよりさらに典型的には、アナログはそのように定義されたポリヌクレオチド配列に対して少なくとも95ないし99%相同性を有する。

【0027】

2つの核酸配列の間の相同性の程度は、GCGプログラムパッケージに提供されるGAPのごとき当該分野で公知のコンピュータプログラムによって決定されることができる (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B.およびWunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453)。DNA配列比較について以下の設定を持つGAP使用: 5.0のGAP創製ペナルティおよび0.3のGAP延長ペナルティ。

【0028】

抗体配列は、例えば、5のギャップ創製ペナルティおよび0.3のギャップ幅ペナルティの血管設定を用い、GCGプログラムパッケージの一部として利用できるPileupアラインメントソフトウェアを用いて相互に整列させることができる。

【0029】

典型的には、また、核酸分子は、その範囲内に、本発明の第1または第2の具体例に関して定義されたポリヌクレオチド配列のアナログを含み、ここに、該アナログは低ストリンジェンシーの条件下でポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる。より典型的には、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は $6 \times \text{SSC}$ 中で 50°C で行われるハイブリダイゼーションに対応する。

【0030】

所与の核酸分子が特定の核酸にハイブリダイズするか否かを決定するための適当な実験条件は、調べるべき核酸の関連試料を含有するフィルターを $5 \times \text{SSC}$ 中に10分間予備浸漬させること、および $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルトの溶液、 $0.5\% \text{SDS}$ および $100 \mu\text{g/ml}$ の変性音波処理サケ精子DNAの溶液中に該フィルターを予備ハイブリダイゼーションさせること、続いて、Sambrookら、(1989; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Springs Harbor, New York)に記載されたハイブリダイゼーション方法に従って、 10ng/ml の ^{32}P -dCTP-標識プローブの濃度を含有する同一溶液中でほぼ 45°C にて12時間ハイブリダイゼーションすることを含むことができる。

【0031】

次いで、少なくとも 55°C にて(低ストリンジェンシー)、少なくとも 60°C にて(中程度のストリンジェンシー)、ストリンジェンシー 65°C にて(中程度/高ストリンジェンシー)、少なくとも 70°C にて(高ストリンジェンシー)、または少なくとも 75°C にて(非常に高ストリンジェンシー)、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 中で、次いで、該フィルターを30分間2回洗浄する。ハイブリダイゼーションはX-線フィルムへのフィルターの暴露によって検出することができる。

【0032】

さらに、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを変更するのに使用することができる当業者によく知られた多数の条件および因子がある。例えば、第

2の核酸分子にハイブリダイズすべき核酸の長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成)；ホルムアミド、デキストラン硫酸、ポリエチレングリコール等の存在または不存在のごとき塩および他の成分の濃度；およびハイブリダイゼーションの温度および/または洗浄工程の変更。

【0033】

さらに、2つの所与の核酸配列がある特定の条件下でハイブリダイズするか否かを理論的に予測することができる。従って、前記した経験的方法の代替法として、本発明の第1または第2の具体例に従って核酸分子にアナログ核酸配列がハイブリダイズするか否かに関する決定は、塩濃度および温度のごとき特定の条件下で公知の配列を持つ2つの異種核酸配列がハイブリダイズする T_m (融解温度)の理論的計算に基づることができる。

【0034】

異種核酸配列についての融解温度(T_m (融解))を決定するにおいて、まず、相同核酸配列についての融解温度(T_m (相同))を決定する必要がある。2つの十分に相補的な核酸ストランド(ホモデュプレックス形成)の間の融解温度(T_m (相同))は、以下のごとく、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons、1995に概説された以下の式に従って決定することができる：

$$T_m(\text{相同}) = 81.5 + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\% \text{形態}) - 500/L$$

M = 一価カチオンのモル濃度

$\%GC$ = 配列中の塩基の合計数の%グアニン(G)およびシトシン(C)

$\% \text{形態}$ = ハイブリダイゼーション緩衝液中の%ホルムアミド

L = 核酸配列の長さ

【0035】

前記式によって決定された T_m は、2つの十分に相補的な核酸配列の間のホモデュプレックス形成の T_m である(T_m (相同))。 T_m 値を2つの異種核酸配列のそれに適合させるためには、2つの異種配列の間のヌクレオチド配列における1%差異が T_m における1%減少に等しいと仮定する。従って、ヘテロデュプ

レックス形成のための T_m (異種) は、 T_m (相同) から、問題の相同配列および前記ヌクレオチドプローブの間の相同性%差異を差し引くことによって得られる。

【0036】

典型的には、また、核酸分子は、その範囲内に、本発明の第1または第2の具体例に従って定義されたポリヌクレオチド配列のアナログを含み、これは、遺伝子暗号の縮重のため、本発明の第2の具体例に従って定義されたポリヌクレオチド配列とはハイブリダイズしないが、脊椎動物において、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体(またはその断片)のポリペプチドをコードする。

【0037】

典型的には、本発明の第1または第2の具体例に従って定義された核酸分子は、その範囲内に、本発明の第1または第2の具体例に従って定義されたポリヌクレオチド配列のオリゴヌクレオチド断片である核酸分子を含む。

【0038】

典型的には、オリゴヌクレオチド断片は長さが約10および約100の間のヌクレオチドである。より典型的には、オリゴヌクレオチド断片は長さが約10および約75の間のヌクレオチドである。なおより典型的には、オリゴヌクレオチド断片は長さが約15および約50の間のヌクレオチドである。さらになおより典型的には、オリゴヌクレオチド断片は長さが約15および約30の間のヌクレオチドである。なおさらに典型的には、オリゴヌクレオチド断片は長さが約5および約25の間のヌクレオチドである。

【0039】

2. p53に対する抗体またはその断片のポリペプチドおよび/またはp53に対する抗体またはその断片

本発明の第3の具体例により、脊椎動物において、p53蛋白質またはその断片に対する結合親和性を有する抗体(またはその断片)のポリペプチドが提供され、ここに、該ポリペプチドは天然に生じる病気に対する免疫応答を発現する脊椎動物宿主から得られる。

【0040】

典型的には、免疫応答は少なくとも1つのp53抗体の発現によって特徴付けられる。

【0041】

本発明の第4の具体例により、ポリペプチドが提供され、ここに、該ポリペプチドは本発明の第1または第2の具体例に従って定義された核酸分子によってコードされる。

【0042】

本発明の第5の具体例により、配列番号31ないし60よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドが提供される。

【0043】

以下の特徴は本発明の第3、第4および第5の具体例に関する。

【0044】

典型的には、該ポリペプチドは機能的抗原-結合ドメイン、すなわち、重鎖および軽鎖可変ドメインを含む。なおより典型的には、抗体（またはその断片）のポリペプチドは F_v 、 F_{ab} 、 $F(ab)_2$ 、 $scFv$ （一本鎖 F_v ）、 dAb （単ドメイン抗体）、二特異的抗体、ジアボディおよびトリアボディよりなる群から選択される形態で存在することができる。

【0045】

典型的には、ポリペプチドはp53蛋白質またはその部分に対する結合特性を有する。より典型的には、抗体はp53蛋白質のN-末端、C-末端または中央ドメインあるいはその部分のうちの1以上の残基に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体はp53蛋白質のN-末端またはその部分の残基に対する結合親和性を有する。さらにより典型的には、抗体は残基約10ないし約55に対する結合親和性を有する。さらになお典型的には、抗体は、p53のN-末端またはその部分の残基約10ないし約25、または約40ないし約50、または約27ないし約44、またはp53蛋白質のN-末端またはその部分の約40ないし約44に対する結合親和性を有する。なおさらに典型的には、抗体はp53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約27ないし約44に対する結合親

和性を有する。なおより典型的には、抗体はp 5 3蛋白質のN - 末端またはその部分の残基約40ないし約44に対する結合親和性を有する。

【0046】

なおより典型的には、抗体はp 5 3蛋白質の中央ドメインまたはその一部の残基に対する結合親和性を有する。

【0047】

典型的には、ポリペプチドは免疫グロブリンの軽鎖可変領域または重鎖可変領域ポリペプチドに対応する。

【0048】

より典型的には、ポリペプチドは免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドに対応する第1のポリペプチド、および免疫グロブリン重鎖可変領域ポリペプチドに対応する第2のポリペプチドを含む。

【0049】

典型的には、免疫グロブリン軽鎖可変領域ポリペプチドは免疫グロブリン軽鎖可変(V領域)および結合(J領域)セグメントを含む。

【0050】

典型的には、免疫グロブリン重鎖可変領域ポリペプチドは免疫グロブリン重鎖可変(V領域)、多様性(D領域)および結合(J領域)セグメントを含む。

【0051】

より典型的には、また、ポリペプチドは免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変領域に作動可能に結合した免疫グロブリン定常領域に対応するポリペプチドを含む。なおより典型的には、定常領域の少なくとも1つは、それから可変領域が由来する源とは異なる源に由来することができる。さらになお典型的には、それから定常領域が由来する源はヒトである。

【0052】

典型的には、ポリペプチドは、その範囲内に、第3、第4または第5の具体例のポリペプチドのペプチド断片を含み、ここに、該ペプチド断片はp 5 3蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する。

【0053】

典型的には、ポリペプチドのペプチド断片は約5ないし約50の間の隣接アミノ酸である。より典型的には、約5ないし約35の間の隣接アミノ酸である。なおより典型的には、約5ないし約30の間の隣接アミノ酸である。さらにより典型的には、約5ないし約25の間の隣接アミノ酸である。さらになお典型的には、約8ないし約20の間の隣接アミノ酸である。

【0054】

典型的には、また、ポリペプチドは、その範囲内に、本発明の第3、第4または第5に従って定義されたポリペプチドの相同ポリペプチドを含み、これは、かく定義されたポリペプチド配列に対して少なくとも35%相同性を有する。より典型的には、ポリペプチド配列の相同体は少なくとも45%相同性を有し、さらにより典型的には、相同体は少なくとも65%の相同体を有し、なおより典型的には、相同体は少なくとも75%の相同体を有し、さらになお典型的には、相同体は少なくとも85%の相同体を有し、なおより典型的には、相同体は少なくとも約90%の相同体を有し、さらになおより典型的には、相同体は少なくとも95ないし99%の相同体を有する。

【0055】

ポリペプチドに適用されるごとく、最適に整列された場合の2つのポリペプチド配列の間の相同性の程度は、欠陥ギャップ重率を用い、例えば：BLAZE (Intelligentics) GAP、BESTFIT、ALIGNのごとき当該分野で知られたコンピュータ整列プログラムの使用を介して決定することができる。1つの具体的な例は、配列比較について以下の設定：5.0のGAP創製ペナルティーおよび0.3GNPの延長ペナルティーを用い、GCGプログラムパッケージで提供される (Program Manual For the Wisconsin Package, Version 8, August 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453)。

【0056】

本発明の第6の具体例により、抗体（またはその断片）が提供され、ここに、該抗体（またはその断片）は脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有し、ここに、該抗体は天然に生じる病気に対する免疫応答を発現する脊椎動物宿主から得られる。

【0057】

典型的には免疫応答は少なくとも1つのp53の抗体の発現において特徴付けられる。

【0058】

典型的には、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）は、本発明の第1または第2の具体例に従って定義された核酸分子によってコードされた抗体（またはその断片）に対応する。

【0059】

本発明の第7の具体例により、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）が提供され、ここに、該抗体（またはその断片）は、本発明の第3、第4または第5の具体例に従って定義されたポリペプチドを含む。

【0060】

典型的には、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対して結合親和性を有する抗体（またはその断片）は、本発明の第3、第4または第5の具体例に従って定義されたポリペプチドに対応する。

【0061】

典型的には、明細書を通じて記載するごとく、抗体は、全抗体、または抗体断片、または相補性決定領域のごとき他の免疫学的に活性なその断片であり得る。より典型的には、抗体断片は機能的抗原-結合ドメイン、すなわち、重鎖および軽鎖可変ドメインを有する。なおより典型的には、抗体断片は F_v 、 F_{ab} 、 $F(ab)_2$ 、 $scFv$ （一本鎖 F_v ）、 dAb （単一ドメイン抗体）、二特異的抗体、ジアボディーおよびトリアボディーよりなる群から選択される形態で存在す

ることができる。

【0062】

以下の特徴は本発明の第6および第7の具体例に関する。

【0063】

典型的には、抗体（またはその断片）はポリクローナルまたはモノクローナル抗体である。より典型的には、抗体（またはその断片）はモノクローナル抗体である。なおより典型的には、モノクローナル抗体は分子遺伝学、ハイブリドーマまたはEBV（エプスタイン・バールウイルス）形質転換技術を用いて作成される。なおより典型的には、モノクローナル抗体は、コンビナトリアル抗体ライブラリーまたはファージ提示技術を介し、組換え抗体技術を用いて作成することができる。

【0064】

典型的には、抗体（またはその断片）はp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する。より典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端、C-末端または中央ドメインあるいはその部分の内の1以上の残基に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基に対する結合親和性を有する。さらにより典型的には、抗体（またはその断片）は、残基約10ないし約55に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約10ないし約25、または約40ないし約50、または約27ないし約44、あるいはp53蛋白質のN-末端またはその部分の約40ないし約44に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約27ないし約44に対する結合親和性を有する。さらにより典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約40ないし約44に対する結合親和性を有する。

【0065】

なおより典型的には、抗体はp53蛋白質の中央ドメインまたはその部分の残基に対する結合親和性を有する。

【0066】

以下の特徴は本発明の第1ないし第7の具体例に関する。

【0067】

典型的には、該病気は癌、慢性関節リウマチおよび冠心臓病よりなる群から選択される。より典型的には、該病気は癌である。典型的には、癌は発癌性腫瘍；結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管 / 生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍；肉腫のごとき間葉腫瘍；およびB細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍よりなる群から選択される。

【0068】

本発明の第8の具体例により、本発明の第1または第2の具体例に従って定義された核酸分子を含むベクターが提供される。

【0069】

典型的には、該ベクターはシャトルまたは発現ベクターである。より典型的には、ベクターはウイルス、プラスミド、バクテリオファージ、ファゲニド、コスミド、細菌人工染色体および酵母人工染色体よりなる群から選択される。

【0070】

典型的には、ベクターはプラスミドであって、pBR322、M13mp18、pUC18およびpUC19よりなる群から選択することができる。

【0071】

典型的には、ベクターはバクテリオファージであって、gt10およびgt11またはファージ提示ベクター類から選択することができる。より典型的には、ファージ提示ベクターはpCOMBベクター類に由来するベクター類から選択される。なおより典型的には、ファージ提示ベクターはMCO群のものであり、これは、例えば、MCO1、MCO3およびMCO6ベクターを含むことができる。なおより典型的には、ベクターはMCO3である。

【0072】

典型的には、ベクターはpG1D102 - MCOまたはpKN100 - MCOのごとき哺乳動物発現ベクターである。

【0073】

典型的には、ベクターは複製起点、プロモーター、エンハンサーのごとき発現制御配列、およびリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位および翻訳ターミネーター配列のごとき必要なプロセッシング情報部位を含む。

【0074】

より典型的には、MCOベクターは、とりわけ、ポリペプチドタグ、アンバーコドン、遺伝子III、重鎖および軽鎖特異的マルチクローニング部位、ompAおよび/またはpelBリーダー配列、スブチリシン切断部位および/または6ヒスチジンタグを含有する。

【0075】

なおより典型的には、ベクターは所望のポリヌクレオチド配列で形質転換された細胞の検出を可能とする選択マーカーを含むことができる。

【0076】

典型的には、ベクターは異種コーディング配列または第3、第4または第5の具体例のポリペプチドを含む融合蛋白質の発現を可能とする配列を含むことができる。

【0077】

本発明の第9の具体例により、本発明の第8の具体例に従って定義されたベクターで形質転換された宿主細胞が提供される。

【0078】

典型的には、宿主細胞は天然における原核生物または真核生物である。

【0079】

より典型的には、原核生物宿主細胞は細菌を含み、そのような細菌の例はE. coli、Bacillus、Streptomyces、Pseudomonas、Salmonella、およびSerratiaを含む。

【0080】

より典型的には、真核生物宿主細胞は酵母、ポリープ、植物、昆虫細胞および哺乳動物細胞（イン・ビボまたは組織培養いずれかにおけるもの）よりなる群か

ら選択することができる。哺乳動物細胞の例はCHO細胞系、COS細胞系、HeLa細胞、L細胞、ネズミ3T3細胞、c6神経膠細胞および骨髓腫細胞系を含む。

【0081】

さらにより典型的には、真核生物宿主細胞はCHO DG44細胞である。

【0082】

本発明の第10の具体例により、本発明の第9の具体例に従って定義された宿主細胞を含む脊椎動物が提供され、ここに、該脊椎動物はヒトを含まない。

【0083】

3. 医薬/治療および診断組成物

本発明の第11の具体例により、医薬上許容される担体、アジュバントおよび/または希釈剤と共に、本発明の第3、第4または第5の具体例に従って定義されたポリペプチド、またはペプチド断片、あるいは本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体(またはその断片)を含む医薬組成物が提供される。

【0084】

典型的には、医薬組成物に存在する抗体は全抗体として存在することができるか、あるいは抗体断片または相補性決定領域のごとき他の免疫学的に活性な断片として存在することができる。より典型的には、抗体断片は機能的抗原-結合ドメイン、すなわち、重鎖および軽鎖可変ドメインを有する。なおより典型的には、抗体断片はFv、F_{ab}、F(ab)₂、scFv(一本鎖Fv)、dAb(単一ドメイン抗体)、二特異的抗体、ジアボディおよびトリアボディよりなる群から選択される。

【0085】

典型的には、医薬組成物に存在するポリペプチド、ペプチド断片または抗体またはその断片ポリペプチド/キレート、ポリペプチド/薬物、ポリペプチド/プロドラッグ、ポリペプチド/トキシン、ポリペプチド/イメージングマーカー、抗体/キレート、抗体/薬物、抗体/プロドラッグ、抗体/トキシンおよび抗体/イメージングマーカーよりなる群から選択される形態で存在することもできる。

。

【0086】

より典型的には、キレートは ^{90}Y 、 ^{131}I および ^{188}Re よりなる群から選択される。

【0087】

より典型的には、薬物は細胞毒性薬物であり得る。なおより典型的には、細胞毒性薬物はアドリアマイシン、メルフアラン、シスプラチン、タキソール、フルオロウラシル、シクロホスファミド、および、ここに引用してその全内容を一体化させる(「The Chemotherapy Source Book」, M. C. Perry WilliamsおよびWilkins, 第2版, 1996)に含まれるものごとき当業者に知られた他のものよりなる群から選択することができる。

【0088】

より典型的には、該プロドラッグは抗体指向性プロドラッグ療法またはADEPTである。

【0089】

より典型的には、該トキシンはリシン、アブリン、ジフテリアトキシンおよびシュードモナスエンドトキシン(PE40)よりなる群から選択することができる。

【0090】

典型的には、該イメージングマーカーは、ガンマカウンターまたは手で保持されたガンマプローブによって検出することができる物質、および核磁気共鳴スペクトロメーターを用いて核磁気共鳴イメージングによって検出することができる物質を含む。

【0091】

より典型的には、ガンマスキャナーを用いて検出することができるイメージングマーカーは ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{189}Re および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ よりなる群から選択されるイメージングマーカーを含む。

【0092】

典型的には、核磁気共鳴スペクトロメーターを用いて検出することができるイメージングマーカーはガドリニウムである。

【0093】

典型的には、本発明の第11の具体例に従う医薬組成物はG-CSF、GM-CSF、インターロイキンのごときサイトカインを含むことができる。

【0094】

典型的には、本発明の第11の具体例に従う医薬組成物はマンナンのごときアジュバンドを含むことができる。

【0095】

本発明の第12の具体例により、ワクチンが提供され、該ワクチンは、医薬上許容される担体、アジュバントおよび/または希釈剤と共に、本発明の第1または第2の具体例に従って定義された核酸分子またはその断片、または本発明の第3、第4または第5の具体例に従って定義されたポリペプチドまたはペプチド断片、または本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体またはその断片を含む。

【0096】

典型的には、該ワクチンはイディオタイプワクチンである。

【0097】

典型的には、本発明の抗体（またはその断片）はイディオタイプ免疫原として用いることができる。このようにして用いる場合、本発明の抗体（またはその断片）は免疫原として機能することができ、元の抗体（Ab1）のイディオタイプに対する第2の抗体（Ab2）およびT細胞（ T_2 ）応答を誘導する。Ab2抗体は抗原結合部位（イディオタイプ）を含めた元の抗体上のエピトープに結合することができる。抗-イディオタイプ抗体、Ab2は、Ab1と同一のエピトープを認識することができる抗-抗-イディオタイプ抗体（Ab3）ならびにT細胞（ T_3 ）を自然に誘導することができる。第1の抗体はp53エピトープおよびAb2双方に結合することができるので、Ab2は（p53上の）抗原エピトープの構造を模倣する。Ab3抗体のある割合は元の抗体と同一のエピトープに

結合し、元の抗体の効率を増加させ遅延させることができる。この抗 - イディオタイプネットワークの誘導の結果、部分的には、p 53 - 特異的CTLの誘導を介して転移から保護される。

【0098】

あるいは、本発明のポリペプチドのペプチド断片を含むワクチン組成物はペプチドの合成によって調整されうる、たとえば該ペプチドは本発明のポリペプチドのCDRおよび/またはFRの選択アミノ酸領域を構成することができる典型的に本発明のポリペプチドのペプチド断片は脊椎動物において蛋白質またはp 53その部分の結合親和性をもつこともできるしもたないこともできる。

【0099】

別法として、該ワクチンは経口、吸入、局所または非経口経路を介する投与用に処方される。より典型的には、投与の経路は非経口である。

【0100】

本発明の第13の具体例により、免疫学的に有効量の本発明の第3、第4または第5の具体例に従って定義されたポリペプチド（またはそのペプチド断片）、または本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体（またはその断片）、または本発明の第11の具体例に従って定義された医薬組成物、または本発明の第12の具体例に従って定義されたワクチンを脊椎動物に投与することを含む、脊椎動物において病気に対する免疫応答を誘導する方法が提供される。

【0101】

典型的には、本発明の第13の具体例に従って投与されるポリペプチド、またはペプチド断片、または抗体（またはその断片）は医薬上許容される担体、アジュバントおよび/または希釈剤と共に投与される。

【0102】

典型的には、本発明の第13の具体例に従って投与されるポリペプチド、またはペプチド断片、または抗体（またはその断片）は、G-CSF、GM-CSF、インターロイキンのごときサイトカインと同時にまたは順次に投与することもできる。

【0103】

典型的には、本発明の第13の具体例による医薬組成物はマンナンのごときアジュバントを含むこともできる。

【0104】

本発明の第14の具体例により、脊椎動物において病気に対する免疫応答を誘導するにおいて使用される場合の、本発明の第3、第4または第5の具体例に従って定義されたポリペプチド（またはそのペプチド断片）、または本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体（またはその断片）、または本発明の第11の具体例に従って定義された医薬組成物、または本発明の第12の具体例に従って定義されたワクチンが提供される。

【0105】

本発明の第15の具体例により、本発明の第3、第4または第5の具体例に従って定義されたポリペプチド（またはそのペプチド断片）、または本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体（またはその断片）の、脊椎動物における病気に対する免疫応答を誘導するためのワクチンの調製における使用が提供される。

【0106】

本発明の第16の具体例により、免疫学的に有効な量の本発明の第12の具体例に従って定義されたワクチンを脊椎動物に投与することを含む、脊椎動物において病気に対する免疫応答を誘導する方法が提供される。

【0107】

本発明の第17の具体例により、脊椎動物において病気に対する免疫応答を誘導するのに使用する場合の、本発明の第12の具体例に従って定義されたワクチンが提供される。

【0108】

本発明の第18の具体例により、治療および/または予防を必要とする脊椎動物において病気を治療および/または予防する方法が提供され、該方法は、治療上有効量の、本発明の第3、第4または第5の具体例によるポリペプチド（またはそのペプチド断片）、本発明の第6または第7の具体例による抗体（またはその断片）、本発明の第11の具体例によって定義された医薬組成物、または本

発明の第12の具体例によって定義されたワクチンを投与することを含む。

【0109】

本発明の第19の具体例により、治療および/または予防を必要とする脊椎動物において病気の治療/または予防で用いる場合の、本発明の第3、第4または第5の具体例によるポリペプチド(またはそのペプチド断片)、または本発明の第6または第7の具体例による抗体(またはその断片)、または本発明の第11の具体例により定義された医薬組成物、または本発明の第12の具体例により定義されたワクチンが提供される。

【0110】

本発明の第20の具体例により、治療および/または予防を必要とする脊椎動物において病気の治療および/または予防を行うための医薬の調製における、本発明の第3、第4または第5の具体例によるポリペプチド(またはそのペプチド断片)、または本発明の第6または第7の具体例による抗体(またはその断片)、または本発明の第11の具体例により定義された医薬組成物、または本発明の第12の具体例により定義されたワクチンの使用が提供される。

【0111】

典型的には、該病気は癌、慢性関節リウマチおよび冠心臓病よりなる群から選択される。より典型的には、該病気は癌である。

【0112】

該癌が発癌性腫瘍; 結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管/生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍; 肉腫のごとき間葉腫瘍; およびB細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍よりなる群から選択される。

【0113】

4. 抗体/核酸ベースの方法およびp53を検出するためのキット

本発明の第21の具体例により、診断上許容される担体および/または希釈剤とともに、本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体(またはその断片)を含む、脊椎動物においてp53遺伝子によってコードされたポリペプチドの検出のための診断キットが提供される。

【0114】

典型的には、該キットは以下の容器：

(a) 本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体（またはその断片）を含有する第1の容器、および

(b) 検出可能な標識と共に、抗体（またはその断片）の結合パートナーを含むコンジュゲートを含有する第2の容器；

を含むことができる。

【0115】

より典型的には、該キットは、さらに、洗浄試薬、および結合した抗体の存在を検出することができる他の試薬のような他の成分を含有する1以上の他の容器を含むことができる。なおより典型的には、該検出試薬は標識された（2次）抗体を含むことができ、または、ここに、本発明の抗体（またはその断片）はそれ自体標識され、当該区画は本発明の標識された抗体（またはその断片）と反応することができる抗体結合試薬を含むことができる。

【0116】

本発明の第22の具体例により、

(a) 脊椎動物からの試料を核酸プローブと接触させ、次いで、

(b) 該核酸試料およびポリヌクレオチド配列の間のハイブリダイゼーションを検出する；

ことを特徴とする脊椎動物において病気につきスクリーニングする方法が提供される。

【0117】

典型的には、非 - ハイブリダイゼーションと比較したハイブリダイゼーションは病気を示す。典型的には、該病気は癌である。

【0118】

典型的には、該核酸プローブは、試料からの核酸に選択的にハイブリダイズすることができる本発明の第1または第2の具体例に従って定義されたポリヌクレオチド配列の部分に対応する。

【0119】

典型的には、ハイブリダイゼーションは当業者にとってルーチン的かつ標準的である技術を介して起こし、検出することができ、該技術はサザーンおよびノーザンハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）およびリガーゼ鎖反応（LCR）増幅を含む。

【0120】

所望の特異性および選択性に応じて、種々の低い、中程度または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションレベルを用いることができる。

【0121】

本発明の第23の具体例により、

(a) 脊椎動物からの試料を、本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体（またはその断片）と接触させ、次いで、

(b) p53ポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する；

ことを含む脊椎動物において病気につきスクリーニングする方法が提供される。

【0122】

典型的には、正常レベルを比較した試料中のp53ポリペプチドの変化したレベルは病気を示す。典型的には、該病気は癌である。

【0123】

5. 遺伝子治療

本発明の第24の具体例により、遺伝子治療の方法が提供され、該方法は：

(a) 本発明の第1または第2の具体例に従って定義された核酸分子、または本発明の第8の具体例に従って定義されたベクターを宿主細胞に挿入し、

(b) 形質転換された細胞において核酸分子を発現させる；

ことを含む。

【0124】

典型的には、核酸分子またはベクターは、マイクロインジェクション、CaPO₄沈殿、エレクトロポレーション、リポフェクション/リポソーム融合、粒子衝撃および核酸の化学的に修飾された蛋白質へのカップリングより成る群から選択される方法を用いて挿入される。

【0125】

典型的には、核酸分子またはベクターは宿主細胞の核に挿入される。

【0126】

典型的には、核酸分子を含有する発現ベクターは細胞に挿入され、該細胞はイン・ビトロで増殖され、次いで、多数患者に注入される。より典型的には、ベトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ-関連ウイルス、ヘルペスウイルス、いくつかのRNAウイルスまたはウシパピローマウイルスのようなウイルスに由来する発現ベクターを、標的化細胞集団への核酸の送達で用いることができる。より典型的には、標的化細胞集団は腫瘍細胞を含む。

【0127】

6. 脊椎動物におけるp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）の調製

本発明の第25の具体例により、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）を製造する方法が提供され、該製法は：

- (a) 脊椎動物から、本発明の第1または第2の具体例によって定義された核酸分子を単離し、
 - (b) 該核酸分子をベクターにクローンし、
 - (c) 抗体断片ライブラリーを構築し、次いで、
 - (d) 注目する抗体を発現するクローンにつき該ライブラリーをスクリーニングする；
- ことを含む。

【0128】

典型的には、本発明の第25の具体例に従って定義された該製法によって調製された抗体（またはその断片）は、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する。

【0129】

典型的には、核酸試料は、p53と反応性の抗体を発現する、p53の発現に関連した病気に罹った個体から得られる。より典型的には、該病気は癌、慢性関

節リウマチおよび冠心臓病よりなる群から選択される。なおより典型的には、該病気は癌である。さらにより典型的には、該癌が発癌性腫瘍；結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管 / 生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍；肉腫のごとき間葉腫瘍；およびB細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍よりなる群から選択される。

【0130】

典型的には、核酸試料は病気に罹った器官、または該病気の発現の収集点から採取される。なおより典型的には、該器官はリンパ節である。

【0131】

典型的には、核酸試料は本発明の第1または第2の具体例によるポリヌクレオチド配列より成る。

【0132】

典型的には、核酸試料はmRNAである。より典型的には、クローンはRT-PCR（逆転写構想 - PCR）を介して調製され、適当なベクターにクローンされる。

【0133】

典型的には、ベクターはファージ提示ベクターである。より典型的には、ベクターはMCO1、MCO3、およびMCO6より成る群から選択される。なおより典型的には、ベクターはMCO1である。

【0134】

典型的には、核酸クローンはファージ提示ライブラリーにパッケージされて一次抗体ライブラリーを得る。より典型的には、ファージ提示ライブラリーは、組換えp53に対してパンすることによって増幅し、得られた抗体を選択した。

【0135】

典型的には、抗体ライブラリーは抗体断片を発現するクローンを表し、ここに、該抗体はp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する。より典型的には、抗体断片はF_a_b断片である。なおより典型的には、組換え抗体断片は精製される。さらにより典型的には、抗体断片はp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する。

【0136】

典型的には、p53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）は本発明の第6または第7の具体例に従って定義される。

【0137】

本発明の第26の具体例により、本発明の第1または第2の具体例の核酸分子を用い、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を突き止める方法が提供される。

【0138】

典型的には、該方法は：

(a) 生物学的試料と、本発明の第1または第2の具体例の核酸分子とを接触させ、次いで、

(b) 該核酸分子にハイブリダイズする生物学的試料中のヌクレオチド配列を同定する；
ことを含む。

【0139】

典型的には、工程(a)は相同配列のハイブリダイゼーションを促進する条件下で行われ、その条件は当業者によく知られている。

【0140】

本発明のこの具体例で特に考えられるのは、抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列をつきとめる方法であり、ここに、該抗体は脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する。

【0141】

典型的には、該方法は、p53蛋白質のN-末端、C-末端または中央ドメインあるいはその部分のうちの1以上の残基に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を突き止める方法である。

【0142】

より典型的には、該方法は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基に

対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を突き止める方法である。

【0143】

なおより典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体（またはその断片）は残基約10ないし約55に対する結合親和性を有する。さらにより典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約10ないし約25、または約40ないし約50、または約27ないし約44、またはp53蛋白質のN-末端またはその部分の約40ないし約44に対する結合親和性を有する。なおより典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約27ないし約44に対する結合親和性を有する。さらにより典型的には、抗体（またはその断片）は、p53蛋白質のN-末端またはその部分の残基約40ないし約44に対する結合親和性を有する。

【0144】

なおより典型的には、該方法は、p53蛋白質の中央ドメインまたはその部分の残基に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を突き止める方法である。

【0145】

定義

用語「抗体」は、抗原上の特異的エピトープに結合することができる免疫グロブリン分子を意味する。抗体はポリクローナル混合物よりなることができるか、あるいは性質はモノクローナルであってよい。さらに、抗体は天然源から、または組換え源に由来する全免疫グロブリンであり得る。本発明の抗体は、例えば、全抗体として、または抗体断片、あるいは相補性決定領域のごときその他の免疫学的に活性な断片を含めた種々の形態で存在することができる。同様に、抗体は機能的抗原-結合ドメインすなわち、重鎖および軽鎖可変ドメインを有する抗体断片として存在することができる。また、抗体断片はFv、Fab、F(ab)₂、sFv（一本鎖Fv）、dAb（単ドメイン抗体）、二特異的抗体、ジ

アボディおよびトリアボディよりなる群から選択される形態で存在することができる。

【0146】

「抗原 - 認識部分」は、抗体の標的抗原（またはエピトープまたはイディオタイプ）への結合および/またはその認識を担う抗体（またはその断片）の可変領域の1以上の部分を意味する。例えば、それはCDR領域または全可変領域、あるいは抗体の結合特性を変化させることなく、当該領域に誘導することができるコーディング領域中のいずれの変化も含めたこれらの2つの領域のいずれかの組合せを含む。

【0147】

本発明の抗体（またはその断片）は、脊椎動物においてp53蛋白質またはその部分に対する結合親和性を有する。好ましくは、本発明の抗体（またはその断片）は約 $10^5 M^{-1}$ を超える、より好ましくは約 $10^6 M^{-1}$ を超える、なおより好ましくは約 $10^7 M^{-1}$ を超える、最も好ましくは、 $10^8 M^{-1}$ を超える結合親和性または親和力を有する。結合親和性を生じさせるおよびそれを総括する技術はScatchard(1949), *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51, 660-672およびMunson(1983), *Methods in Enzymology* 92, 543-577(ここに引用してその各々の内容を一体化させる)にレビューされている。

【0148】

本明細書中で用いるごとく、「遺伝子導入」は、外来性核酸分子を細胞に導入するプロセスを意味する。遺伝子導入は、当該遺伝子によってコードされる特定の産物の発現を可能とするように通常は行われる。該産物は蛋白質、ポリペプチド、アンチセンスDNA またはRNAあるいは酵素的に活性なRNAを含むことができる。遺伝子導入は培養した細胞において、または動物への直接的投与によって行うことができる。一般に、遺伝子導入は、非特異的または受容体媒介相互作用による標的細胞との核酸の接触、膜を通過のまたはエンドサイトーシスによる核酸の細胞への摂取、および原形質膜またはエンドソームからの核酸の細

胞質への放出のプロセスを含む。発現は、加えて、細胞の核への核酸の移動、および転写のための適切な核因子への結合を必要とするであろう。

【0149】

本明細書中で用いるごとく、「遺伝子治療」は遺伝子導入の形態であり、ここで用いられる遺伝子導入の定義内に含まれ、具体的には、イン・ビボまたはイン・ビトロで細胞からの治療産物を発現させるための遺伝子導入をいう。遺伝子導入は、エクス・ビボで細胞に対して行うことができ、次いで、該細胞は患者に移植されるか、あるいは患者への核酸または核酸-蛋白質複合体の直接的投与によって行うことができるか、あるいは患者への修飾細胞の導入によって行うことができる。

【0150】

本明細書中で用いるごとく、用語「天然に生じる病気」とは、自然に起こったが、遺伝子内には誘導されない病気をいう。

【0151】

遺伝子または遺伝子産物の点において、用語「野生型」とは、天然に生じる種のメンバーのほとんどに特徴的であるその遺伝子または遺伝子産物をいい、かくして、任意に、遺伝子または遺伝子産物の「正常」または「野生型」形態を命名する。

【0152】

遺伝子または遺伝子産物の点において、用語「突然変異体」とは、野生型遺伝子もしくは遺伝子産物と比較した場合の遺伝子または遺伝子産物の変化をいう。

【0153】

用語「単離され精製された」とは、問題の物質がその宿主から取り出され、伴う不純物が減少されるかまたは排除されたことを意味する。本質的には、それは、目的の種が存在する支配的な種であり（すなわち、モラーベースで、それが組成物中でいずれかの他の個々の種よりも豊富であり）好ましくは、実質的に精製された画分が、目的の種が存在する全てのマクロ分子種の（モラーベースで）少なくとも約30%を含む組成物であることを意味する。一般に、実質的に純粋な組成物は、当該組成物に存在する全てのマクロ分子種の約80ないし90%を超

えて含む。最も好ましくは、目的の種は実質的に均一に精製され（汚染した種は通常の検出方法によって組成物中に検出できない）、ここに、該組成物は実質的に単一のマクロ分子種より成る。

【0154】

用語「作動可能に連結した」とは、例えば、核酸がもう1つの核酸配列と機能的な関係におかれる場合にそれが「作動可能に連結された」状況をいう。例えば、もしそれがコーディング配列の転写を行うならば、プロモーターまたはエンハンサーはコーディング配列に作動可能に連結している。

【0155】

保存的アミノ酸置換とは、同様の側鎖を有する残基の相互交換性をいう。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群はセリン、およびスレオニンであり；アミド-含有側鎖を有するアミノ酸の群はアスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群はフェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群はリシン、アルギニン、およびヒスチジンであり；硫黄-含有側鎖を有するアミノ酸の群はシステインおよびメチオニンである。典型的には、保存アミノ酸置換基はバリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリンおよびアスパラギン-グルタミンである。

【0156】

本明細書中で用いるごとく、用語「ポリペプチド」とは、ペプチド結合によって一緒に結合されたアミノ酸よりなるポリマーを意味する。

【0157】

アミノ酸配列を参照して本明細書中で用いる用語「アナログ」とは、本発明の核酸配列の誘導体である配列を意味し、その誘導体は1以上の塩基の付加、欠失、置換を含み、ここに、コードされたポリペプチドは配列番号1ないし30の核酸配列によってコードされるポリペプチドと実質的に同一の機能を保持する。

【0158】

本明細書の文脈では用語「を含む」は「原理的には含むが、必ずしもそれだけ

ではない」を意味する。さらに、「含む」のごとき語句「を含む」の変形はそれに対応して変化した意味を有する。

【0159】

【本発明の実施の態様】

1. p53に対する抗体またはその断片のポリペプチドをコードする核酸

ここに記載する単離された核酸分子の機能的同等体は本発明の範囲内に含まれる。遺伝暗号の縮重は、同一アミノ酸を特定する他のコドンによるあるコドンの置換を可能とし、よって、同一の蛋白質を生起するであろう。核酸配列は実質適に変化できる。というのはメチオニンおよびトリプトファンを例外として、公知のアミノ酸は1を超えるコドンによってコードできるからである。かくして、本発明のポリヌクレオチド配列の一部または全部は、ここに記載されたものとはかなり異なる核酸配列を生じるように合成できるであろう(図4)。しかしながら、そのコードされたアミノ酸配列は保存されるであろう。

【0160】

加えて、核酸配列は、図4に示された核酸またはその誘導体の5'-末端/または3'-末端への少なくとも1つのヌクレオチドの付加、欠失、または置換に由来するヌクレオチド配列を含むことができる。例えば、本発明は、本発明の核酸配列またはその誘導体の5'-末端における開始コドンとしてのATGの付加から、または本発明のヌクレオチド配列またはその誘導体の3'-末端における終止コドンとしてのTTA、TAGまたTGAの付加から得られるいずれの核酸配列も含めることも意図する。さらに、本発明の核酸分子は、必要であれば、その5'-末端および/または3'-末端に付加された制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有することができる。

【0161】

与えられた核酸配列のそのような機能的改編は、それに融合した外来性核酸配列によってコードされる異種蛋白質の分泌および/またはプロセッシングを促進する機会を供する。遺伝子暗号によって許された本発明のヌクレオチド配列およびその断片の全ての変形は従って本発明に含まれる。

【0162】

さらに、コドンを欠失させ、または縮重コドン以外のコドンによって1以上のコドン置き換えて構造的に修飾されたポリペプチド(未修飾核酸分子によって生じたポリペプチドの実質的に同一の利用性または活性を有するもの)を得ることができる。当該分野で認識されているごとく、2つのポリペプチドは、核酸分子の間の差異が遺伝暗号の縮重に関連しないが、その生成を引き起こす2つの核酸分子がそうであるように機能的に同等である。

【0163】

本発明の第1または第2の具体例による核酸分子は、天然に結合したまたは異種のプロモーター領域を含めた、コーディング配列に作動可能に連結した発現制御配列を含むことができる。好ましくは、発現制御配列は、原核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトできるベクター中の天然の厳格生物であろう。なおより好ましくは、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドはファージ提示ベクターにクローンされる。

【0164】

しかしながら、本発明の第1または第2の具体例による核酸分子は真核生物発現系にクローンすることもでき、また、天然に会合したまたは異種プロモーター領域を含めた、コーディング配列に作動可能に連結した発現制御配列を含むこともできる。好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトできるベクター中の真核生物プロモーター系であろう。

【0165】

一旦ベクターが適当な宿主に取り込まれたならば、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現、発現された免疫グロブリンの収集および精製に適した条件下に維持される。

【0166】

さらに、宿主細胞は、ベクターの宿主への挿入に際して、ベクターの選択された特徴が、関連する発現されたポリペプチドが宿主細胞の表面で提示され、または培養基に分泌/発現されるのを可能とするように選択される。そのような細胞の例は、各々、X L 1 - B l u eおよびH B 2 1 5 1を含む。効果的には、いずれかの非-サプレッサー株によるF a bの可溶性発現が考えられ、これらは、E

. coli HB2151またはMC1061を含む。あるいは、E. coli XL1-blueまたはTG-1のごとき、ファージの表面に融合したFabの発現のためのサブレッサー株。

【0167】

これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、または宿主染色体DNAの一体的一部として宿主生物で複製することができる。例えば、典型的な選択マーカーはアンピシリン - 抵抗性またはヒグロマイシン - 抵抗性を含み、それにより、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能とする。

【0168】

一般に、原核生物は本発明のDNA配列をクローニングするのに使用することができる。E. coliは、本発明のDNA配列をクローンするのに特に有用な1つの原核生物宿主である。典型的には、E. coliは、それ自体が細菌中で生産されるファージによって、Fabのごとき抗体（またはその断片）を生産する。具体的な例は、可溶性抗体（またはその断片）を発現するHB2151、および、細胞表面で、例えば、ファージ提示で抗体（またはその断片）を発現するXL1-Blueを含む。

【0169】

また、酵母のごとき真核生物もまた発現で有用である。Saccharomyces種は好ましい酵母宿主であり、適当なベクターは、所望の発現制御配列、複製起点、終止配列等を有する。典型的な酵母プロモーターは、とりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチクロームC、およびマルトースおよびガラクトシダーゼ資化を担う酵素からのプロモーターを含む。

【0170】

また、哺乳動物細胞は、免疫グロブリンまたはその断片をコードするヌクレオチドセグメントを発現させるための典型的な宿主である。無傷異種蛋白質を分泌することができる多数の適当な宿主細胞が当該分野で開発されており、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、HeLa細胞、L細胞および骨髓腫細胞系を含む。これらの細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサーのごとき発現制御配列、およびリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポ

リアデニル化部位および転写ターミネーター配列のごとき必要なプロセッシング情報部位を含むことができる。

【0171】

注目するDNAセグメントを含有するベクターは、細胞宿主のタイプに応じて、よく知られた方法によって宿主細胞に導入することができる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションおよびエレクトロポレーションは原核生物細胞で通常に利用され、他方、リン酸カルシウム処理、エレクトロポレーション、リポフェクション、バイオティックスまたはウイルス-ベースのトランスフェクションは他の細胞宿主で使用することができる。哺乳動物細胞を形質転換するのに使用される他の方法はトランスフェクション、形質転換、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、ポリブレン、リポソーム、エレクトロポレーション、パーティクルガン技術およびマイクロインジェクションの使用を含む（一般に、S a m b o o k ら , 1989参照）。

【0172】

ベクターの導入の後、受容体宿主細胞は、一般に、導入されたベクターを含有する細胞の増殖を固有に選択する選択培地で増殖させる。種々のインキュベーション条件を用いて本発明のポリペプチドを形成することができるが、最も好ましい条件は生理条件を模倣する条件である。

【0173】

別法として、本発明の核酸配列の修飾または不活化はよく知られたアンチセンス技術、すなわち、ポリペプチドをコードする配列と相補的にヌクレオチド配列な関係する技術を用いて行うことができる。より具体例には、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドの生産は改変することができる、すなわち、細胞中で転写することができ、細胞中で生産された結果としてのmRNAにハイブリダイズすることができるポリペプチドをコードするこれらの核酸配列と相補的なポリヌクレオチド配列を導入することによって減少または排除することができる。相補的アンチセンスヌクレオチド配列がポリヌクレオチドmRNAにハイブリダイズするのを可能とする条件下で反応が起こることに基づき、かくして、翻訳されたポリペプチドの量は改変される、すなわち、減少または排除される。

【0174】

2. p53に対する抗体またはその断片のポリペプチドおよび/またはp53に対する抗体またはその断片

抗体または免疫グロブリンは、典型的には、4つの共有結合したペプチド鎖よりなる。例えば、IgG抗体は2つの軽鎖および2つの重鎖を有する。各軽鎖は重鎖に共有結合している。今度は、各重鎖は他のものに共有結合して、免疫グロブリン立体配座としても知られている「Y」立体配置を形成する。これらの分子の断片、または各重鎖または軽鎖単独は抗原に結合することができる。

【0175】

正常な抗体重鎖および軽鎖はN-末端(NH₂)可変(V)領域、およびC-末端(COOH)定常(C)領域を有する。重鎖可変領域はV_Hといわれ(例えば、Vを含む)、軽鎖可変領域はV_Lといわれる(VおよびVを含む)。可変領域は抗体同族抗原に結合する分子の一部であり、他方、重鎖上のFc領域(C領域の第2および第3ドメイン)は抗体のエフェクター機能(例えば、相補的固定、オプソニ化)を決定する。全長免疫グロブリンまたは抗体「軽鎖」は、N-末端の可変領域遺伝子およびC-末端の(カッパ)または(ラムダ)定常領域は遺伝子によってコードされる。全長免疫グロブリンまたは抗体「重鎖」は、同様に、可変領域遺伝子および定常領域遺伝子、例えば、ガンマのものによってコードされる。典型的には、「V_L」はV_LおよびJ_L(Jまたは結合領域)遺伝子セグメントによってコードされる軽鎖の一部を含み、「V_H」はV_HおよびD_H(Dまたは多様性領域)およびJ_H遺伝子セグメントによってコードされる重鎖の一部を含む。

【0176】

免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変領域は、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって腸段される「フレームワーク」領域よりなる。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は種内で比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域、すなわち、構成成分の軽鎖および重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域は、三次元空間においてCDRを位置させ整列させるように働く。CDRは、主として、抗原のエピトームの結合を担う。CDR

は、典型的には、N - 末端から出発して順次番号が付けられ、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 とされる。

【0177】

軽鎖の2つのタイプ、 (κ) および (λ) はイソタイプと言われる。イソタイプ決定基は、典型的には、一般に C_L 、特に C_{L1} または C_{L2} とも言われる、軽鎖の定常領域に存在する。同様に、 C_H としても知られる重鎖分子の定常領域は抗体のイソタイプを決定する。抗体は、重鎖のイソタイプに応じて Ig M、Ig D、Ig G、Ig A および Ig E と呼ばれる。イソタイプは、各々、重鎖定常領域の μ (ミュー)、 (δ) 、 (γ) 、 (α) および (ϵ) セグメントにコードされる。

【0178】

重鎖イソタイプは、オプソニ化または補体固定のごとき抗体の異なるエフェクター機能を決定する。加えて、重鎖イソタイプは抗体の分泌された形態を決定する。分泌された Ig G、Ig D および Ig E イソタイプは、典型的には、単一の単位またはモノマー形態で見いだされる。分泌された Ig M イソタイプはペンタマー形態で見いだされ；分泌された Ig A はモノマーおよびダイマー双方の形態で見いだすことができる。

【0179】

関連する態様において、本発明はモノクローナル抗体、または Fab (Fab)₂、scFv (一本鎖Fv) dAb (単ドメイン抗体)、二特異的抗体、ジアポディーおよびトリアポディー、または他の免疫学的に活性なその断片 (例えば、CDR領域) をその要旨とする。そのような断片は免疫抑制剤として有用である。別法として、本発明の抗体はエフェクターまたはレポーター分子をそれに付着させることができる。例えば、本発明の抗体またはその断片は、共有架橋構造によってそれに付着した重金属原子、またはリシンのごときトキシンをキレート化するためにマクロ環を有することができる。加えて、完全な抗体分子のFcの断片 CH_3 ドメインは、キレート、トキシン、薬物またはプロドラッグのごとき酵素またはトキシン分子によって置き換え、またはコンジュゲートすることができ、免疫グロブリン鎖の一部はビオチン、フルオロプローン、ホスフォターゼ

およびペルオキシダーゼのごときポリペプチドエフェクターまたはレポーター分子と結合させることができる。また、当業者によく知られた標準的な手法に従って二特異的抗体を生産することもできる。

【0180】

本発明では、さらに、抗体の可変および/または定常領域を遺伝的に修飾して、相同な可変および定常領域アミノ酸配列を効果的に含ませることが考えられる。一般的に可変領域の変化は、抗体またはその断片の抗原結合特性を改良または修飾するようになすことができるであろう。定常領域の変化は、一般に、補体固定化、膜との相互作用、他のエフェクター機能のごとき生物学的特性を改良または修飾するようになされるであろう。

【0181】

この文脈においては、効果的に相同性とは、抗体（またはその断片）の可変領域の一次構造における差異は抗体またはその断片の結合特徴を変化させることができないという概念を言う。得られた抗体またはその断片がその所望の特性を保有する限り、アミノ酸の変化は効果的に相同性の配列において許容される。

【0182】

ポリペプチドまたは抗体もしくはその断片に置けるアミノ酸の変化は関連分野の当業者によく知られた技術によって行うことができる。例えば、アミノ酸の変化は、適切なリーディングフレームが維持されるという制限下で、ヌクレオチド付加、欠失、または置換を含むヌクレオチド置き換え技術に行うことができる。例示的な技術はランダム突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、オリゴヌクレオチド-媒介またはポリヌクレオチド-媒介突然変異誘発、存在するまたは作成された制限酵素部位の使用を介する選択された領域の欠失、ポリメラーゼ鎖反応を含む。

【0183】

関連する態様において、本発明では、さらに、配列番号31ないし60のポリペプチドのペプチド断片が考えられる。例えば、約5および約50の間の隣接アミノ酸、好ましくは約5および約35の間のアミノ酸、なおより好ましくは約5および約30の間のアミノ酸、さらにより好ましくは約5および約25の間のア

ミノ酸、なおさらに好ましくは約8および約20の間のアミノ酸を含むペプチド断片が本発明のこの態様で考えられる。そのようなペプチド断片はp53蛋白質またはその部分に対する親和性を有していても有していなくてもよいことが当業者に認識されるであろう。

【0184】

例えば、ペプチド断片は、本発明のポリペプチドのV_L鎖および/またはV_A鎖から選択することができる。好ましくは、ペプチド断片は相補性決定領域(CDR)および/またはV_Hおよび/またはV_L鎖フレームワーク領域(FR)から選択することができる。なおより好ましくペプチド断片はCDRのV_Hおよび/またはV_L領域より選択される。

【0185】

本発明のペプチド断片は、例えば、イディオタイプ応答を生じさせるために免疫化プロトコルにおいて産業的用途を見出す。当業者によって認識されるであろうとく、本発明のペプチド断片を用いて、p53(野生型または突然変異体)に対する免疫性を誘導するのに効果的な量の投与によってそのような免疫化を必要とする患者を免疫化することができる。当該分野における1つの技術は、ルーチの実験によって、ペプチド断片のどのような効果的な非毒性量がこの目的用であるかを決定することができるであろう。一般に、しかしながら、効果的な投与量は、用量当たり約5ミリグラムないし100ミリグラム、好ましくは用量当たり約5ミリグラムないし約75ミリグラム、より好ましくは用量当たり約10ミリグラムないし約50ミリグラムなおより好ましくは用量当たり約20ミリグラムないし約40ミリグラムの範囲にあると予測される。

【0186】

また、本発明の第3、第4および第5の具体例のポリペプチドもおよび/または第6および第7の具体例の抗体は、脊椎動物においてp53蛋白質の機能的な研究で有用である。当業者に明らかなように、例示的な研究は、正常および病気態においてp53発現を決定するアッセイ、細胞の増殖およびp53に結合する抗体の増殖に対する効果を含む。例えば、機能的な研究は、イン・ビボまたはイン・ビトロで行うことができる。より好ましくは、機能的な研究はイン・ビトロで行わ

れる。

【0187】

3. 医薬 / 治療および診断組成物

もう一つの態様において、本発明は、本発明の抗体（またはその断片）が、治療、予防または診断用途で供される医薬組成物をその要旨とする。また、そのような抗体は免疫トキシン、すなわち、2つの成分によって特徴付けられ、イン・ビトロまたはイン・ビボで選択された細胞を殺すのに特に有用な分子として供することもできる。1つの成分は、付着または吸収された場合に通常細胞に致命的である細胞毒製剤である。「送達ビヒクル」として知られている第2の成分は、毒性剤を癌腫細胞のごとき特定の細胞型に送達する手段を提供する。2つの成分は、種々のよく知られた化学的または遺伝子的手法のいずれかによって通常は一緒に化学的に結合される。例えば、細胞毒性剤が蛋白質であって、第2の成分が無傷免疫グロブリンである場合結合はヘテロ二官能性架橋剤、例えば、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によることができる。

【0188】

一旦発現されれば、本発明のポリペプチドは、HPLC精製、サイズ排除、イオン交換および免疫アフィニティー（カラム）クロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含めた当該分野で標準的な手法に従って精製することができる。

【0189】

本発明の抗体は、癌を含めた多数のヒトの病気に対する受動的または能動的治療剤として用いることができ、ここに、そのような癌は、発癌性腫瘍；結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管 / 生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍；肉腫のごとき間葉腫瘍；およびB細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍を含むことができる。

【0190】

本発明の抗体（またはその断片）は、その天然形態にて、あるいは抗体 / キレート、抗体 / 薬物、抗体 / プロドラッグ、抗体 / トキシンまたは抗体イメージングマーカー複合体の一部として用いることができる。加えて、全抗体または抗体

断片 (F a b₂、 F a b、 F v) は、抵抗 - イディオタイプ応答の生成のための免疫療法においてイメージング試薬としてまたは潜在的ワクチンもしくは免疫原として用いることができる。

【0191】

抗体 (またはその断片) およびイメージングマーカのコンジュゲートは、 p 5 3 を発現する腫瘍を要し、適当な検出手段によってイメージングマーカの存在が検出された患者において、癌 (ここに、そのような癌は発癌性腫瘍 ; 結腸 - 直腸癌、乳癌、肺癌、頭部および頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、前立腺癌および尿管 / 生殖管癌、食道癌のごとき上皮起源の腫瘍 ; 肉腫のごとき間葉腫瘍 ; および B 細胞リンパ腫のごとき造血腫瘍を含むことができる) を含めた多数のヒト病気のイン・ビボ診断アッセイのために医薬上有効な量で投与することができる。

【0192】

抗体 / イメージングマーカの投与および検出、ならびに抗体 / イメージングマーカをコンジュゲートする方法は当該分野で容易に知られたまたは容易に決定される方法で達成される。そのような抗体 (イメージングマーカの投与量は、患者の年齢および体重に依存して変化するであろう) 。一般的に、投与量は、正常な組織と区別して腫瘍部位を可視化または検出するのに効果的であるべきである。好ましくは、一回の投与量は 0 , 1 m g ないし 2 0 0 m g の間であろう。より好ましくは約 1 m g ないし約 1 5 0 m g の間であり ; なおより好ましくは約 5 m g ないし約 1 0 0 m g の間であり ; なおより好ましくは、一回の投与量は約 1 0 m g ないし約 5 0 m g の間であろう。

【0193】

例示的なイメージングマーカは、ガンマスキャナーまたは手に保持されたガンマプローブによって検出することができる物質、および核磁気共鳴スペクトロメーターを用いて核磁気共鳴イメージングによって検出することができる物質を含む。

【0194】

例えば、ガンマスキャナーを用いて検出することができるイメージングマーカ

一は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ よりなる群から選択されるイメージングマーカを含む。

【0195】

核磁気共鳴スペクトロメーターを用いて検出することができるイメージングマーカの例はガドリニウムである。

【0196】

治療的効果を生じさせるのに有用な抗体（またはその断片）の量は当業者によく知られた標準的な技術によって決定することができる。抗体は、一般に、医薬上許容される緩衝液内で標準的な技術によって供され、いずれかの所望の経路によって投与することができる。本発明の抗体の効率、およびヒトによるその許容性のため、これらの抗体を反復して投与して、ヒト内で種々の病気または病気状態と戦うことが可能である。

【0197】

当業者出あれば、ルーチン的な実験によって、いずれの効果的な非毒性量の抗体（またはその断片）が免疫抑制を誘導する目的用であるかを決定することができるであろう。一般に、しかしながら、効果的な投与量は、1日につき体重1キログラム当たり約0.05ないし約100ミリグラム、好ましくは1日につき体重1キログラム当たり約0.05ないし約50より好ましくは約0.5ないし約25、なおより好ましくは約0.5ないし約10ミリグラムの範囲にあると予測される。別法として、効果的な投与量は 500 mg/m^2 までであろう。一般に、効果的な投与量は約50ないし約 500 mg/m^2 、好ましくは約50ないし約 200 mg/m^2 、より好ましくは約75ないし約 250 mg/m^2 、なおより好ましくは、約75ないし約 150 mg/m^2 の範囲にあると予測される。

【0198】

また、本発明の抗体（またはその断片）は、脊椎動物において腫瘍を治療するのに有用なはずである。より具体的には、それは腫瘍のサイズを低下させ、腫瘍の成長を抑制し、および/または腫瘍を担う脊椎動物の生存時間を延長させるのに有用なはずである

【0199】

従って、また、本発明は有効な非毒性量の抗体またはその断片をヒトまたは動物に投与することによるヒトまたは他の動物において腫瘍を治療する方法に関する。当業者出れば、ルーチンの実験によって、いずれの有効な非毒性量の抗体またはその断片が癌形成腫瘍を治療する目的用であるかを決定することができよう。しかしながら、一般には、有効な投与量は1日につき体重1キログラム当たり約0.05ないし約100ミリグラム、好ましくは1日につき体重1キログラム当たり約0.05ないし約50、より好ましくは約0.5ないし約25、なおより好ましくは約0.5ないし約10ミリグラムの範囲にあると予測される。別法として、有効な投与量は約500mg/m²までであろう。一般に、効果的な投与量は約50ないし約500mg/m²、好ましくは約50ないし約250mg/m²、より好ましくは約75ないし約250mg/m²、なおより好ましくは約75ないし約150mg/m²の範囲にあると予測される。

【0200】

本発明の抗体は、治療または予防効果を生じるのに十分な量にて、前記治療方法に従って、脊椎動物、例えば、ヒトまたは他の動物に投与することができる。

【0201】

本発明の抗体は、本発明の抗体またはその断片を公知の技術に従って通常の医薬上許容される担体または希釈剤と組み合わせることによって調製した通常の投与形態でそのようなヒトまたは他の動物に投与することができる。医薬上許容される担体または希釈剤の形態および特徴は、それと組み合わせる有効成分の量、投与経路および他のよく知られた変数によって指示されることは当業者に認識されるであろう。

【0202】

本発明の抗体（またはその断片）の投与経路は経口、非経口、吸入または局所で有り得る。本明細書中で用いるごとく、用語非経口は静脈内、皮内、筋肉内、皮下、直腸、膣または腹腔内投与を含む。皮下および筋肉内形態の非経口投与が一般に好ましい。

【0203】

予防的または治療的に免疫抑制を誘導する、または治療的に癌形成腫瘍を治療するのに本発明の化合物を使用する毎日の非経口および経口投与量方法は、一般に、1日につき体重1キログラム当たり約0.05ないし約100、このましくは約0.05ないし約50、より好ましくは約0.5ないし約25、なおより好ましくは約0.5ないし約10ミリグラムの範囲にあるであろう。別法として、有効な投与量は約500 mg/m²までであろう。一般に、有効な投与量は約50ないし約500 mg/m²好ましくは約50ないし約250 mg/m²より好ましくは約75ないし約250 mg/m²なおより好ましくは約75ないし約150 mg/m²の範囲にあると予測される。

【0204】

また本発明の抗体またその断片は吸入、すなわち、鼻孔内および/または経口吸入投与によって投与することもできる。エアロゾル処方または計量用量インハラーのごときそのような投与についての適当な投与形態は通常の方法によって調製することができる。使用すべき本発明の化合物の好ましい投与量は、一般に、1日につき体重1キログラムあたり約0.05ないし約100、好ましくは約0.05ないし約50、より好ましくは約0.5ないし約25、なおより好ましくは約0.5ないし約10ミリグラムの範囲内にある。別法として、効果的な投与量は約500 mg/m²までであろう。一般に、有効な投与量は約50ないし約500 mg/m²好ましくは約50ないし約250 mg/m²より好ましくは約75ないし約250 mg/m²なおより好ましくは約75ないし約150 mg/m²の範囲にあると予測される。

【0205】

本発明の抗体またはその断片は局所投与することもできる。局所投与とは非全身投与を意味し、本発明の抗体(またはその断片)化合物の表皮、口腔への外部適用、およびそのような抗体の耳、目および鼻への注入(ここに、それは血流に有意には侵入しない)を含む。全身投与とは経口、静脈内、腹腔内および筋肉内投与を意味する。治療または予防効果に必要な抗体またはその断片の量は、もちろん、選択された抗体、治療すべき疾患の性質およびひどさおよび治療を受ける動物に応じて変化し、最終的には医師の判断による。本発明の抗体またその断片

の適当な局所用量は、一般に、1日につき体重1キログラム当たり約1ないし約100ミリグラム、1日につき体重1キログラム当たり好ましくは約0.05ないし約50、より好ましくは約0.5ないし約25、なおより好ましくは約0.5ないし約10ミリグラムの範囲内にある。別法として、効果的な投与量は約500mg/m²までであろう。一般に、有効な投与量は約50ないし約500mg/m²好ましくは約50ないし約250mg/m²より好ましくは約75ないし約250mg/m²なおより好ましくは約75ないし約150mg/m²の範囲にあると予測される。

【0206】

本発明に従いここに開示した治療処方投与において、好ましい非毒性医薬担体、希釈剤、賦形剤および/またはアジュバントがある。前記処方の投与では、治療すべきポリペプチドをこれらの非毒性担体、希釈剤、賦形剤および/またはアジュバントと混合し、カプセル、水性もしくは油性懸濁液、エマルジョン、シロップ、エリキシルまたは注射溶液の形態とすることができる。

【0207】

医薬上または動物医学上許容される担体または希釈剤の例は脱ミネラル化または蒸留した水；生理食塩水；ピーナッツ油、サフラワー油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、落花生油またはヤシ油のごとき植物ベース油；メチルトリシロキサン、フェニルポリシロキサンおよびメチルフェニルポリシロキサンのごときポリシロキサンを含めたシリコーン油；揮発性シリコーン；流動パラフィン、ソフトパラフィンまたはスクアランのごとき鉱油；メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロースまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースのごときセルロース誘導体；低級アルコール、例えば、エタノールまたはイソプロパノール；低級アラールカノール；低級ポリアルキレングリコールまたは低級アルキレングリコール、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコールまたはグリセリン；パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピルまたはオレイン酸エチルのごとき脂肪酸エステル；ポリビニルピロリドン；寒天；カラギーナン；トラガカ

ントガムまたはアラビアガム、および石油ゼリーである。典型的には、担体または担体類は組成物の10重量%ないし99.9重量%を形成する。

【0208】

経口用途のための適当な担体、希釈剤、賦形剤およびアジュバントのいくつかの例はピーナッツ油、流動パラフィン、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、アラビアガム、トラガカントガム、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、ゼラチンおよびレシチンを含む。加えて、これらの経口処方では適当な香味剤および着色剤を含有することができる。カプセル形態で用いる場合、カプセルは、崩壊を遅延させるモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルのごとき化合物で被覆することができる。

【0209】

アジュバントは、典型的には、エモリエント、乳化剤、増粘剤、保存剤、殺菌剤および緩衝剤を含む。

【0210】

経口投与のための個体形態は、ヒトおよび動物医薬実践で許容されるバインダー、甘味材、崩壊剤、希釈剤、フレーバー剤、コーティング剤、保存剤、滑沢剤および/または遅延剤を含有することができる。適当なバインダーはアラビアガム、ゼラチン、コーンスターチ、トラガカントガム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースまたはポリエチレングリコールを含む。適当な甘味剤はスクロース、ラクトース、グルコース、アスパルテームまたはサッカリンを含む。適当な崩壊剤はコーンスターチ、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、グアガム、キサントガム、ベントナイト、アルギン酸または寒天を含む。適当な希釈剤はラクトース、ソルビトール、マンニトール、デキストロース、カオリン、セルロース、炭酸カルシウム、ケイ酸カルシウムまたはリン酸二カルシウムを含む。適当なフレーバー剤は、ペパーミント油、イチヤクソウ、チェリー、オレンジまたはキイチゴフレーバーの油を含む。適当なコーティング剤はアクリル酸および/またはメタクリル酸および/またはそのエステルのパリマーまたはコポリマー、ワックス、脂肪アルコール、ゼイン、シェラックまたはグルテンを含

む。適当な保存材は安息香酸ナトリウム、ビタミンE、アルファ-トコフェロール、アスコルリン酸、メチルパラベン、プロピルパラベンまたは重亜硫酸ナトリウムを含む。適当な滑沢剤はステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、オレイン酸ナトリウム、塩化ナトリウムまたはタルクを含む。適当な遅延剤はモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルを含む。

【0211】

経口投与のための液体形態は前記した剤に加えて液体担体を含有することができる。適当な液体担体は水、オリーブ油、ピーナッツ油、ゴマ油、ヒマワリ油、サフラワー油、落花生油、ヤシ油、流動パラフィン、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、グリセロール、脂肪アルコール、トリグリセリドまたはその混合物を含む。

【0212】

経口投与のための懸濁液は、さらに、分散剤および/または懸濁化剤を含むことができる。適当な懸濁化剤はナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウムまたはアセチルアルコールを含む。適当な分散剤はレシチン、ステアリン酸のごとき脂肪酸のポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレンソルビトールモノ-またはジ-オレエート、-ステアレートまたは-ラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノ-またはジ-オレエート、-ステアレートまたは-ラウレート等を含む。

【0213】

経口投与のためのエマルジョンは、さらに、1以上の乳化剤を含むことができる。適当な乳化剤は前記例示の分散剤あるいはグアーガム、アカシアガムまたはトラガカントガムのごとき天然ガムを含む。

【0214】

注射用溶液または懸濁液としての投与では、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または担体はリンガー液、等張生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、エタノールおよび1,2プロピレングリコールを含むことができる。

【0215】

さらに、組換えポリペプチドを含有するワクチン組成物は、当業者によく知られた標準的な方法によって使用するために調製することができる。1つの具体例において、免疫原性ペプチドは本発明によるポリヌクレオチド配列（またはその断片）の発現によって組換え系で生産し、引き続いて単離することができる。例えば、注目する外来性遺伝子を含有する微生物細胞は多量バイオリクターで培養し、次いで、遠心によって収集し、引き続いて、例えば、高圧ホモゲナイゼーションによって破壊することができる。得られた細胞溶解物は前記したもののごとき適当な希釈剤に再懸濁し、濾過して免疫原の水性懸濁液を得ることができる。組換え蛋白質は、例えば、0,1Mリン酸緩衝液（pH7.4）を50ないし500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度まで希釈し、次いで、滅菌した0.22ミクロンのフィルターを通すことによって粗製形態で投与することができる。

【0216】

別法として、組換えポリペプチドを含有するワクチン組成物は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞のごとき宿主細胞を利用して哺乳動物発現系で調製することができる。p53またはその部分に対する結合親和性を有する抗体（またはその断片）は、無結成培地でのバッチ発酵を用いて製造することができる。発酵後、抗体を、クロマトグラフィーおよびウイルス不活化/除去工程を一体化させる多工程手法を介して精製することができる。例えば、抗体は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによってまず分離し、ついで、溶媒/洗剤処理していずれの脂質エンベロープウイルスも不活化することができる。さらなる精製では、典型的には、アニオンおよびカチオン交換クロマトグラフィーを用いて残存する蛋白質、溶媒/洗剤および核酸を除去することができる。精製された抗体は、さらにゲル濾過カラムを用いて、精製し、0.9%生理食塩水に処方することができる。ついで、処方されたバルク製剤を滅菌し、ウイルス濾過し、分注することができる。

【0217】

別法として、本発明の抗体（またはその断片）はイディオタイプ免疫原として用いることができる。当業者に知られたごとく、このように用いる場合、本発明

の抗体（またはその断片）は免疫原として機能し、元の抗体（Ab1）のイディオタイプに対する第2の抗体（Ab2）およびT細胞（ T_2 ）応答を誘導することができる。Ab2抗体は、抗原結合部位（イディオタイプ）を含めた元の抗体上のエピトープに結合することができる。抗-イディオタイプ抗体Ab2は、抗-抗-イディオタイプ抗体（Ab3）ならびにAb1と同一のエピトープを認識することができるT細胞（ T_3 ）を自然に誘導することができる。第1の抗体はp53エピトープおよびAb2に共に結合するので、Ab2は抗原性エピトープ（p53上）の構造を模倣する。ある割合のAb3抗体はもとの抗体（Ab1）と同一のエピトープに結合し、元の抗体の効率を増加させ、延長することができる。この抗-イディオタイプネットワークの誘導の結果、p53-特異的CTLの誘導を部分的には介して転移から保護される。

【0218】

別法として、本発明のポリペプチドのペプチド断片を含有するワクチン組成物は、例えばApplied Biosystems モデル430Aでの自動合成によるごとく、当業者に知られた標準的な方法を用いてペプチドの合成によって調製することができる。例えば、ペプチドは本発明のペプチドのCDRおよび/またはFRの選択されたアミノ酸領域を含むことができる。合成ペプチドは、例えば、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）を50ないし500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度に希釈し、滅菌された0.22ミクロンフィルターに通した後に投与することができる。

【0219】

別法として、ワクチンはDNAベースのワクチンであり得る。1つの態様において、DNAベースのワクチンは、本発明の第1または第2の具体例で定義された核酸分子、またはその断片を含む裸のDNAを含むことができる。

【0220】

もう1つの態様において、DNAベースのワクチンは、発現ベクターにクローン化された本発明の第1または第2の具体例で定義された核酸分子、またはその断片を含む裸のDNAを含むことができる。典型的には、発現ベクターは真核生物発現ベクターであり、複製起点、プロモーター、エンハンサーのごとき発現制

御配列、およびリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列のごとき必要なプロセッシング情報を含む。

【0221】

典型的なワクチン化方法は、複数用量、一般には、1、2または3つの等しい用量でワクチンを送達することである。

【0222】

一般に、本発明のワクチンに対する抗体の生産を誘導するには、それらは、適当な分散剤、懸濁化剤および/または湿潤剤を用い、当該分野で知られた方法で処方した油性もしくは水性懸濁液であり得る。適当な分散剤、懸濁化剤および湿潤剤の例はフロイント完全/不完全アジュバント、Montenide Marc o l アジュバントおよびリン酸緩衝化生理食塩水およびマンナンを含む。

【0223】

前記言及の例は例示的にすぎず、当該分野で知られた他の適当な担体、希釈剤、賦形剤およびアジュバントは本発明の精神を逸脱することなく使用することができることが認識されよう。

【0224】

4. 抗体/核酸ベースの方法およびp53を検出するためのキット

また、本発明は、試料中のp53ポリペプチドを検出する方法を含み、ここに、該方法は、

(a) 試料を、本発明の第6または第7の具体例に従って定義された抗体(またはその断片)と接触させ、次いで、

(b) p53ポリペプチドに結合した抗体(またはその断片)の存在を検出する;

ことを含む。

【0225】

典型的には、変化したレベルのp53ポリペプチドは病気の存在または開始を示すことができ、ここに、そのような病気の例は癌である。

【0226】

テスト試料と共に抗体(またはその断片)をインキュベートするための条件は

、アッセイで使用される検出の様式、検出方法、および使用される抗体のタイプおよび性質に応じて広く変化する。当業者であれば、通常入手できる免疫学的アッセイのいずれか1つを検出の方法を行うのに使用することができることを容易に認識するであろう。例えば、これらのアッセイはラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫検定法、および/または免疫蛍光アッセイを含む。

【0227】

さらに、アッセイで用いるテスト試料は組織、細胞、蛋白質、または細胞の膜抽出物、および血液、血清、血漿または尿のごとき生物学的液体よりなることができる。

【0228】

本発明の前記方法を実行するためのキットは、検出の前記方法を行うための全ての必要な試薬を含有する。例えば、該キットは以下の容器：

(a) 本発明の抗体（またはその断片）を含有する第1の容器；

(b) 検出可能な標識と共に抗体（またはその断片）の結合パートナーを含むコンジュゲートを含有する第2の容器；
を含む。

【0229】

典型的には、該キットは、さらに、洗浄試薬、および結合した抗体の存在を検出できる他の試薬のような他の成分を含有する1以上の他の容器を含むことができる。より典型的には、検出試薬は標識された（二次）抗体を含むことができるか、あるいは本発明の抗体（またはその断片）それ自体が標識される場合、区画は、本発明の標識された抗体（またはその断片）と反応することができる抗体結合試薬を含むことができる。

【0230】

さらに、抗体に関して前記したごとく、本発明のキットは、発明的才能を用いることなくして、核酸プローブ用のキットに容易に取り込むことができる。当業者であれば、前記した当該分野で公知の技術に従って、本発明のポリヌクレオチドから核酸プローブを選択するであろう。テストすべき試料は、限定されるものではないが、ヒト組織のRNA試料を含む。

【0231】

そのようなキットは、その中に配された前記核酸プローブを有する少なくとも1つの容器手段を含む。該キットは、さらに、以下の：洗浄試薬および結合した核酸プローブの存在を検出することができる試薬の1以上を含む他の容器を含むことができる。検出試薬の例は、限定されるものではないが、標識されたプローブ、酵素標識プローブ（ホ - スラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ）、およびアフィニティー標識プローブ（ビオチン、アビジンまたはストレプトアビジン）を含む。

【0232】

詳細において、区画化されたキットは、試薬が別々の容器に含有されたいずれかのキットを含む。そのような容器は小さなガラス容器、プラスチック容器またはプラスチックもしくは紙のストリップを含む。そのような容器は、試料および試薬が交差 - 汚染せず、各容器の剤または溶液を1の区画からもう1つの区画まで定量的に添加できるように、1の区画からもう1つの区画への試薬の効果的な移動を可能とする。そのような容器は、テスト試料を許容するであろう容器、アッセイで用いられるプローブまたはプライマーを含有する容器、（リン酸緩衝化生理食塩水、トリス緩衝液等のごとき）洗浄試薬を含有する容器、およびハイブリダイズされたプローブ、結合抗体、アミド産物等を検出する試薬を含有する容器を含む。

【0233】

さらに、当業者であれば、本発明における核酸プローブは、当該分野で公知の確立されたキットフォーマットのうちの1つに容易に取り込むことができるのを容易に認識するであろう。

【0234】

5. 遺伝子治療

その最も単純な形態において、遺伝子導入は、マイクロインジェクションのプロセスを通じて、単に、微量なDNAを細胞の核に注入することによって行うことができる。一旦組換え遺伝子が細胞に導入されれば、それは、転写および翻訳についての細胞の通常メカニズムによって認識することができ、遺伝子産物

は発現されるであろう。

【0235】

また、DNAをより多数の細胞に導入するために、他の方法も試みられてきた。これらの方法は、DNAがCaPO₄で沈殿され、ピノサイトーシスによって細胞に取り入れられるトランスフェクション；細胞が大電圧パルスに暴露されて、膜にホールを導入するエレクトロポレーション；標的細胞と融合する油性小胞にDNAがパッケージされるリポフェクション/リポソーム融合；および小さなプロジェクトイルに結合したDNAを用いる粒子衝撃を含む。DNAを細胞に導入するためのもう1つの方法は、DNAを化学的に修飾された蛋白質にカップリングすることがである。

【0236】

1つの具体例において、本発明によるポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターは細胞に導入され、細胞はイン・ビトロで増殖され、次いで、多数で患者に注入される。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ-関連ウイルス、ヘルペスウイルス、いくつかのRNAウイルス、またはウシバピローマウイルスのごときウイルスに由来する発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチド配列の標識された細胞集団（例えば、腫瘍細胞）への送達に用いることができる。当業者によく知られた方法を用いて、コーディング配列を含有する組換えウイルスベクターを構築することができる。別法として、蛋白質配列をコードする組換え核酸分子は裸のDNAとして、または復元されたシステム、例えば、標的細胞への送達のためのリポソームまたは他の脂質システムで用いることができる。

【0237】

また、アデノウイルス蛋白質は、エンドソームを脱安定化でき、DNAの細胞への摂取を増強できることが示されている。DNA複合体を含有する溶液へのアデノウイルスの混合、または蛋白質架橋剤を用いるDNAのアデノウイルスに共有結合したポリリシンへの結合は、組換え遺伝子の摂取および発現を実質的に改良する。

【0238】

さて、具体的な実施例を参照することによって、本発明をより詳細に記載するが、それは断じて本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきものではない。

【0239】

実施例

実施例 1

抗 - p 5 3 ヒト抗体の単離および特徴づけ

材料および方法

患者のデータ

知らされた同意を得た後、血液および組織試料を、結直腸癌の再切開を受けつつある1993 - 1997からのSt Vincent's Hospitalで観察された100人の個人から収集した。

【0240】

固まった血液を2000gにて10分間遠心分離し、使用に先立って血清を - 70 °Cにてアリコットにて貯蔵した。50人の健康な個人からの試料を得、全てのELISAおよび免疫沈殿実験で対照として用いた。腫瘍の領域における新鮮な結腸周囲リンパ節は結腸切開組織から収穫し、RNA抽出に先立って液体窒素中で凍結した(6)。

【0241】

p 5 3 の免疫組織化学的検出

各個人からのパラフィン包埋腫瘍組織の切片を、従前に記載されているごとく、p 5 3 の免疫組織化学分析に付した(7)。腫瘍組織は、10の高出力場の平均が、間質細胞および正常上皮中の染色の不存在下で、核染色された腫瘍細胞の5%を超えて示す場合、蓄積された突然変異体p 5 3を有すると考えられた。

【0242】

組換え p 5 3 の生産

組換え p 5 3 を発現させ、精製した。略言すると、発現ベクター pET19b 中の野生型 p 5 3 の cDNA クローンを E. coli 株 BL21 (DE3) (Novagene Inc. Madison, WI) にトランスフェクトした。Ni₂⁺樹脂を用い、粗製細菌溶解物から蛋白質を精製した。ポリアクリルア

ミドゲル電気泳動 (PAGE)、次いで、免疫ブロッティングによってp53の純度を評価した。蛋白質の濃度は、ウシ血清アルブミン (BSA) で生じた標準的な曲線を参照し、Biochonic acid方法を用いて測定した。

【0243】

抗-p53血清抗体の検出

マイクロタイタープレート (Polysorb, Nunc, Denmark) のウェルを、4 にて一晚、精製された組換えp53 (リン酸緩衝化生理食塩水: PBS中5 µg/ml) でコートした。コートしたウェルを200 µlのPBSで各々3回洗浄し、次いで、室温 (RT) にて1時間、PBS/2% BSAでブロックした。患者の血清試料 (n=100) をPBS中の100中で希釈し、次いで、二連でp53に適用し、RTにて1時間インキュベートした。アルカリ性ホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG Fc-特異的抗体 (PBS/2% BSA中0.5 µg/ml: Jackson Immuno Research Lab Inc, PA, USA) で結合抗体を検出した。p53に対する各患者の反応性は、従前に記載されているごとく、抗-p53抗体を含有することが知られている対照血清から生じた標準曲線に対する値として表した (7)。血清の活性を、健康な群のボランティア (n=50) と比較し、抗-p53のスコアが正常な群の平均を超える > 2 標準偏差である場合に抗-p53抗体について陽性と考えた。

【0244】

抗-ヒトIgG Fc-特異的抗体をマウス抗-ヒトIgG (IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4: DAKO Corp CA, USA) アイソタイプ特異的抗体 (1 µg/ml) で置き換え、アルカリ性ホスファターゼ (AP) 結合ヤギ抗-マウス抗体 (PBS/2% BSA中0.5 µg/ml: Jackson Immuno Research Lab Inc) で検出する以外は、前記したプロトコルを用い、反応性血清中の抗体のアイソタイプを評価した。

【0245】

抗-p53血清力価は、バックグラウンドを3倍超えるシグナルを生じた血清

の最低希釈と定義した。

【0246】

ライブラリの構築およびバイオパニング

結腸周囲リンパ節を破碎して、液体窒素中の微細な粉末とし、標準的な手法を用いて全RNAを抽出した(8)。IgG1カップ鎖Fabライブラリを、従前に記載されているごとくMCO1ベクター中に構築した(9)。略言すれば、ヒトカップおよびIgG1免疫グロブリン遺伝子に特異的なプライマーを用いるRT-PCRによって、免疫グロブリン遺伝子を増幅し、各々、Sac1/Xba1またはSpe1/Xho1で消化した。次いで、産物を順次(軽鎖、次いで、重鎖)ファージ提示ファゲミドベクターにクローニングした。MCO1、およびコンビナトリアルライブラリーをXL1-blue細胞にエレクトロポレーションし、ヘルパーファージでパッケージして、一次抗体ファージライブラリーを得た。

【0247】

最終重鎖および軽鎖構築体のエレクトロポレーション(各ライブラリーにつき $n = 20$)後に採取したクローンのある割合から、ライブラリーのサイズを計算した。重鎖および軽鎖の可変領域を増幅する診断PCRおよびBstN1フィンガープリンティング(後記参照)を用いて、ユニークな重鎖および軽鎖インサートを持つクローンの数を計算した。これに基づいて、全ライブラリーサイズを見積もった。

【0248】

マイクロタイタープレートのウェルは、前記したごとく組換えp53でコートし、次いで、PBSで洗浄し、BSA(2%v/v)/PBSでブロックした。ファージ抗体ライブラリーのアリコット(100 μ l中 10^{12} cfu)を各ウェルに適用し、室温で2時間インキュベートした。過剰のファージを、PBS/Tweenでの6回の洗浄でプレートから洗浄し、続いて、PBS中で2回洗浄した。次いで、接着性ファージを室温にて10分間、100 μ lの0.1Mグリシン、pH3.0で溶出し、1MトリスpH8で中和した。溶出したファージを、従前に記載されているごとく次のラウンドのパニングのために再度増幅した(6

)。パニング手法は5回行った。各ラウンドのパニングからの溶出したアウトプットからアリコットを採取し、これを用いて、可溶性Fabの生産のためにE. coli非サプレッサー株HB2151を感染させた。感染した細菌を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のカルベニシリンを含むルリアブロス寒天上に平板培養し、可溶性Fab生産のために単一コロニーを拾った。

【0249】

E L I S Aによる可溶性Fab反応性の分析

2%グルコース(v/v)および $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のカルベニシリン(2YT/glu/carb)を含む2YTブロス中、 37°C にて、培養を単一コロニーから一晩培養した。次いで、これらを2YT/glu/carb中の100中で希釈し、0.8のODまで 37°C にて増殖させた。次いで、培養を遠心し、1M IPTGおよび $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する2YTに再懸濁し、 30°C にて一晩増殖させた。遠心に続き、一晩の培養からの上清を、E L I S Aによって抗-p53 Fabにつき評価した。

【0250】

p53でコートしたE L I S Aプレートに、細胞上清を二連で適用し、RTにて2時間インキュベートした。PBSでの洗浄の後、 $100\mu\text{l}$ の抗-mycモノクローナル抗体9E10を各ウェルに添加し(重鎖のC末端のmycタグを検出、PBS/0.5%BSA中 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$)、室温にて1時間インキュベートした。ウェルを再度洗浄し、HRP結合ヤギ抗-マウス(PBS/2%BSA中 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$: Jackson Immuno Research Lab Inc)抗体を添加した。さらなる洗浄の後、 $100\mu\text{l}$ のTMB基質(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg MD)で発色させ、 $50\mu\text{l}$ の1M硫酸で反応を停止させた。ODが、p53でコートされていないウェルで観察されたシグナルの3倍を超える場合にクローンは陽性であると考えた。各E L I S Aにおいて、9E10を含まない陰性対照を用いて、Fab、二次抗体およびp53の交差反応性を検出した。

【0251】

10 - 0 . 0 1 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でコートしたp53を用い、あるいはコートしたELISAプレート(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)への適用に先立って、1時間、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の可溶性p53と共にFabをインキュベートすることによって、反応性抗-p53 Fabを再度分析した。軽鎖がp53への結合に關与していることを確認するために、ビオチン化ヤギ抗-ヒトカップ特異的抗体(PBS/2% BSA中0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$: Rockland, Gilbertsville, PA)、続いてHRP結合ストレプトアビジン(PBS/2% BSA中0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$: DAKO Corp)を用いてELISAを反復した。

【0252】

Fabの他の抗原との交差反応性は、p53について記載したのと同様の方法を用いるELISAによって評価した。以下の抗原および濃度を用いた；インスリン(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ErbB2細胞外ドメイン(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Ruth Lyons, Garvan Institute, Sydney, Australia寄贈)Muc1(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Ian McKenzie博士, Austin Research Institute, Melbourne, Australia寄贈)、およびCEA(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Matsuokaら1991によって記載されたごとく組織から抽出)、破傷風トキソイド(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CSL, Melbourne, Australia)、BSA(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$: Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australiaおよびキーホールリンペットヘムシアニン(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich)。

【0253】

免疫沈殿によるFab反応性の分析

突然変異体p53を含有する結直腸癌細胞系HT29を用いて、真核生物細胞からのヒトp53とFabとの反応性を評価した。ほぼ 10^7 細胞をTNE S緩衝液(50 mM トリス、pH 7.5、2 mM EDTA、100 mM NaCl、1% NP-40プロテアーゼ阻害剤カクテル[Boehringer Mannheim, Castle Hill, Australia]および1 mM PM SF)中に溶解させ、次いで、10000 gでの10分間の遠心によって細胞夾

雑物を除去した。およそ250 µgの溶解物を各免疫沈殿で用いた。マウス抗D O7 (0.5 µg : DAKO Corp) または細菌が発現したFabのいずれかを該溶解物に添加し、4℃にて1時間インキュベートした。次いで、Fabを含有する混合物に抗-myc 9E10抗体(1 µg)を添加し、4℃にて1時間インキュベートした。この時点で、20 µlの(充填した容量)プロテインAセファロース(Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA)を全てのチューブに添加し、4℃にてさらに1時間インキュベートした。プロテインAセファロースをPBSで4回洗浄し、変性および還元条件下で10%PAGEに付した。エレクトロブロッティングによって、蛋白質をPVDF膜に移し、10%スキムミルク粉末でブロックし、当該蛋白質のN末端領域につき特異的なヤギ抗-P53抗体でプローブした(Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA)。これに続いて、ロバ抗-ヤギ-HRP抗体(Jackson Immuno Research Lab Inc)を添加し、次いで、ケミルミネセント基質(DuPont NEN, North Sydney Australia)を用いてプロットを発色させた。陰性Fab対照(破傷風トキソイドにつき特異的なFab)、およびプロテインAセファロースおよび抽出物のみの対照を、陰性対照として各実験に含めた。

【0254】

エピトープマッピング

ヒトp53から誘導された欠失突然変異体の組をエピトープマッピングで用いた。使用された欠失突然変異体は、(10)によって記載されたHu p53、3M(残基1-393)、3R(1-223)、4U(1-106)、11(27-393)および18(44-393)であった。簡単に述べると、当該構築体を含有するE. coli (B121 DE3)の培養をOD0.8まで増殖させた。細胞を細菌溶解緩衝液(50 mM トリス、pH 7.5、10 mM EDTA、50 mM NaCl、1% LP-40および1 mM PMSF)に溶解させ、50 µlの溶解物を前記したPAGEおよびエレクトロブロッティングに付した。細菌が発現したFabをRTにて1時間膜と共にインキュベートし、次い

で、PBSで洗浄した。結合したFabを9E10およびHRP-結合ヤギ抗-マウスで検出した。陰性対照は前記と同じであった。

【0255】

配列分析

選択されたクローンの可変領域は、製造業者の仕様 (Promega, Madison, WI) に従ってサイクル配列決定キットを用いて、配列決定した。ミニプレブDNAはアルカリ性溶解によって調製し、DNAの両方のストランドを、可変領域の外側のプライマーを用いて配列決定した。軽鎖を配列決定するのに用いたプライマーは5' - AA GAC AGC TAT CGC GAT T (OmpAリーダー配列) および5' - ATG AAG ACA GAT GGT GCA GC (カッパ定常領域の5'末端) であり、重鎖では、5' - CTA CGG CAG CCG CTG GAT TG (PelBリーダー配列) および5' - GGA AGT AGT CCT TGA CCA G (IgG CH1領域の5'末端) であった。

【0256】

Fabクローンについての重鎖および軽鎖可変領域は、DNAプロット整列パッケージおよびV塩基配列データベースを用い、利用可能なV遺伝子、D遺伝子およびJ遺伝子にマッチさせた。

【0257】

ChangおよびCasali (11) の方法を用い、p53抗体の各々についての、CDRおよびフレームワーク (FR) における置換突然変異 (R) の頻度は、最も近い生殖系遺伝子に関して計算した。置換突然変異が予測されたランダム頻度未満またはそれを超えて起こる確率は、生殖系遺伝子におけるR突然変異の予測される数、Fab配列における観察されたR突然変異の現実の数、およびCDRまたはFRに局所化されるR突然変異の確率を用い、二項分布モデルで計算した (11)。重鎖の1-94および軽鎖の1-95からのアミノ酸を、R突然変異の分布で用いた。FR1領域におけるプライマー配列の結果として起こるアミノ酸残基は分析から排除した。0.05未満のp値は、Rとしてが非ランダム様式で起こったことを示した。

【0258】

F a b精製

可溶性F a bは硫酸アンモニウム(35%(w/v)最終)中で沈殿させ、5 mlのPBSに再懸濁させ、次いで、IMACアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。F a bを含有する溶出した画分をプールし、次いで、HBS緩衝液(0.01M HEPES、pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTAおよび0.005%NP40)でのサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex200 Pharmacia)によって分画した。純度はPAGEおよび銀染色によって評価した。

【0259】

選択されたF a bのBIAcore分析

標準的なアミン固定化プロトコルを用い、組換えp53をCM5チップにカップリングさせた。50mM N-ヒドロキシスクシンイミドおよび200mM N-(ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミドを用い、該チップを活性化した。酢酸ナトリウム(1M、pH4.8)の10中で希釈したPDS中100µg/mlの組換えp53を、10µl/分の流速で注入した。400RU未満がアフィニティー分析のためにチップにカップリングされた。

【0260】

全ての測定はHBS緩衝液中で行った。アフィニティーの分析では、10ないし200nMの範囲の濃度のF a bを、30µl/分の流速で90秒間で2フロー細胞(1つはp53とカップリングし、他方はカップリングしていないもの)にわたって注入した。解離は、HBS緩衝液の注入によって90秒間にわたって測定した。30µl/分流速にて、20µlの1Mグリシン(pH2)でチップを再生させた。ブランクフロー細胞のRUをp53結合細胞から差し引き、グローバルフィットのためのBIAevaluation3ソフトウェアパッケージを用い、アフィニティー定数を計算した。

【0261】

結果

患者の血清の分析および抗体ライブラリー構築

p 5 3 に対する抗体につきスクリーニングした結直腸癌を持つ 1 0 0 人の患者のうち、1 7 人は抗 - p 5 3 抗体を有することが判明した。p 5 3 反応性血清を有することが判明した患者から、さらなる実験のために 6 人を選択し、陰性対照として検出可能な抗 - p 5 3 抗体を持たない 1 人の患者を含めた。加えて、患者の各々を、p 5 3 と反応性の支配的 I g G イソタイプについて評価した。選択した全ての個人は、圧倒的に、I g G 1 反応性抗 - p 5 3 抗体を有することが判明した。従って、これらの 6 人の結直腸癌患者から採取した結腸周囲リンパ節組織から I g G 1 k 抗体ライブラリーを構築した。臨床データ、血清および全長 p 5 3 に対する反応性と共に、構築した個体の各々からの抗体ライブラリーのサイズを表 1 に示す。

【 0 2 6 2 】

抗 - p 5 3 F a b 選択

各抗体ライブラリーを、組換え p 5 3 に対する 5 ラウンドのパニングに付した。溶出されたファージの数の 2 0 ないし 1 0 0 倍増加がラウンド 4 および 5 で観察された。

【 0 2 6 3 】

p 5 3 に対する反応性を持つ F a b は、パニングの最初の 3 ラウンドの各々の後に各ライブラリーから単離した 3 2 ファージクローンから同定されなかった（分析したクローンの全数 = 9 6 0 ）。患者 1 6 3 からのライブラリーは、ラウンド 4 からの 1 / 3 2 の p 5 3 反応性クローンおよびラウンド 5 からの 4 2 / 1 2 8 の p 5 3 反応性クローンを有することが判明した。ラウンド 4 または 5 からの陽性クローン（アウトプットファージから分析したクローン）は、患者抗体ライブラリー 1 0 0、1 0 7、1 4 9、3 5 7 または 7 9 0（各ライブラリーから分析した 1 9 2 ファージクローン）から同定されなかった。

【 0 2 6 4 】

ライブラリー 1 6 3 から単離した 4 3 の p 5 3 反応性クローンは制限酵素消化によって分析し、正しいサイズの重鎖の欠如に基づきさらなる分析から排除した。全てのクローンは、予測されるサイズの軽鎖インサートを有した。頻繁切断制限酵素 B s t N 1 を用い、残りの 3 8 クローンを可変領域 P C R 産物からフィン

ガープリントしたDNAであった。これは、5つのユニークな軽鎖プロフィールと対合する4つのユニークな重鎖B s t N 1プロフィールの同定を可能とし、ユニークな重鎖および軽鎖組合せを持つ合計14のクローンを与える(結果は示さず)。ユニークな重鎖を持つ4つのクローンをエピトープマッピングし、組換えp 5 3、細胞系由来p 5 3に対する反応性、ならびに他の抗原(クローン163・1、163・5、163・17、163・24)との交差反応性につき分析した。ユニークな重鎖および軽鎖組合せを持つ14のクローンのヌクレオチド配列を測定し、推定アミノ酸配列が得られ、突然変異パターンを分析した。

【0265】

抗-p 5 3 F a b 反応性の立体配座

クローン163・1、5、17および24と変化させた濃度のp 5 3との反応性を図1に示す。また、p 5 3結合における重鎖および軽鎖双方のヒツジ抗-ヒトカッパ抗体(結果を示さず)関与を用い、p 5 3に対するF a bの反応性が示された。E L I S A分析に先立って過剰のp 5 3とともにプレインキュベートすると、シグナルは、標準的なプロトコルで観察されたレベルの11ないし27%の間まで低下した(結果は示さず)。さらに、4つのクローンはC E A、e r b B 2、M U C - 1、インスリン、破傷風トキソイド、K L HおよびB S Aを含めた他の抗原に対する反応性は示さなかった(図2)。

【0266】

細菌溶解物中でp 5 3を検出するF a bの能力をウェスタン分析によって評価した(図3a)。F a bは溶解物中でp 5 3を検出できなかったが、他の蛋白質と反応するようには見えなかった。加えて、F a bの各々は、ヒト結直腸癌細胞系H T - 2 9からの突然変異体p 5 3を免疫沈殿させることができたのが判明した(図3b)。

【0267】

エピトープマッピング

F a bクローン163・1、5、17および24のエピトープマッピングは、全てが、全長H u p 5 3、および欠失構築体3 M、3 R、4 Uおよび11と反応性であることを示した。クローンのいずれも18構築体(残基44-393)と

反応性ではなく、これは、F a bが、ヒトp 5 3の残基2 7および4 4 (包括的) の間のエピトープと反応性であることを示す。

【0268】

アフィニティー分析

抗体1 6 3 . 1、5、1 7および2 4についての解離定数は、各々、 $1 . 1 9 \times 10^{-8}$ 、 $1 . 5 \times 10^{-8}$ 、 $1 . 5 7 \times 10^{-8}$ および $1 . 3 8 \times 10^{-8}$ であった。²値は、ドリフティングベースラインとの1 : 1相互作用についてのモデルを用いた場合、全て1未満であった。

【0269】

配列の分析

1 4のクローンの各々では、最も近い生殖系遺伝子がマッチし、この遺伝子からのパーセントヌクレオチド差を表I Iに示す。1 4のF a bクローンの可変領域の比較は、全てのクローンが、相互に9 5%を超える相同性を有し、同一のV遺伝子、D遺伝子およびJ遺伝子組合せを有するよう見えることを示した(表I I)。これらのクローンのV領域は、V H 1遺伝子ファミリーからのV遺伝子D P - 7 (V H 1 - 4 6)、およびJ遺伝子、J H 4 bよりなるものであった。全てのクローンが同様なD領域を有したが、公知のD遺伝子配列との相同性の欠如のため、Dセグメント遺伝子は信頼性をもってこれらのクローンに帰属できなかった。これらの1 4のクローンの全ての重鎖は、V遺伝子領域全体にかなりの突然変異を有した。重鎖V遺伝子およびマッチした生殖系V遺伝子間のパーセント差は1 4 . 6ないし1 8 . 5%の範囲であった。突然変異はC D R領域のみならずF R 1およびF R 3領域にわたって頻繁であった。F R 2領域には比較的少ない突然変異があった。これらの1 4のクローンの軽鎖パートナーは、重鎖よりもマッチしたV遺伝子とより大きな相同性を有し、突然変異のパーセンテージは0ないし5 . 9%の範囲であった。これらのクローンの軽鎖パートナーは、J K 2またはJ K 4遺伝子いずれかと組合せて同一の軽鎖V遺伝子D P K - 2 4を用いた。

【0270】

突然変異分析

14クローンからの推定アミノ酸配列を用いて、FRおよびCDR領域内の置き換えおよびサイレント突然変異を推定し(図4)、これらの値を用いて、FRまたはCDRにおける置き換え突然変異がランダムではない確率を計算した。ランダム突然変異(置き換えまたはサイレント)は与えられた配列全体で均一に起こり、他方、抗原駆動応答はしばしば局在化され、その結果、抗原選択によって定義される選択圧に応じて、置き換え突然変異のより高いまたはより低い割合がもたらされる(11)。FRおよびCDR領域における突然変異は抗原駆動選択の結果として生じた確率を表IIIに示す。

【0271】

DP-7 V遺伝子から誘導された全ての重鎖は、予測されるよりもFRに置ける置き換え突然変異のより低い割合の結果として0.05未満のp値を有した。これは、FRにおける置き換え突然変異の抑制を伴った抗原-駆動B細胞選択を示唆する。対照的に、同一クローンのCDR領域におけるR突然変異は、ランダムで予測され得るよりも大きくなかった。マッチした軽鎖配列の分析は、クローン163.16および163.23のみがかなり異なる数のR突然変異を有することを示した。これらの例において、パターンはFRでおこる陰性選択を持つ重鎖を反映するが、CDR1およびCDR2領域における抗原駆動選択の明瞭な証拠ではない。

【0272】

考察

これらの研究において、コンビナトリアル抗体遺伝子ライブラリーおよびファージ提示を用いて、p53腫瘍抑制遺伝子産物に対する特異性を持つ高アフィニティーヒトFab断片を単離した。残基27および44の間のp53のアミノ末端領域に結合した単離Fabは、組換えp53、および結直腸癌細胞から免疫沈殿した突然変異体p53双方と反応性であった。この研究は、p53に対する証明可能な抗体応答を持つ個体からの抗-p53抗体の単離の最初の報告を表す。それ自体、それは、悪性疾患を持つヒトで観察された遺伝子用法およびp53に対する免疫応答のエピトープ特異性についての重要な情報を提供する。また、それは、有用な免疫治療剤としてのこれらの開発のための再現性のある

戦略も提供する。

【0273】

抗体ファージ提示技術は、ある範囲の感染性および自己免疫疾患に対する液性免疫応答の性質および特異性を調べるのにますます使用されている。結直腸癌を持つ幾人かの個体の血清中の抗-p53抗体の発生は、重要な腫瘍サプレッサー遺伝子産物に対するこの応答の特異性をより精密に調査する機会を提供した。

【0274】

この研究では、結直腸腫瘍を排出する結腸周囲リンパ節からライブラリーを構築した。というのは、この組織は抗-p53抗体の富化源を表すらしいと考えられた。特異的Fabを単離する確率をさらに増大させるため、本発明者らは、p53蛋白質またはその部分に対する証明可能なIgG1応答を持つ個体を選択した。この点に関し、p53に対する高アフィニティーを持つ全てのそれらのFabは、最高のp53に対する血清抗体力価を持つ個体から誘導され、および証明可能な血清応答を持たない個体から抗体は単離されなかったことに注意されたい。

【0275】

まず、この研究は、天然に生じるp53抗体の遺伝的構造を調べ、それらを生産した免疫応答の性質に関しその構造から推定する機会を提供した。

【0276】

ヌクレオチド配列決定は、p53FabのV遺伝子がかなりの突然変異(14ないし18.5%)を受けることを示し、これは、Tth(ポリメラーゼ)誘導エラーに基づいて説明できそうもない知見である(12)。事実、V遺伝子突然変異のこの頻度は、クラススイッチした生殖系中心および記憶B細胞(4%まで)について報告されているものよりも高く、これは、単離された抗体がこれらの個体における特異的抗原-駆動液性免疫応答の発生を反映することを強く支持する。特に高い突然変異の頻度は、悪性疾患を持つ個体における抗原暴露の慢性的性質を反映し得る。免疫系に対するp53提示のメカニズムは以前として確かではないが、当該プロセスは腫瘍の生成のプロセスにおいて初期に発生することは明瞭である。例えば、血清p53抗体は、悪性疾患の検出に数年先立って喫煙者

で報告されている(13)。これは、抗原性p53が病気の間中免疫系に対して提示でき、この継続的暴露はV遺伝子におけるかなりの体細胞突然変異率の原因で有り得ることを示唆する。

【0277】

V遺伝子における置き換え突然変異の頻度の統計学的解析は、単離されたFabが抗原-駆動選択の結果として生じるとい争いを支持するさらなる証拠を提供する。置き換え突然変異での陰性選択はVH1ファミリー抗体のフレームワーク領域で観察され、CDR1およびクローン163・17の2におけるその陽性選択はアフィニティ成熟抗体の典型的な特徴である。

【0278】

Fabの構造的特徴、それから誘導される推定は、表面プラズモン共鳴を用いるアフィニティ分析によって支持される。単離されたFabは、全て、変性p53に対して比較的高い親和性を示し、これは、再度、それらが特異的抗原-駆動免疫応答の産物を表すことを示唆する。

【0279】

安定なクローナルFabの成功した単離もまた、天然に生じるp53抗体のエピトープ特異性のより精密な調査を可能とした。この実験で単離されたFabは、p53の残基27-44(ヒトp53に対して圧倒的に特異的である領域)に結合した(14)。この領域は、転写マシーナリー、ならびにウイルス蛋白質との相互作用のための部位として特に重要である(15)。今日、p53に対するほとんどのポリクローナル抗体血清およびネズミモノクローナルは、N-末端領域(10-25、40-50)、中央領域(120-130、205-215、285-295)およびC-末端領域(345-393)中の残基にわたる狭い範囲の免疫優性エピトープに結合することが示されている。この研究は、癌を持つ個体からのリンパ球がそのような抗体のユニークで価値ある源を表し、この重要な源の首尾よい開発への戦略の概略を示すことを示す。

【0280】

実施例2

p53の中央ドメインに対する抗-p53抗体の単離および特徴付け

材料および方法

p53中央およびカルボキシ末端ドメインの精製

全p53の中央カルボキシ末端ドメイン(中央ドメイン、残基95-298;カルボキシ末端ドメイン、283-393)を、p53特異的プライマー(中央順方向、5'-ggccccaatatgtcttctgtcccttcccag;中央逆方向、5'-agtcatatgtcacagctcgtggtcaggctc;カルボキシ順方向、5'-gagaccatatgacagaggaacagaatctc;カルボキシ逆方向、5'-agtcatatgtcagttctgagtcaggccc)を用いるPCRによって野生型p53配列から増幅した。PCR産物をNDE1で消化し、細菌発現ベクターpET19b(Novagene)のNDE1部位にクローンした。中央およびカルボキシ末端ドメインを発現させ、全p53について記載したごとく精製した。

【0281】

精製した中央ドメインおよびカルボキシ末端ドメイン蛋白質を、中央またはカルボキシ末端ドメイン特異的血清抗体を持つ結直腸癌患者の同定、Fab抗体のバイオパニング、および可溶性中央ドメイン反応性Fabの検出で用いた。これを行うためのプロトコルは、中央ドメインまたはカルボキシ末端ドメインをPBS中2μg/mlにてマイクロタイタープレートのウェルにコートした以外は実施例1に記載したのと実質的に同一である。

【0282】

交差反応性ELISAで用いる抗原を、カルコネート緩衝液中2μg/mlでコートしたp53のカルボキシ末端ドメインおよびPBS中2μg/mlでコートした初期妊娠因子(EPF)を除き前記した(実施例1)のと同濃度でコートした。

【0283】

免疫プロット分析

SDS/PAGEゲルで泳動させた精製全p53および中央ドメインを、100Vにて1時間、PVDF膜(0.22μM、NEN/Dupont)に電気ブロットし、(Towbinら, 1979)、10%スキムミルク粉末/PBS

中で1時間ブロックした。一次抗体DO7(10%スキムミルク粉末/PBS中0.25 µg/ml)、Pab240 DO7(10%スキムミルク粉末/PBS中0.25 µg/ml)、163.1 Fab細菌上清または1159.8上清を、次いで、室温にて一時間インキュベートした。これに続き、該膜をPBS中で3回洗浄し(洗浄ごとに10分)、アルカリ性フォスファターゼヤギ抗-マウスまたはアルカリ性フォスファターゼヤギ抗ヒトFab(10%スキムミルク粉末PBS中0.1 µg/ml)と共に1時間インキュベートし、次いで、PBSで3回洗浄した。該膜を、アルカリ性フォスファターゼ基質溶液(炭酸緩衝液pH9.6中NBT[0.3 µg/ml]、BCIP[0.15 µg/ml])の添加に先立って5分間で炭酸緩衝液で平衡化させた。

【0284】

結果

中央ドメイン反応性クローンの単離

純粋なp53中央ドメイン蛋白質 に対して5ラウンドのバイオパニングを行った。最終ラウンドのパニングから採取したクローンからの可溶性Fab(n=88)を、ELISAによって蛋白質に対する反応性につき評価した。単一のクローン(1159.8)が中央ドメインに対して全p53に対して反応性であることが判明した(図11)。さらなる分析は、1159.8が、腫瘍抗原、自己蛋白質、外来性蛋白質およびハプテンを含めたある範囲の他の抗原と反応しないことを明らかとし、p53の中央ドメインに対するこのクローンの特異性が確認され得(図12)。

【0285】

また、全p53および中央ドメインに結合する該クローンの能力をイムノプロットによって評価した(図13)。1159.8は、ネズミモノクローナル抗体DO7およびPab240と同様に全pおよび中央ドメインに結合したことが示された。これらのネズミモノクローナル抗体は、各々、p53のアミノ末端および中央ドメインに対して特異的である。アミノ末端反応性Fabクローン163.1で中央ドメイン反応性は観察されず、このドメインに対する1159.8の特異性が確認される。クローン1159.8のヌクレオチド配列および推定アミ

ノ酸配列は、各々、1159・8軽鎖可変配列および1159・8重鎖可変配列についての配列番号29および30に見い出すことができる。

【0286】

実施例3 - 哺乳動物発現ベクター

MCO1の構築

等濃度(1 μ g)の2つの合成オリゴヌクレオチド99量体(センス:CTAGT GGC CAG GCC GGC CAG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG TTC CCC GGG GCT GCT CAC TAT ACG CGC CAG GAG G)および91量体(アンチセンス:CTG GCG CGT ATA GTG AGC AGC CCC GGG GAA CTA TGC GGC CCC ATT CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC CTG GCC GGC CTC GCC A)を、75℃にて2分間加熱し、続いて1.5時間にわたって35℃まで冷却することによってSequanase反応緩衝液(USB)中でアニールした。次いで、二本鎖オリゴヌクレオチド(30ピコモル)を、27℃で60分間、10mM ATP、1 \times ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液および10Uポリヌクレオチドキナーゼ(Boehringer Mannheim)中でインキュベートすることによってリン酸化した。該キナーゼを不活化し、DNAをフェノール抽出し、エタノール沈殿させ、20 μ lの水に再懸濁させた。次いで、二本鎖オリゴヌクレオチドをホスファターゼ-処理したSpeI/BstXI消化のNPC3に連結し、構築体を電気ポテントXL1-Blue E. coli細胞(Stratagene)に形質転換した。合成オリゴヌクレオチドカセットを含有するクローンを、次いで、制限酵素分析(MCO1は、NPC3に存在しないSmaI部位を含有する)によって、およびヌクレオチド配列決定(Sanger)によって同定した。

【0287】

実施例4

全抗体の構築

材料および方法

全抗体のクローニングおよび生産のための戦略を図5に示す。選択されたFabクローンからの重鎖および軽鎖可変領域を、タッチダウンプロトコルを用いるPCRによって増幅した。典型的な反応は、鋳型DNA(100ng)、50ピコモルの各PCRプライマー(重鎖プライマー、p53Vhfor-5'-atagttgcggccgctgtgcagctgctcgaおよびp53Vhrev-5'-agtttcactagttgaggagacggc;軽鎖プライマー、p53Vkfor-5'-ttacatgtcgaaggccgagctcaccおよびp53Vkrev:5'-ccctggttcgaacctttagtttagatctactgat)、1.5mM MgCl₂、200μM dNTP、0.12U Pfuポリメラーゼを50μlの容量中に含んだ。PCRについての条件は4分間の94℃、次いで、2サイクルの30秒間の94℃(変性)、1分間の65℃(プライマーアニーリング)、90秒間の72℃(プライマー延長)であった。次いで、アニーリング工程を各連続したラウンドで0.5℃だけ低下させた以外は同一の条件下で、さらに20サイクルを行った。次いで、最後の10PCRサイクルを55℃のアニーリング温度で行った。

【0288】

重鎖および軽鎖PCR産物を0.8%(w/v)Nusieveアガロースで電気泳動し、Qiaquick DNA精製からの(Qiagen)を用いて精製し、適切な制限エンドヌクレアーゼ(重鎖、NotIおよびSpeI;軽鎖、SalIおよびXbaI)で消化した。次いで、精製された重鎖を重鎖発現ベクター-tG1D105にクローンし、軽鎖を軽鎖発現ベクター-eKN101にクローンした(図5)。製造業者の仕様に従って(Pronega)、個々の重鎖および軽鎖クローンの配列を配列決定法によって決定した。選択された重鎖および軽鎖クローンをXL1-blue E.coliで増殖させ、プラスミドをアルカリ溶解によって抽出し、次いで、CsClグラジエント遠心によって二重精製した。

【0289】

CHO細胞系を発現する抗体のトランスフェクションおよび選択

親細胞系CHO DG44を 6×10^5 細胞/皿にて10cmのさらに接種し、HT(10mMナトリウムヒポキサンチン、1.6mMチミジン)を補足したCHO-S-SFM II(Gibco)中で増殖させた。重鎖(pG1D102)および軽鎖(pKN100)を含有するベクターを、製造業者の仕様に従いFugeneトランスフェクション試薬(Boehringer Mannheim)を用いてCHO DG44にトランスフェクトした。簡単に述べれば、等しい量の重鎖および軽鎖ベクター(1ないし5 μ gのDNA合計)を1:3のDNA:Fugene比率にてFugeneに添加し、室温で10分間混合した。Fugene/DNA混合物を培地および細胞に滴下し、次いで、一晩インキュベートした。

【0290】

メトトレキセート(5nM)およびG418(500 μ g/ml)を含有するCHO-S-SFM-IIにトランスフェクトされた細胞を継代し、抗体を発現したトランスフェクタントのプールを、引き続いて、0.5細胞/ウェルの細胞密度にて平板培養した。メトトレキセートの濃度を各継代で増加させ(5ないし50nM)、G418のレベルを、徐々に、同一時間にわたって培養基から除去した。特異的クローンを増殖させ、次いで、0.5細胞/ウェルにおけるもう一つのラウンドのクローニングに付して、細胞のクローン集団が生成したことを確認した。全抗-p53抗体の生産用に選択したクローン(A1、B4)をG418またはメトトレキセートを含まない培地中に維持した。

【0291】

全抗体生産および精製

選択された細胞系を細胞培養およびスピナーフラスコ($1 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 細胞/ml)中で5ないし10日間にわたって培養し、次いで、培養基および細胞をまず1200gにて遠心して、ほとんどの細胞を除去し、次いで、4000gにて15分間再度遠心して他の細胞夾雑物を除去した。

【0292】

プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用い、抗体を培養上清から

精製した。簡単に述べれば、1mlのプロテインA (BioRad AffiPrepプロテインA樹脂) を含有するカラムを50mlのPBSで平衡化させ、上清を重力下でカラムに流した。次いで、樹脂を重力下で10mlのPBSで洗浄した。抗体を10mlの0.1Mグリシン/0.2M NaCl pH3で溶出させ、0.5mlずつの画分に収集し、その各々を50µlの1MトリスHCl、pH8でpH7に調製した。精製した抗体を全ての抗体特徴付けで用いた。

【0293】

精製した全抗体を検出し、抗-ヒト抗体捕獲ELISAを用いて定量した。マイクロタイタープレートのウェルを、4 にて一晚、100µlのヤギ抗-ヒトIgG Fc特異的抗体(0.1 M NaHCO₃/0.1%Bronidox)でコートした。次いで、ウェルを200µlのPBS/0.05%Tween/0.1%Bronidoxで3回洗浄し、37 にて1時間で、PBS/1%スキムミルク/0.5%BSA/0.1%Bronidoxでブロックした。ヒト抗体の系列希釈(1:2ないし1:2000)をウェルに適用し、37 にて1時間インキュベートした。次いで、ウェルをPBS/0.05%Tween/0.1%Bronidoxで3回洗浄し、37 にて30分間、100µlのビオチン結合抗-ヒトカッパ(PBS/1%スキムミルク/0.5%BSA/0.1%Bronidox中0.5µg/ml; Rockland, MA, USA)と共にウェルをインキュベートした。ウェルを3回洗浄し、100µlのアルカリ性ホスファターゼ結合ストレプトアビジン(PBS/1%スキムミルク/0.5%BSA/0.1%Bronidox中0.04mg/ml; Jackson Immuno Research Lab Inc)を37 にて30分間で各ウェルに添加した。さらなる洗浄後、p-ニトロフェニルアルカリ性ホスファターゼ基質(炭酸緩衝液中1mg/ml; Sigma)を添加し、約20分間で色を発色させ、吸光度を410nmで読んだ。65ないし0.4ng/mlの範囲の濃度に希釈した陽性対照IgG1抗体(The Binding Site, UK)を用いて生じた標準曲線と未知の吸光度値を比較することによって、抗体の濃度を計算した。

【0294】

全抗体の特徴付け

抗-p53抗体のELISA分析

精製p53 (PBS中に $\mu\text{g}/\text{ml}$ の $100\mu\text{l}$)、p53の中央ドメイン (PBS中に μ/ml の $100\mu\text{l}$) およびC-末端ドメイン (炭酸緩衝液中 $2\mu/\text{ml}$ の $100\mu\text{l}$) を4 にて一晚、マイクロタイタープレートのウェルにコートした。ウェルを $200\mu\text{l}$ のPBSで3回洗浄し、 $100\mu\text{l}$ の精製抗体を二連で適応し、室温にて2時間インキュベートした。PBSで洗浄した後、 $100\mu\text{l}$ のHRP結合ヤギ抗-ヒト (PBS/2%BSA中 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$: Jackson Immuno Research Lab Inc) 抗体を添加した。さらなる洗浄の後、 $100\mu\text{l}$ のTMB基質 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg MD) で色を発色させ、 $50\mu\text{l}$ の1M硫酸で反応を停止させた。この抗体をHRP結合ヤギ抗-マウス (PBS/2%BSA中 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$: Jackson Immuno Research Lab Inc) でこの抗体を検出した以外は同様の条件下で、モノクローナル抗体DO7 ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) を陽性対照として用いた。

【0295】

p53抗体と他の抗原との反応性を、p53で前記したのと同様の方法を用いるELISAによって評価した。以下の抗原および濃度をウェルのコーティングで用いた: インスリン ($5\mu\text{g}/\text{ml}$)、erbB2細胞外ドメイン ($2\mu\text{g}/\text{ml}$)、CEA ($1\mu\text{g}/\text{ml}$)、BSA ($20\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich, Castlehill, Australia)、キーホールリンペッドヘモシアニン ($1\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich)、BSM ($10\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich, Castlehill, Australia)、雌鳥卵白リゾチウム ($10\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich, Castlehill, Australia) および初期妊娠因子 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$)。

【0296】

エピトープ分析

p53 遺伝子 - 断片ライブラリーの構築

p53 遺伝子を、pET19b/p53 構築体(7)からPCR増幅し、0.8% Nusieveゲル上で泳動させ、Qiaquick DNA精製カラムを用いて精製した。遺伝子断片をDNase I(0.5 U/ml)で消化し、100ないし300塩基対の間のp53 遺伝子断片をゲル-精製し、T4DNAポリメラーゼを用いて末端-再対合させた。リン酸化リンカーFUSP(16)を平滑末端とし、p53 遺伝子断片に連結し、12.5 µlの10×PCR緩衝液(Fisher Biotech, Perth, Australia)、12.5 µlの25mM MgCl₂、20 µlの1.25mM dNTP、2.5 U Tthポリメラーゼ(Fisher Biotech, Perth, Australia)および250ピコモルの各プライマー: MCO234(5' - atatccagacgctggcggtg)およびMCO235(5' - ATATCCAGCAGCTGGCGGTG)を含有する75 µl混合物中で、連結した産物をPCR増幅した。5分間の94 °Cで出発し、続いて、1分間の94 °C、30秒間の60 °C、30秒間の72 °Cの35サイクルの増幅、次いで、10分間の72 °Cの最終インキュベーションを行い、Parkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 を用いてPCR反応を行った。PCR増幅断片をゲル精製し、PflMI(DNAの5 u/µg)で消化し、SfiI(5 u/µgのDNA)消化fUSE5ベクターDNAに連結した(17)。Bio-Rad Gene Pulserを用い、連結混合物をMC1061に電気形質転換した。ライブラリーのサイズを測定するために、1および10 µlの培養のアリコットを、テトラサイクリン(20 µg/ml)およびストレプトマイシン(50 µg/ml)を含有するルリアプロス寒天プレート上で平板培養した。残りの培養を、テトラサイクリン(20 µg/ml)およびストレプトマイシン(50 µg/ml)を補足した400mlの2YT中で一晩増殖させた。ファージを精製し、Smithによって記載されているごとく力価測定した(18)。

【0297】

p53 遺伝子断片ライブラリーのアフィニティー選択

マイクロタイタープレートのウェルを、PBS中の100 μ lの抗-p53抗体(10 μ g/ml)で4 $^{\circ}$ Cにて一晩コートした。溶液を除去し、ウェルを0.05%Tween/PBSで3回洗浄し、次いで、37 $^{\circ}$ Cにて1時間、0.05%Tweenおよび2%スキムミルクを含有するPBSでブロックした。0.05%Tweenおよび2%スキムミルクを含有するPBS中10¹¹TU/100 μ lに希釈したp53遺伝子断片ライブラリーを添加し、プレートを37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。未結合ファージを、0.05%Tween/PBS中での5回の、PBS/0.5%Tween中での5回の洗浄によって除去した。室温にて、結合したファージを100 μ lの0.1Mグリシン、pH3.0で10分間溶出させ、溶出物を10 μ lの1Mトリス-HCl、pH9.5で直ちに中和した。中和したファージ溶液を用いて、37 $^{\circ}$ Cにて15分間、1mlの中期対数期間のK91Kan培養を感染させた。テトラサイクリン(0.2 μ g/ml)を含有する10mlの2YT中、37 $^{\circ}$ Cにて、さらに30分間、培養をインキュベートした。100、1および0.01 μ lの培養のアリコットを、テトラサイクリン(20 μ g/ml)およびカナマイシン(100 μ g/ml)を含有するルリアブロス寒天に平板培養して、各アリコットのコロニー形成単位および感染後力価を測定した。残存する感染培養を、テトラサイクリン(20 μ g/ml)およびカナマイシン(100 μ g/ml)を含有する100mlの2YTに添加し、次いで、震盪しつつ一晩インキュベートしてライブラリーを増幅させた。ファージを沈殿させ、第2ラウンドのパニングで用いた。3ラウンドのパニングを行った。

【0298】

ファージELISAによる陽性クローンスクリーニング

各ラウンドのパニングのアウトプットからの単一コロニーを一晩増殖させ、ファージを単離した。マイクロタイタープレートのウェルを、パニングで用いるのと同条件下で抗-p53抗体でコートした。新たに調製したファージ(10¹⁰-10¹¹cfu/ml)をコートしたおよびコートしていないウェル上で1時間インキュベートし、次いで、0.05%Tween/PBSで洗浄した。PBSで洗浄した後、100 μ lのHRP結合マウス抗-M13(PBS/2%BSA

中0.5 µg/ml : Pharmacia) 抗体を添加し、室温で1時間インキュベートした。さらに洗浄した後、100 µlのTMB基質(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg MD)で色を発色させ、50 µlの1M硫酸で反応を停止させた。

【0299】

免疫沈殿

以下の細胞系を免疫沈殿: HT29 (突然変異体p53を含むヒト結直腸癌細胞系) で用いた。MCF-7 (野生型p53を持つ乳癌細胞系) およびMethA (突然変異体p53を持つマウス腫瘍細胞系)。ほぼ 10^7 細胞をTNE S緩衝液(50mMトリス pH7.5, 2mM EDTA, 100mM NaCl, 1%ノニデッドP40, プロテアーゼ阻害剤カクテル(Boehringer Mannheim) および1mM PMSF) 中で溶解させ、次いで、10000gでの10分間の遠心によって細胞夾雑物を除去した。細胞溶解物からのほぼ250 µgの全蛋白質を各免疫沈殿で用いた。モノクローナル抗体D07(0.5 µg) または全抗-p53抗体(ほぼ1 µg/ml)のいずれかを溶解物に添加し、4℃にて1時間インキュベートした。この時点で、20 µl(充填容量)のプロテインA-セファロース(Zymed Laboratories Inc.)を全てのチューブに添加し、4℃にてさらに1時間インキュベートした。プロテインAセファロースをPBSで4回洗浄し、変性および還元条件下で10%SDS PAGEに付した。エレクトロブロッティングによって、蛋白質をPVDF膜に移し、10%スキムミルク粉末でブロックし、蛋白質のN-末端につき特異的なヤギ抗-ヒトp53抗体(0.2 µg/ml)でプローブした。これに続き、PBSで4回洗浄し、HRP結合ロバ抗-ヤギ抗体(0.2 µg/ml)と共に1時間インキュベートし、PBSで4回洗浄した。ケミルミネセンス基質(DuPont NEN)を用いてプロットを発色させた。プロテインAセファロース単独、および抽出物単独は、各々、陰性対照として全ての実験に含ませた。

【0300】

免疫組織化学

結直腸腫瘍組織の4 μ mパラフィン切片を脱ろうし、再度水和し、3% (v/v) 過酸化水素で5分間処理し、次いで、0.01Mクエン酸緩衝液pH6.0中で10分間マイクロ波処理した。次いで、全抗-p53抗体(C4B4)またはモノクローナル抗体DO7(共に2%BSA/TBS中2.5 μ g/mlに希釈)いずれかと共に1時間インキュベートする前に、該切片を正常ウサギ血清(2%BSA/TBS中1:5)で20分間ブロックした。次いで、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヒトまたはホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ウサギ抗-マウス(2%BSA/TBS中1:100)と共にスライドを30分間インキュベートすることによって、結合した抗体を検出した(各々30分間)。各インキュベーションの後、TBS中で十分洗浄した。3-3'-ジアミンベンジジン:4塩酸塩(0.003%過酸化水素中0.03%)で色を発色させ、設置する前に切片をヘマトキシリンで逆染色した。

【0301】

全抗体の構築および特徴付け

発現ベクターpKN100およびpG1D102にクローンした可変領域遺伝子を配列決定し、親Fabクローンと同一の配列を有することが示された。CHO細胞を、ベクターおよび2つのクローン、トランスフェクタントのプールからのC4B4およびC4A1で首尾よくトランスフェクトした。ELISAによって分析すると、両クローンからの抗体は全p53と反応するが、当該蛋白質の中央またはC-末端ドメインとは反応しないことが示され、これは、それらがアミノ末端領域単独と反応性であることを示す。プロテインAクロマトグラフィーを用いて、クローンC4B4からの抗体を精製し、還元および非還元条件下でSDS-PAGEによって分析し、正しいサイズの重鎖および軽鎖を持つ全抗体を生じることが示された(図6)。精製抗体は、ハプテン、自己抗原および腫瘍抗原を含めたある範囲の抗原との交差反応性につきELISAによって評価した。抗体C4B4は全p53に結合するが、アッセイで用いた他の抗原には結合しないことが判明した(図7)。C4B4からの抗体生産はC4A1から得られたものよりも高く、従って、このクローンを最終ラウンドのクローニングに付して、C4B4G4というクローンを得た。

【0302】

ヒト細胞系HT29およびMCF-7、およびマウス細胞系MethAを用いて、真核生物細胞から誘導されたp53に対する全抗体の反応性を評価した。C4B4は、p53モノクローナル抗体DO7と同様に、野生型および突然変異体p53ならびに突然変異体ネズミp53を免疫沈殿させることができることが示された(図8)。

【0303】

エピトープ分析

p53遺伝子断片ライブラリーを、精製C4B4抗体に対する3ラウンドのパニングに付した。ラウンド2および3からのファージクローンのC4B4に対する反応性についての分析は、ラウンド2における15/22クローンおよびラウンド3からの19/22が抗体に結合したことを示した。反応性クローンの配列分析は、それらが、全て、40ないし54のアミノ酸残基を含有するp53の断片を含有することを示した(図9)。欠失突然変異体および親Fab抗体163.5を用いる実験で定義されたエピトープと比較すると、該エピトープは40ないし44からの残基を含むと定義する。

【0304】

免疫組織化学

精製C4B4G4抗体を用いて、結直腸癌を持つ個人からの腫瘍組織およびマッチした正常組織の4μm切片中のp53を検出した。抗体は腫瘍細胞と特異的に反応性であり、それは陽性対照抗体DO7と同様の核染色パターンを有することが示された(図10)。

【0305】

実施例5 - p53検出系

本発明の抗体またはその断片は、正常および病気状態の脊椎動物においてp53遺伝子によってコードされたポリペプチドの検出で用いることができる。例えば、抗体を用いて、以下のように患者試料からのp53蛋白質を捕獲することができる。

【0306】

抗 - p 5 3 F a b のとき抗 - p 5 3 抗体またはその断片を、約 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ の溶液を用い、適当な表面（例えば、E L I S A プレート、ポリソープ - イミュノプレー（N U N C , D e n m a r k））にコートする。次いで、これを、表面をリン酸緩衝化生理食塩水（P B S）で洗浄する前に、約 2 %（w / v）の濃度のウシ血清アルブミン（B S A）でブロックする。患者の試料を添加し、除去する前に適当な時間インキュベートし、表面を再度 P B S で洗浄する。次いで、レポーター分子（例えば、アルカリ性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ F I T C）に結合した p 5 3 特異的ポリクローナル抗体を添加し、しかる後、表面を再度 P B S または他の緩衝液で洗浄した。次いで、レポーター分子に適した基質（例えば、ニトロブルーテトラゾリウム（N B T）と共に 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート（B C I P）、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン二塩化物（T M B））を添加して、結合した p 5 3 蛋白質を可視化し、必要に応じて、それを定量する。

【0307】

実施例 6 - 医薬組成物

本発明の抗体またはその断片を単独で投与するのはもちろん可能であるが、それは医薬処方として投与するのが好ましい。有効成分は、局所投与では、処方の 0 . 0 0 1 重量%ないし 1 0 重量%、例えば、1 重量%ないし 5 重量%を含むことができるが、それは処方の 1 0 重量%もと多く、しかしながら、好ましくは 5 重量%過剰ではなく、より好ましくは 0 . 1 重量%ないし 1 重量%を含むことができる。

【0308】

本発明の局所処方は、1 以上の許容される担体、および所望によりいずれかの他の治療成分と共に有効成分を含む。担体は処方の他の成分に適合する意味で「許容される」ものでなければならず、その受容者に有害であってはならない。

【0309】

局所投与に適した処方は、リニメント、ローション、クリーム、軟膏またはペースト、および目、耳または鼻への投与に適した点剤のごとき、治療が必要な部位への皮膚を通しての浸透に適した液体または半液体製剤を含む。

【0310】

本発明の点剤は滅菌水性もしくは油性溶液もしくは懸濁液を含むことができる。これらは、有効成分を、殺菌および/または殺菌類剤および/またはいずれかの他の適当な保存剤(所望により、界面活性剤を含む)の水溶液に溶解させることによって調製することができる。次いで、得られた溶液を濾過によって透明化し、適当な容器に移し、滅菌することができる。滅菌は、90ないし100にて30分間オートクレーブ処理し、または維持することによって、あるいは濾過し、続いて無菌技術により容器に移すことによって達成することができる。点剤に含めるのに適した殺菌剤および殺菌類剤の例は硝酸もしくは酢酸フェニル水銀(0.002%)、塩化ベンザルコニウム(0.01%)および酢酸クロルヘキシジン(0.01%)である。油性溶液の調製に適した溶媒はグリセロール、希釈されたアルコールおよびプロピレングリコールを含む。

【0311】

本発明によるローションは、皮膚または目への適用に適したものを含む。目ローションは所望により殺菌剤を含有する滅菌水性溶液を含むことができ、点剤の調製に関して前記したのと同様の方法によって調製することができる。皮膚への適用のためのローションまたはリニメントは、アルコールまたはアセトンのごとき、乾燥を速め、皮膚を冷却するための剤、および/またはグリセロールのごときモイスチャーライザー、またはヒマシ油または落花生油のごときアルコールを含むこともできる。

【0312】

本発明のクリーム、軟膏またはペーストは、外用のための有効成分の半固体処方である。それらは、有効成分を、グリースまたは非グリース基剤と共に、微粉碎または粉末形態単独または水性または非水性流体中の溶液または懸濁液に混合することによって作成することができる。該基剤は、プロピレングリコールまたはマクロゴールのごときアルコールと共に、ハード、ソフトまたは流動パラフィン、グリセロール、ミツロウ、金属セッケンのごとき炭化水素、粘液;アーモンド、トウモロコシ、落花生、ひましままたはオリーブ油のごとき天然起源の油;羊毛脂質またはその誘導体、ステアリン酸またはオレイン酸のごとき脂肪酸を含む

ことができる。

【0313】

処方は、ソルビタンエステルまたはポリオキシエチレン誘導体のごときアニオン性、カチオン性または非イオン性界面活性剤のようないずれかの適当な界面活性剤を配合することができる。天然ガムのごとき懸濁化剤、セルロース誘導体またはシリカ質シリカのごとき無機材料ならびにラノリンのごとき他の成分を含めることができる。

【0314】

さらに、本発明の抗体（またはその断片）の個々の投与の最適および間隔は、治療すべき疾患の性質および程度、投与の形態、経路および部位、および治療すべき特定の脊椎動物の性質によって決定されるであろうことは当業者に明らかであろう。また、そのような最適条件は通常技術によって決定することができる。

【0315】

また、規定された日数の間における一日あたりに与えられる本発明の抗体（またはその断片）の投与の数のごとき治療の最適コースは、治療決定テストの通常のコースを用い当業者によって確認できることは当業者に明らかであろう。

【0316】

以下は処方単なる例示的例であって、断じて本発明の範囲を限定するものではないと解釈されるべきである。

【0317】

実施例6(a) - カプセル組成物

カプセルの形態の本発明の抗体（またはその断片）を含有する医薬組成物は、標準的ツーピースハードゼラチンカプセルに粉末形態の本発明の50mgの抗体（またはその断片）、100mgのラクトース、35mgのタルクおよび10mgのステアリン酸マグネシウムを充填することによって調製される。

【0318】

実施例6(b) - 注射非経口組成物

注射による投与に適した形態の本発明の医薬組成物は、2重量%の本発明の抗

体（またはその断片）を10容量%のプロピレングリコールおよび水中で攪拌することによって調製することができる。溶液は濾過によって滅菌する。

【0319】

実施例6(c) - 軟膏組成物

軟膏としての送達用の典型的な組成物は、スムーズで均一な生成物を得るために分散させた100.0gまでの白色ソフトパラフィンと共に、1.0gの本発明の抗体（またはその断片）を含む。次いで、コラプシブル金属チューブに該分散液を充填する。

【0320】

実施例6(d) - 局所クリーム組成物

局所クリームとしての送達用の典型的な組成物は以下に概説する：

抗体（その断片）1.0g

ポラワックスGP200 25.0g

ラノリン無水物3.0g

白色ミツロウ4.5g

ヒドロキシ安息香酸メチル0.1g

脱イオン水または滅菌水で100.0gとする

【0321】

ポラワックス、ミツロウおよびラノリンを一緒に60で加熱し、ヒドロキシ安息香酸メチルの溶液を添加し、高スピード攪拌を用いてホモゲナイゼーションを達成する。次いで、温度を50まで降下させる。次いで、本発明の抗体（またはその断片）を添加し、徹底的に分散させ、組成物を低速攪拌しつつ冷却させる。

【0322】

実施例6(e) - 局所ローション組成物

局所ローションとして送達用の典型的な組成物を以下に概説する：

抗体（またはその断片）1.2g

ソルビタンモノラウレート0.8g

ポリソルベート20 0.7g

セトステアリルアルコール 1.5 g

グリセリン 7.0 g

ヒドロキシ安息香酸メチル 0.4 g

滅菌水で 100.00 ml とする

【0323】

ヒドロキシ安息香酸メチルおよびグリセリンを 75 にて 70 ml の水に溶解させる。ソルビタンモノラウレート、ポリソルベート 20 およびセトステアリルアルコールを 75 にて一緒に融解させ、水性溶液に添加する。得られたエマルジョンをホモゲナイズし、連続的に攪拌しつつ冷却させ、本発明の抗体（またはその断片）を残りの水中の懸濁液として添加する。全懸濁液をホモゲナイズされるまで攪拌する。

【0324】

実施例 6 (f) - 点眼剤組成物

点眼剤としての送達用の典型的な組成物を以下に概説する：

抗体（またはその断片） 0.3 g

ヒドロキシ安息香酸メチル 0.005 g

ヒドロキシ安息香酸プロピル 0.06 g

精製水で 100.00 ml とする

【0325】

ヒドロキシ安息香酸メチルおよびプロピルを 75 にて 70 ml の精製水に溶解させ、得られた溶液を冷却させる。次いで、本発明の抗体（またはその断片）を添加し、メンブランフィルター（0.022 μm ポアサイズ）を通す濾過によって溶液を滅菌し、滅菌容器に無菌的に溶解する。

【0326】

実施例 6 (g) - 吸入投与用の組成物 (I)

20 ~ 30 ml の容量のエアロゾル容器では、ポリソルベート 85 またはオレイン酸のごとき 0.5 ないし 0.8 重量%の滑沢剤と 10 mg の本発明の抗体（またはその断片）の混合物を添加し、混合物をフレオンのごときプロペラントに分散させ、鼻孔内または経口吸入投与いずれかのための適当なエアロゾル容器に

入れる。

【0327】

実施例6(h) - 吸入投与用の組成物(II)

20~30mlの容量のエアロゾル容器では、エタノール(8ないし10ml)中の10mgの本発明の抗体(またはその断片)、ポリソルベート85またはオレイン酸のごとき0.1ないし0.2%の潤滑剤の混合物を添加し、混合物をフレオンのごときプロペラントに分散させ、鼻孔内または経口吸入投与いずれかのための適当なエアロゾル容器に入れる。

【0328】

実施例6(i) - 非経口投与用組成物

また、本発明の抗体(またはその断片)および医薬組成物は非経口投与、すなわち、皮下、筋肉内または静脈内投与で有用である。

【0329】

非経口投与用の組成物は、通常、本発明の抗体(またはその断片)の溶液または水、緩衝化水、0.4%生理食塩水および0.3%グリセリン等のごとき許容される担体に溶解させたそのカクテルを含み、ここに、そのような溶液は滅菌されており、粒子状物質は比較的ない。次いで、これらの溶液を滅菌する。

【0330】

該組成物は、さらに、pH調製剤および緩衝剤のごとき適当な生理学的条件に必要な医薬上許容される物質を含有することができる。そのような組成物中の本発明の抗体(またはその断片)の濃度は変化させることができ、それは選択された特定様式の投与に従って、流体容量、粘度等に主として基づくであろう。

【0331】

かくして、筋肉内注射のための本発明の医薬組成物は、1mlの滅菌緩衝化水および50mgの本発明の抗体(またはその断片)を含有するように調製することができる。

【0332】

同様に、静脈内注入用の医薬組成物は250mlの滅菌リンゲル液、および150mgの本発明の抗体(またはその断片)を含むことができる。非経口投与で

きる組成物を調製する方法は当業者に明らかであり、例えば、引用してここに一体化させる、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 第15版、Mac Publishing Company, Easton, Paにより詳細に記載されている。

【0333】

また、本発明の抗体（またはその断片）は貯蔵のために凍結乾燥し、使用に先立って復元することができる。

【0334】

意図する結果に応じて、本発明の医薬組成物は予防および/または治療処置のために投与することができる。治療適用では、組成物は、少なくとも部分的に病気およびその合併症を治癒、または少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で、すでに病気に罹った患者に投与される。予防適用では、抗体（またはその断片）またはそのカクテルを含有する組成物をすでに病気状態にはない患者に投与して患者の抵抗性を高める。

【0335】

医薬組成物の単一または複数投与は、治療医師によって選択される用量レベルおよびパターンで行うことができる。それにもかかわらず、本発明の医薬組成物は患者を効果的に治療するのに十分な量の改変抗体（またはその断片）を提供するべきである。

【0336】

本発明の抗体は、抗体（またはその断片）と同一の療法で有用であろうペプチドまたは非ペプチド化合物（ミメティックス）いずれかのデザインおよび合成で必要であろうことにも注意すべきである。

【表I】

表 I : 研究用に選択した患者の臨床的詳細、抗-p53 血清力価および抗体ライブラリーサイズ

患者 ID	性別	腫瘍の部位	Dukes 段階	分化の程度	過剰発現された p53 の検出	p53 突然変異	抗-p53 力価 (IgG)	支配的 IgG アイソタイプ	ライブラリーサイズ
100	M	sigmoid colon	B	Poor	yes		0	NA	1.3×10^6
107	F	sigmoid colon	B	Poor	yes		512	IgG1	1.7×10^6
149	M	rectum	C	Moderate	yes		1024	IgG1	1.6×10^7
163	M	sigmoid colon	B	Poor	yes		8192	IgG1	4.5×10^7
357	F	rectum	C	Moderate	no		512	IgG1	2.4×10^7
790	M	sigmoid colon	C	Moderate	yes		16384	IgG1	3.0×10^7

【表II】

表 I I : 最も相同な生殖系配列をヌクレオチド突然変異の数と共に示す。

クローン数	VH 遺伝子	D 遺伝子	J 遺伝子	V領域におけるヌクレオチド突然変異*	VK 遺伝子ファミリー	J 遺伝子	V領域におけるヌクレオチド突然変異*
163.16	DP-7	ND	JH4b	43/294 (14.6)	DPK24	JK2	10/305 (3.2)
163.23	DP-7	ND	JH4b	43/294 (14.6)	DPK24	JK2	10/305 (3.2)
163.22	DP-7	ND	JH4b	44/294 (15)	DPK24	JK2	11/305 (3.6)
163.1	DP-7	ND	JH4b	44/294 (15)	DPK24	JK2	11/305 (3.6)
163.15	DP-7	ND	JH4b	45/294 (15.3)	DPK24	JK4	3/305 (1)
163.20	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.5	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	18/305 (5.9)
163.7	DP-7	ND	JH4b	51/294 (17.3)	DPK24	JK4	7/305 (2.3)
163.6	DP-7	ND	JH4b	51/294 (17.3)	DPK24	JK4	6/305 (2)
163.9	DP-7	ND	JH4b	50/294 (17)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.2	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK4	4/305 (1.3)
163.14	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.24	DP-7	ND	JH4b	54/294 (18.5)	DPK24	JK2	0/305 (0)
163.17	DP-7	ND	JH4b	54/294 (18.5)	DPK24	JK4	2/294 (0.6)

* V領域におけるヌクレオチド突然変異の数/ヌクレオチドの全数 (%)

【表III A】

表III A：可変遺伝子突然変異分析：各重鎖遺伝子のFRおよびCDR領域1および2における置換（R）およびサイレント（S）突然変異の全数

クローン 数	R 突然変異 の全数	FRR 突然変異 (予測)	CDRR 突然変異 (予測)	FR R : S 比	CDR R : S 比	[*] p(FR)	[*] p (CDR)
163.16	35	15 (23.12)	8 (7.13)	15:8	8:2	0.02	0.13
163.23	35	15 (21.34)	8 (6.40)	15:8	8:2	0.02	0.13
163.22	36	15 (21.34)	8 (6.58)	15:8	8:3	0.01	0.13
163.1	36	15 (21.34)	8 (6.58)	15:8	8:3	0.01	0.13
163.15	37	15 (21.94)	8 (6.76)	15:9	8:3	0.01	0.14
163.20	38	16 (21.34)	7 (6.95)	16:9	7:6	0.01	0.16
163.5	38	16 (22.53)	7 (6.9)	16:9	7:6	0.01	0.16
163.17	39	16 (23.12)	7 (7.13)	16:10	7:6	0.01	0.16
163.6	36	16 (21.34)	7 (6.58)	16:9	7:6	0.03	0.16
163.9	37	16 (21.94)	7 (6.77)	16:8	7:6	0.02	0.16
163.2	36	16 (22.53)	7 (6.58)	16:9	7:6	0.03	0.16
163.14	36	16 (21.34)	7 (6.58)	16:9	7:6	0.03	0.16
163.24	42	19 (24.90)	8 (7.68)	19:8	8:5	0.02	0.15
163.17	39	16 (23.14)	5 (7.13)	16:9	7:6	0.01	0.16

* 影をつけた領域はR突然変異の非ランダム分布を持つクローンを示す。

【表III B】

表I I I B : 可変遺伝子突然変異分析 : 各軽鎖遺伝子のFRおよびCDR
領域1および2における置換 (R) およびサイレント (S) 突然変異の全数

クローン 数	Rおよび S 突然変異 の全数	FRR 突然変異 (予測)	CDRR 突然変異 (予測)	FR R:S 比	CDR R:S 比	* p (FR)	* p (CDR)
163.16	6	0 (1.97)	4 (1.05)	0:2	4:0	0.04	0.09
163.23	6	0 (2.55)	4 (2.05)	0:2	4:0	0.04	0.09
163.22	7	1 (2.97)	5 (2.38)	2:0	5:1	0.07	0.07
163.1	7	1 (2.98)	5 (2.38)	1:1	5:1	0.07	0.07
163.15	2	0 (0.85)	1 (0.68)	0:0	1:1	0.33	0.44
163.20	10	3 (4.25)	7 (3.41)	3:3	2:2	0.19	0.19
163.5	13	6 (5.53)	2 (4.43)	6:3	2:2	0.21	0.09
163.17	5	3 (1.70)	1 (1.36)	1:0	2:2	0.32	0.30
163.6	4	1 (1.70)	1 (1.36)	1:0	1:2	0.32	0.30
163.9	11	5 (4.68)	2 (3.75)	5:4	2:0	0.23	0.15
163.2	2	0 (0.85)	1 (0.68)	0:0	1:1	0.33	0.45
163.14	11	5 (4.68)	2 (3.75)	5:4	2:0	0.23	0.15
163.24	0	0 (0)	0 (0)	0:0	0:0	1	1
163.17	2	0 (0.85)	1 (0.68)	1:1	0:0	0.33	0.44

* 影をつけた領域はR突然変異の非ランダム分布を持つクローンを示す。

【表IVA】

表I V A : プライマー

プライマー	配列	アニーリング部位
VH1a	5'-CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGG-3'	5' V FR1 of VH1 family
VH3a	5'-GAG GTG CAG CTC GAG GAG TCT GGG-3'	5' V FR1 of VH3 family
VH1f	5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG-3'	5' V FR1 of VH1 family
VH2f	5'-CAG GTG CAG CTA CTC GAG TCG GG- 3'	5' V FR1 of VH2 family
VH3f	5'-GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG-3'	5' V FR1 of VH3 family
VH4f	5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG- 3'	5' V FR1 of VH4 family
VH5f	5'-GAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGA-3'	5' V FR1 of VH5 family
VH6f	5'-CAG GTA CAG CTG CTC GAG TCA GGT CCA-3'	5' V FR1 of VH6 family
CG1Z	5'-GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG -3'	3' primer, γ 1 hinge region (reverse transcription primer)
CG2Z	5'-CGG TGG ACT AGT GAC ACA ACA TTT GCG	3' primer, γ 2 hinge region (reverse transcription primer)
CG3Z	5'-TGG GCA ACT AGT GCA TGT GTG AGT TGT G	3' primer, γ 3 hinge region (reverse transcription primer)
CG4Z	5'-TGG GCA ACT AGT GCA TGG GGG ACC ATA TTT GGA	3' primer, γ 4 hinge region (reverse transcription primer)

ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子の逆転写および増幅で用いるプライマー。
太線の核酸残基は制限酵素部位を表す。

【表IVB】

表IVB: プライマー

プライマー	配列	アニーリグ部位
VK1a	5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CCA-3'	5' V FR1 of V κ 1 family
VK2a	5'-GAT ATT GAG CTC ACT CAG TCT CCA-3'	5' V FR1 of V κ 2 family
VK3a	5'-GAA ATT GAG CTC ACG CAG TCT CCA-3'	5' V FR1 of V κ 3 family
CK1Z	5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CCG GCG AAC TCA G-3'	3' primer, 3' end of κ light chain (reverse transcription primer)
CL2	5'-cgc cgt cta gaa cta tga aca ttc tgt agg	3' primer, 3' CL region of human lambda light chain (reverse transcription primer)
VL1-2	5'-CAG TCT GAG CTC ACT CAG CCR CCC	FR1 of human lambda light chain VL1 and VL2 families
VL3	5'-TCC TAT GAG CTC ACT CAG	FR1 of human lambda light chain VL3 family
VL4-5-9	5'-CAG CCT GAG CTC ACT CAG	FR1 of human lambda light chain VL4, VL5 and VL9 families
VL6	5'-AAT TTT GAG CTC ACT CAG CCC	FR1 of human lambda light chain VL6 family
VL7	5'-CAG GCT GAG CTC ACT CAG GAG	FR1 of human lambda light chain VL7 family
VL8	5'-CAG ACT GAG CTC ACC CAG GAG	FR1 of human lambda light chain VL8 family
VL10	5'-CAG GCA GAG CTC ACT CAG CCA	FR1 of human lambda light chain VL10 family

ヒト κ 軽鎖免疫グロブリン遺伝子の逆転写および増幅で用いるプライマー。
太線の核酸残基は制限酵素部位を表す。

【表V】

表V：個々の配列の同定

配列番号	クローン	タイプ	軽鎖または重鎖
1	163.1	DNA	Light
2	163.1	DNA	Heavy
3	163.2	DNA	Light
4	163.2	DNA	Heavy
5	163.5	DNA	Light
6	163.5	DNA	Heavy
7	163.6	DNA	Light
8	163.6	DNA	Heavy
9	163.7	DNA	Light
10	163.7	DNA	Heavy
11	163.9	DNA	Light
12	163.9	DNA	Heavy
13	163.14	DNA	Light
14	163.14	DNA	Heavy
15	163.15	DNA	Light
16	163.15	DNA	Heavy
17	163.16	DNA	Light
18	163.16	DNA	Heavy
19	163.17	DNA	Light
20	163.17	DNA	Heavy
21	163.20	DNA	Light
22	163.20	DNA	Heavy
23	163.22	DNA	Light
24	163.22	DNA	Heavy
25	163.23	DNA	Light
26	163.23	DNA	Heavy
27	163.24	DNA	Light
28	163.24	DNA	Heavy
29	1159.8	DNA	Light
30	1159.8	DNA	Heavy
31	163.1	Amino acid	Light
32	163.1	Amino acid	Heavy
33	163.2	Amino acid	Light
34	163.2	Amino acid	Heavy
35	163.5	Amino acid	Light

1. Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*. 253:49
2. Pavletich, N. P., K. A. Chambers, C. O. Pabo: 1993. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes & Development* 7:2556
3. Vogelstein, B., K. W. Kinzler. 1992. p53 function and dysfunction. *Cell*. 70:523.
4. Winter, S. F., J. D. Minna, B. E. Johnson, T. Takahashi, A. F. Gazdar, D. P. Carbone. 1992. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Research*. 52:4168
5. Abrams, P. G., J. L. Rossio, H. C. Stevenson, K. A. Foon. 1986. Optimal strategies for developing human-human monoclonal antibodies. *Methods in Enzymology* 121:107.
6. Clark, M. A., N. J. Hawkins, A. Papaioannou, R. J. Fiddes, R. L. Ward. 1997. Isolation of Human Anti-C-ErbB-2 Fabs From a Lymph Node-Derived Phage Display Library. *Clinical & Experimental Immunology*. 109:166

7. Coomber, D., N.J. Hawkins, M. Clark, A. Meagher, R.L. Ward. 1996. Characterisation and Clinicopathological Correlates of Serum Anti-P53 Antibodies in Breast and Colon Cancer. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*. 122:757
8. Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162:156
9. Ward, R.L. M.A. Clark, J. Lees. N.J. Hawkins. 1996. Retrieval of Human Antibodies From Phage-Display Libraries Using Enzymatic Cleavage. *Journal of Immunological Methods*. 189:73
10. Nissim, A., H.R. Hoogenboom, I.M. Tomlinson, G. Flynn. C. Midgley, D. Lane, G. Winter. 1994. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *Embo Journal*. 13:692
11. Chang, B., P. Casali. 1994. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today*. 15:367
12. Hengen, P.N. 1995. Fidelity of DNA

polymerases for PCR. Trends in Biochemical Sciences 20:324

13. Lubin, R., B. Schlichtholz, D. Bengoufa, G. Zalcmann, J. Tredaniel, A. Hirsch, C.C. de Fromental, C. Preudhomme, P. Fenaux, G. Fournier, et al. 1993. Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on primary structure and exposure on protein surface. Cancer Research. 53: 5872

14. Soussi T., P May. 1996 Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. J Mol Biol 260:623

15. Ko. L. J. C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm Genes Dev. 10:1054

16. Nagesha H.S., M. Yu and L.F. Wang, 1996, Application of linker-ligation-PCR for construction of phage display epitope libraries, Journal of Biological Methods. 60, 147-54

17. Petersen G.D. Song, B. Hügler-Dorr. I. Oldenburg and E.K. Bautz; 1995, Mapping of linear epitopes recognized by monoclonal antibodies with gene-fragment phage display libraries. Mol Genet, 249. 425-31

18. Smith G.P., 1985, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, Science, 228, 1315-7

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> St Vincent's Hospital Sydney Limited; Robyn Lynne Ward; David William John Coomber

<120> Anti-p53 Antibodies

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<160> 60

<210> 1

<211> 339

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

ggg ggc gag ctc acc cag tcc cca gac tcc ctg gct ggg tct ctg 45

ggc gag agg gcc acc atc aac tgc sag tcc aac cag agt gtt tta 90

tac aac tcc aac agt aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135

cca gga cag cct cct aaa ctg ccc att tac tgg gcg tcc acc cgg 180

gaa tcc ggg gtc cct gac cga tcc agt ggc age ggg tct ggg aca 225

gat ttc act ccc acc atc acc age ctg cag gct gaa gat gtg gca 270

gtt tac tac tgt cag caa tac tct agt tct ccc tac acc tcc ggc 315

cag ggg acc aag ctg gaa atc aaa 339

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 2

<211> 342

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

```
gtg cag ctg ctc gag cag tct ggg gct gaa atg aag agg cct ggg 45
gcc tgg gtg acg att tcc tgt cag gcc tct cga caa acc ttc agc 90
ggc cag tat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 135
gag tgg atg gga gtg atc aat cct agt ggt gga agc gca aac tac 180
gcg ccg agt ttc cag ggc aga ctc agc atg tcc agg gac gcg tcc 225
acg aac aca gtg tac atg aaa ttg agc agc ctg aca tcc gaa gac 270
acg gcc gtg tat tac tgt ctt tca cag gcc ctg aag tat tgg ggc 315
cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342
```

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 3

<211> 339

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

```
gcg gcc gag ctc acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 45
ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta 90
tac agc tcc aac aat aag aac tac tca gcc tgg tac cag cag aaa 135
cca gga cag cct cct aag ctg ccc att tac tgg gca tct acc cgg 180
gaa tcc ggg gtc cct gac cga tcc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
gat tcc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca 270
gtt tat tac tgc caa caa tac tct agt acc cca ctc act ttc ggc 315
gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 339
```

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 4

<211> 342

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

```

cag ccc ctc gag cag tcc gga gcc gag gcc aag agc ccc ggg gcc 45
tgg ggg aca att tcc tgc cgg gcc tcc cga caa gat tcc agc ggc 90
cag tac acc cac tgg ggg gga cag gcc ccc gga caa ggg ttt gag 135
tgg atg gga ata atc aat ccc agt ggt gga agt gca aac tac gcg 180
cgg aaa ttc aag ggc aga ctc acc acg tcc agg gac tgg tcc acg 225
gac aca gtt tac atg acc tgg acc agc cgg aca tcc gaa gac acg 270
ccc gcc tat tat tgc ctc tta cag gcc cgg aaa cat tgg ggc cag 315
gga acc ctg gcc gcc gtc tcc tca gcc 342

```

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 5

<211> 339

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

```
ggg gcc gag ctc acc cag tct cca gat tcc ctg gcc gcg gcc ctg 45
ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agt cag agt gtt tta 90
cac agc ctc aac aat aag aac tac ttg gcc tgg tac cag cag aaa 135
cca gga cag cct cct aag cta cct att cac tgg gca cct acc cgg 180
gaa tcc ggg gcc cct gac cga cct agt ggc agc ggg ccc gag aca 225
gat tcc act ctc acc atc agc agc ctg cag gcc gag gat gtg gca 270
gtt tat tac tgc cag caa cac cat acc acc cgg tac acc tct ggc 315
cag ggg acc aag ctg gag acc aag 339
```

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 6

<211> 360

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

```
gtg cag ctg ctg gag cag tcc gga gct gag gtg aag agg cct ggg 45
goc tgg gtg aca att tcc tgg cag gcc ttt cga caa gat ttc agc 90
ggc cag tat acc cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ttt 135
gag tgg atg gga ata acc aat cct agt ggt gga agt gca aac tac 180
gcg cgg aaa ttc aag gcc aga ctc acc atg tcc agg gac tcg tcc 225
acg gac aca gtt tac atg acc tgg acc agc ctg aca tcc gaa gac 270
acg gcc gtc cac tac tgg ctc tca cag gcc ctg aaa cac tgg ggc 315
cag gga acc cgg gtc gcc gtc tcc tca 360
```

<130> 451541

<150> PF9321

<151> 19 March 1999

<210> 7

<211> 339

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

```

ggg gcc gag ctc acc cag ttc cca gag tcc ctg gct ggg tct ctg 45
ggc gag agg gcc acc att aat tgc aag tcc agc cag agc gtc tta 90
cac agc tcc aac aat aag aac cac tca gcc tgg tac cag cag aaa 135
cca gga cag cct cct aag ctg ccc att tac tgg gca tct acc cgg 180
gaa tcc ggg gcc cct gac cga tcc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
gat ttc act ctc acc acc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca 270
gtc tat tac tgc caa caa tat ttt agc acc cca ctg acc tcc ggc 315
gga ggg acc aag gtg gag att aaa 339

```

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 8

<211> 342

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

```

ggg cag cag ccc gag cag ccc ggg gcc gag ggc aag agg cct ggg 45
gcc ccg gtc aca acc tcc gcc cag gcc ccc gga caa gat ttc agc 90
ggc cag tat att cat tgg ggc cga cag gcc cct gga caa ggg ttt 135
gag ccg atg gga ata acc aat ccc agc gcc gga agt gca aac tac 180
ggc ccg aaa tcc aag gcc aga ccc acc atg tcc agg gac tcg tcc 225
acc gac aca gct tac atg acc ccg acc agc ccg aca tcc gaa gac 270
acc gcc gcc tat tat tgc ccc cca cag gcc ccg aaa cat tgg ggc 315
cag gga acc ccg gtc gcc gcc tcc tcc 342

```

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 9

<211> 339

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

```

ggg gcc gag ccc acc cag tcc cca gag tcc ccg gcc ggg tct ctg 45
ggg gag agg gcc acc att aac tgc aag tcc agc cag agc gcc tta 90
tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gcc tgg tac cag cag aaa 135
cca gga cag cct cct aag ccg ccc att tac tgg gca tct acc cgg 180
gaa tcc ggg gcc cct gac cga tcc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
gat tcc act ccc acc atc agc agc ccg cag gcc gaa gat gtg gca 270
ggt tat tac tgc caa caa tat tct agt acc cca ctc act tcc ggc 315
tga ggg acc aag gtg gag acc aaa 339

```

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 10

<211> 342

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

```

gtg cag ctg ctc gag cag tct ggg gct gag gtg aag agg cct ggg 45
gcc tcg gtg aca att tcc tgc cag gcc tct cga caa gat ttc agc 90
ggc cag tat att cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ttt 135
gag tgg atg gga ata atc aat ccc agt ggt gga agt gca aac tac 180
gcg ccg aaa ttc aag ggc aga ctc acc atg tcc agg gac tgg tcc 225
acg gac aca gtt tac atg acc ttg acc agc ctg aca tcc gaa gac 270
acg gcc gtc tat tat tgc cct tca cag gcc ctg aaa cat tgg ggc 315
cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342

```

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 11
<211> 339
<212> DNA
<213> Human

<400> 11
 gcg gcc gag ctc acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 45
 ggg gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta 90
 tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135
 cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 180
 caa tcc ggt gtc cct gac cga ttc cgt ggc agc ggg tcc ggg aca 225
 gat ttc act ctc acc atc acc aac ctg cag gct gaa gat gcg gcg 270
 att tat tac tgt cag caa tat tat ggt act ccg tac act ttt ggc 315
 cag ggg acc aaa tta gag atc aaa 339

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 12
<211> 339
<212> DNA
<213> Human

<400> 12
 gtg cag ctg ctc gag cag tct ggg gct gag gtg aag agg cct ggg 45
 gcc tcg gtg aca att tcc tgc cag gcc tct cga caa gat ttc agc 90
 ggc cag tat att cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ttt 135
 gag tgg atg gga ata atc aat cct agc ggt gga agt gca aac tac 180
 gcg ccg aaa ttc aag ggc aga ctc acc atg tcc agg gac tcg tcc 225
 acg gac aca gtt tac atg acc ttg acc agc ctg aca tcc gaa gac 270
 acg gcc gtc tat tac tgc ctt tta cag gcc ctg aaa cat tgg ggc 315
 cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 339

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 13

<211> 339

<212> DNA

<213> Human

<400> 13

```

gcg gcc gag ctg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 45
ggg gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta 90
tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135
cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 180
caa tcc ggt gtc cct gac cga ttc cgt ggc agc ggg tcc ggg aca 225
gat ttc act ctg acc atc acc aac ctg cag gct gaa gat gcg gcg 270
att tat tac tgt cag caa tat ttt agt tca ccc tac act ttt ggc 315
cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 339

```

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 14

<211> 342

<212> DNA

<213> Human

<400> 14

```

gtg cag ctg ctg gag cag tct ggg gcc gag gtg aag agg cct ggg 45
gcc tcg gtg aca att tcc tgc cag gcc tct cga caa gat ttc agc 90
ggc cag tat att cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ttt 135
gag tgg atg gga ata atc aat cct agt ggt gga agt gcg ggc tac 180
gcg ccg aaa ttc aag ggc aga ctg acc atg tcc agg gac tcg tcc 225
acg gac aca gtt tac atg acc ctg acc agc ctg aca tcc gaa gac 270
acg gcc gtc tat tat tgc ctt tta cag gcc ctg aaa cat tgg ggc 315
cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342

```

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 15
<211> 339
<212> DNA
<213> Human

<400> 15
 ggg gcc gag ctc acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 45
 ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gct tta 90
 tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135
 cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 180
 gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
 gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca 270
 gtt tat tac tgt cag caa tac tat agg act cct ctc act ttc ggc 315
 gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 339

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 16
<211> 342
<212> DNA
<213> Human

<400> 16
 gtg cag ctg ctc gag cag tct ggg gcg gaa atg aag agg cct ggg 45
 gcc tgg gtg acg att tcc tgt cag gcc tct cga caa acc ttc agc 90
 ggc cag tat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 135
 gag tgg atg gga gtg atc aat cct agt ggt gga agc gca aac tac 180
 gcg ccg agt ttc cag ggc aga ctc agc atg tcc agg gac gcg tcc 225
 acg aac aca gtg tac atg aaa ttg agc agc ctg aca tcc gaa gac 270
 acg gcc gtg tat tac tgt ctt tca cag gcc ctg aag tat tgg ggc 315
 cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 17
<211> 339
<212> DNA
<213> Human

<400> 17
gcg gcc gag ctg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 45
ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc aac cag agt gtt tta 90
tac aat tcc aac agt aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135
cca gga cag ccc cct aaa ctt ctc att tac tgg gca tct acc cgg 180
gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
gat ttc act ctg acc acc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca 270
gtt tat tac tgt cag caa tat ttt agt act ccc tac act ttt ggc 315
cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 339

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 18
<211> 342
<212> DNA
<213> Human

<400> 18
gtg cag ctg ctg gag cag tct ggg gct gaa atg aag agg cct ggg 45
gcc tcg gtg acg att tcc tgt cag gcc tct cga caa acc ttc agc 90
ggc cag tat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 135
gag tgg atg gga gtg atc aac cct agt ggt gga agc gca aac tac 180
gcg ccg agt ttc cag ggc aga ctc agc atg tcc agg gac gcg tcc 225
acg aac aca gtg tac atg aaa ttc agc agc ctg aca tcc gaa gac 270
acg gcc gtg tat tac tgt ctt tca cag gcc ctg aag tat tgg ggc 315
cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 19
<211> 339
<212> DNA
<213> Human

<400> 19
 ggg gcc gag ctc acc cag cct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 90
 ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta
 tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135
 cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 180
 gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
 gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca 270
 gtt tat tac tgt caa caa tat cct agt act cca ctc act ttc ggc 315
 gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 339

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 20
<211> 342
<212> DNA
<213> Human

<400> 20
 gtg cag ctg ctc gag cag tct gga gct gag gtg aag agg cct ggg 45
 gcc tcg gtg aca att tcc tgc cgg gcc tct cga caa gat ttc agc 90
 ggc cag tat att cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ttt 135
 gag tgg atg gga ata atc aat cct agt ggt gga agt gca aac tac 180
 gcg ccg aaa ttc aag ggc aga ctc acc atg tcc agg gac tcg tcc 225
 acg gac aca gtt tac atg acc ttg acc agc ctg aca tcc gaa gac 270
 acg gcc gtc tat tat tgc ctt tta cag gcc ctg aaa cat tgg ggc 315
 cag gga acc ctg gtc gga ccg tct tca 342

<130> 451541
 <150> PP9321
 <151> 19 March 1999
 <210> 21
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 21
 gcg gcc gag ccc acc cag tct cca gat tcc ctg gct gtg gct ctg 45
 ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agt cag agt gtt tta 90
 tac agc ctc aac aat aag aac tac ttg gct tgg tac cag cag aaa 135
 cca gga cag cct cct aag cta ctc att cac tgg gca tct acc cgg 180
 gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct gag aca 225
 gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gag gat gtg gca 270
 gtt tat tac tgt cag caa tat tct agt tct ccc tac act ttt ggc 315
 cag ggg acc aag ctg gaa atc aaa 339

<130> 451541
 <150> PP9321
 <151> 19 March 1999
 <210> 22
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 22
 gtg cag ctg ctc gag cag tct ggg gct gag gtg aag agg cct ggg 45
 gcc tgg gtg aca att tcc tgc cag gcc tct cga caa gat ttc agc 90
 ggc cag tat att cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ttt 135
 gag tgg atg gga ata acc aat cct agt ggt gga agt gca aac tac 180
 gcg ccg aaa ttc aag ggc aga ctc acc atg tcc agg gac tgg tcc 225
 acg gac aca gtt tac atg acc ctg acc agc ctg aca tcc gaa gac 270
 acg gcc gtc tat tac tgc ctt tta cag gcc ctg aaa cat tgg ggc 315
 cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 23
<211> 339
<212> DNA
<213> Human

<400> 23
 gag gcc gag ctc acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 45
 ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc aac cag agt gtt tta 90
 tac aac tcc aac agt aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135
 cca gga cag cct cct aaa ctg ctc att tac tgg gcg tct acc cgg 180
 gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
 gat ttc act ctc acc atc acc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca 270
 gtt tat tac tgt cag caa tat ttc agt tct ccc tac act ttt ggc 315
 cag ggg acc aag ctg gaa atc aaa 339

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 24
<211> 342
<212> DNA
<213> Human

<400> 24
 gtg cag ctg ctc gag cag tct ggg gct gaa atg aag agg cct ggg 45
 gcc tgg gtg acg att tcc tgt cag gcc tct cga caa acc ttc agc 90
 ggc cag tat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 135
 gag tgg atg gga gtg acc aac cct agt ggt gga agc gca aac tac 180
 gcg ccg agt ttc cag ggc aga ctc agc atg tcc agg gac gcg tcc 225
 acg aac aca gtg tac atg aaa ttg agc agc ctg aca tcc gaa gac 270
 acg gcc gtg tat tac tgt cct tca cag gcc ctg aag tat tgg ggc 315
 cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 25
<211> 339
<212> DNA
<213> Human

<400> 25
gcg gcc gag ctc acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 45
ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc aac cag agt gtt tta 90
tac aat tcc aac agt aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135
cca gga cag cct cct aaa ctt ctc att tac tgg gca tct acc cgg 180
gaa tcc ggg gtc cct gac cga tcc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca 270
gtt tat tac tgt cag caa tat cct agt act ccc tac act ttt ggc 315
cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 339

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 26
<211> 342
<212> DNA
<213> Human

<400> 26
gtg cag ctg ctc gag cag tct ggg gct gaa atg aag agg cct ggg
gcc tgg gtg acg att tcc tgt cag gcc tct cga caa acc ttc agc 90
ggc cag tat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 135
gag tgg atg gga gtg atc aac cct agt ggt gga agc gca aac tac 180
gcg ccg agt ttc cag ggc aga ctc agc atg tcc agg gac gcg tcc 225
acg aac aca gtg tac atg aaa ctg agc agc ctg aca tcc gaa gac 270
acg gcc gtg tat tac tgt ctt tca cag gcc ctg aag tat tgg ggc 315
cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 27
<211> 339
<212> DNA
<213> Human

<400> 27
 ggg gcc gag ctc acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg .45
 ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta 90
 tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa 135
 cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 180
 gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca 225
 gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca 270
 gtt tat tac tgt cag caa tac tat agt act ccg tac act ttt ggc 315
 cag ggg acc aag ctg gag atc aag 339

<130> 451541

<150> PP9321
<151> 19 March 1999

<210> 28
<211> 342
<212> DNA
<213> Human

<400> 28
 gtg cag ctg ctc gag cag tct gga gct gag gtg aag agg cct ggg 45
 gcc tcg gtg aca att tcc tgc cag gcc tct cga caa aat ttc agc 90
 ggc cag tat att cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 135
 gaa tgg atg ggc ata atc aat cct agt ggc gga agt gca aac tac 180
 gcg ccg agg ttc aag ggc aga ctc tcc atg tcc agg gac tog tcc 225
 acg gac aca gct tac ttg aca tgg acc agc ctg aca tcc gaa gac 270
 acg gcc gtc tat ttc tgt ctt tta cag tcc ctg aaa cat tgg ggc 315
 cag gga acc ctg gtc gcc gtc tcc tca 342

<130> 451541
 <150> PP9321
 <151> 19 March 1999
 <210> 29
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 29
 gcg gcc gag ctc act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc atc cct 45
 gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg 90
 cat agg aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca 135
 ggg cag tct cca caa ctc ctg acc tat tgg ggt tct act cgg gcc 180
 tcc ggg gtc cct gac aga ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat 225
 ttt aca ctg aac atc aga aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt 270
 tat tat tgc atg caa ggt cta caa acc cca tac act ttc ggc gaa 315
 ggg acc aag gtg gag atc aaa 336
 <130> 451541
 <150> PP9321
 <151> 19 March 1999
 <210> 30
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 30
 gtg cag ctg ctc gag tct ggg gga ggc tta ata cag cca ggg cgg 45
 tcc ctg aga ctc tca tgc aca gcc tct gga ttc ccc ttt ggt gat 90
 tct gct atg acc tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag 135
 tgg gtg ggt ttc att aga agc aaa gct tat ggt gcg gca aca gca 180
 tac gcc gcg tct atg aaa ggc aga gct acc atc tca aga gat gat 225
 gcc aaa agt atc gcc tat ctg cac atg agc aca ctg aag atc gag 270
 gac aca gcc gtt tat ttc tgt agt aga gtg aaa gca ggg ggc cct 315
 gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 354

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 33

<211> 113

<212> Amino Acid

<213> Human

<400> 33

Ala Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu
 20 25 30

Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 35 40 45

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 65 70 75

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
 80 85 90

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly
 95 100 105

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 110

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 34

<211> 114

<212> Amino Acid

<213> Human

<400> 34

Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Gln Asp Phe Ser Gly
 20 25 30

Gln Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu
 35 40 45

Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Ala Asn Tyr Ala
 50 55 60

Pro Lys Phe Lys Gly Arg Leu Thr Met Ser Arg Asp Ser Ser Thr
 65 70 75

Asp Thr Val Tyr Met Thr Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr
 80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Leu Gln Ala Leu Lys His Trp Gly Gln
 95 100 105

Gly Thr Leu Val Ala Val Ser Ser Ala
 110

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 59

<211> 97

<212> Amino Acid

<213> Human

<400> 59

Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ile	Pro
1				5					10					15
Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu
				20					25					30
His	Arg	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro
				35					40					45
Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Thr	Arg	Ala
				50					55					60
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65					70					75
Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	Arg	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val
				65					70					75
Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Gly	Leu	Gln	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu
				80					85					90
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
				95										

<130> 451541

<150> PP9321

<151> 19 March 1999

<210> 60

<211> 118

<212> Amino Acid

<213> Human

<400> 60

Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Ile	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro	Phe	Gly	Asp
				20					25					30
Ser	Ala	Met	Thr	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
				35					40					45
Trp	Val	Gly	Phe	Ile	Arg	Ser	Lys	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala
				50					55					60
Tyr	Ala	Ala	Ser	Met	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp
				65					70					75
Ala	Lys	Ser	Ile	Ala	Tyr	Leu	His	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Ile	Glu
				80					85					90
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Arg	Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Pro
				95					100					105
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
				110					115					

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は直接的ELISAにおける変化させた濃度のp53に対するFabの反応性を示す。p53へのFab結合は $9E10$ で検出し、続いて、ヤギ抗-マウス特異的HRP結合抗体で検出した。抗-破傷風トキソイドは、破傷風トキソイドと反応したFabを用いた場合に得られたシグナルを示す。

【図2】 図2はELISAによって評価したFabと他の抗原との交差反応性を示す。(粗製細菌上清からの)結合Fabは $9E10$ 、続いて、ヤギ抗-マウス特異的HRP結合抗体で検出した。p53で得られたシグナルは他の抗原で観察されたのより4倍大きかった。

【図3】 (a)は細菌溶解物における組換えp53へのFabクローンの結合を示す。DO7の結合はHRP-ヤギ抗-マウスで検出した(レーン1)。ヒト-抗-p53Fab(163.1、5、17、24:レーン3-6)およびヒト抗-破傷風Fab(陰性対照:レーン2)は $9E10$ 、続いてHRP-ヤギ抗-マウス抗体で検出した。

図3(b)は、結直腸癌細胞系HT-29からの免疫沈殿の免疫ブロット分析を示す。免疫沈殿は、DO7陽性対照抗体(レーン2)、破傷風トキソイドと反応性のヒトFab抗体(レーン1)、クローン163.1、5、17、24(各々、レーン3-6)および溶解物単独を持つプロテインAからのFab(レーン7)を用いて行った。免疫沈殿および電気ブロットに続き、ブロットを、ヤギ抗p53抗体、続いて、HRP-結合ロバ抗-ヤギ抗体と共にインキュベートした。

【図4】 図4はp53と反応性の重鎖(4A)および軽鎖(4B)クローンの推定アミノ酸配列を示す。置換(上方の場合)およびサイレント突然変異(下方の場合)を最も相同の生殖系配列に関して示す。

【図5】 図5は哺乳動物発現ベクターのマップを示す。選択されたFabクローンの重鎖および軽鎖遺伝子を、各々、pG1D105のNot1およびSpe1およびpKN101のSal1およびXba1にクローンした。重鎖および軽鎖ベクターはネオマイシン抵抗性およびジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を含有し、これは、各々、抗生物質G418およびメトトレキセートに対する抵抗性を付与し、形質転換細胞の選択を可能とする。

【図6】 図6はクローンC4B4からの全抗-p53抗体の精製を示す10%PAGEを示す。分子量マーカーはゲルの左側に示し、右の矢印は重鎖および軽鎖の位置を示す。

【図7】 図7はELISAによって評価したC4B4およびDO7とp53および他の抗原との交差反応性を示す。C4B4はHRP結合ヤギ抗-ヒト特異的抗体で検出し、DO7はHRP結合ヤギ抗-マウス特異的抗体で検出した。HRP結合ヤギ抗-ヒトとの反応性は陰性対照として用いた。

【図8】 図8は結直腸癌細胞系HT-29、MCF-7およびMethAからの免疫沈殿の免疫ブロット分析を示す。免疫沈殿は精製されたC4B4および抗-p53モノクローナル抗体DO7を用いて行った。溶解物を含むプロテインA単独での免疫沈殿を陰性対照として用いた。免疫沈殿および電気ブロッティングに続き、ブロットを、ヤギ抗-p53抗体、続いてHRP結合ロバ抗-ヤギ-HRPと共にインキュベートした。C4B4との免疫沈殿の結果、DO7と同様の反応性のパターンが得られた。陰性対照では有意な反応性は観察されなかった。

【図9】 図9は単離されたp53遺伝子断片ペプチドの配列の整列を示す。特異的なヌクレオチド配列を持つ3つのファージクローンをp53の配列と比較した。断片のサイズは14ないし32アミノ酸の範囲であり、p53のアミノ末端における領域に対応した。

【図10】 図10はC4B4抗体を用いる結直腸腫瘍におけるp53染色の免疫組織化学的分析を示す。結合した抗体はHRP結合ヤギ抗-ヒト抗体で検出した。より大きなフレームは結直腸上皮(茶色に染まった領域)における陽性核染色を示し、他方、C4B4なしの組織の同様の領域はより小さなフレームで示し、これは、腫瘍組織(青色染色)のいずれかの核染色を示さない。

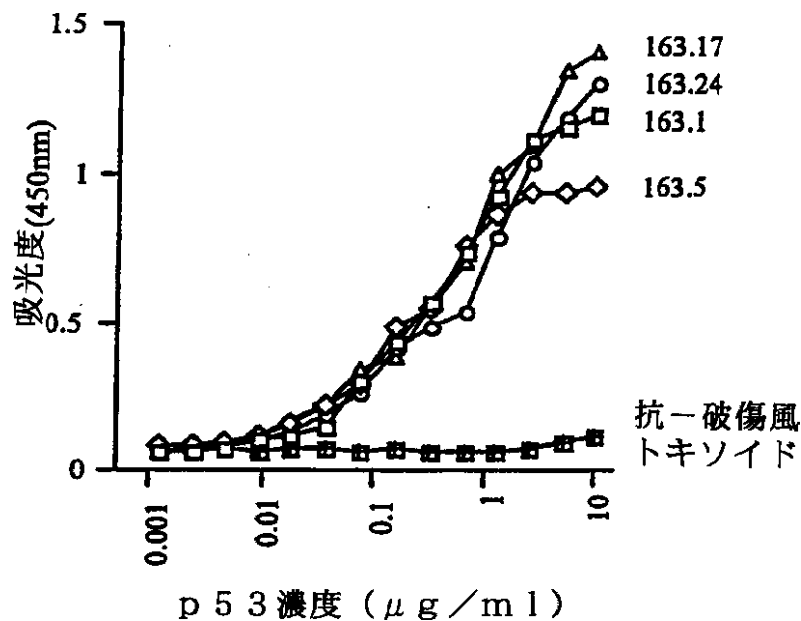
【図11】 図11は、全p53、p53の中央ドメインに対する変化させた濃度の1159.8の反応性を示す。p53へのFab結合は9E10、続いてアルカリ性ホスファターゼ結合ヤギ抗-マウス抗体で検出した。BSAに対する抗体の反応性は陰性対照として用いた。

【図12】 図12はELISAによって評価したFabと他の抗原との交

差反応性を示す。p53に対するFabの結合は 9×10^6 、続いてアルカリ性ホスファターゼ結合ヤギ抗マウス抗体で検出した。

【図13】 図13はFab1159.8および163.1を用いる全p53およびp53の中央ドメインの免疫検出を示す。4ないし20%のSDS-PAGEをPVDFに電気ブロットし、Fab1159.8および163.1、ならびに陽性対照ネズミモノクローナル抗体DO7およびPab240でプローブした。Fabはアルカリ性ホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトFab2特異的抗体で検出し、他方、ネズミ抗体はアルカリ性ホスファターゼ結合ヤギ抗マウス抗体で検出した。

【図1】



【 4 A 】

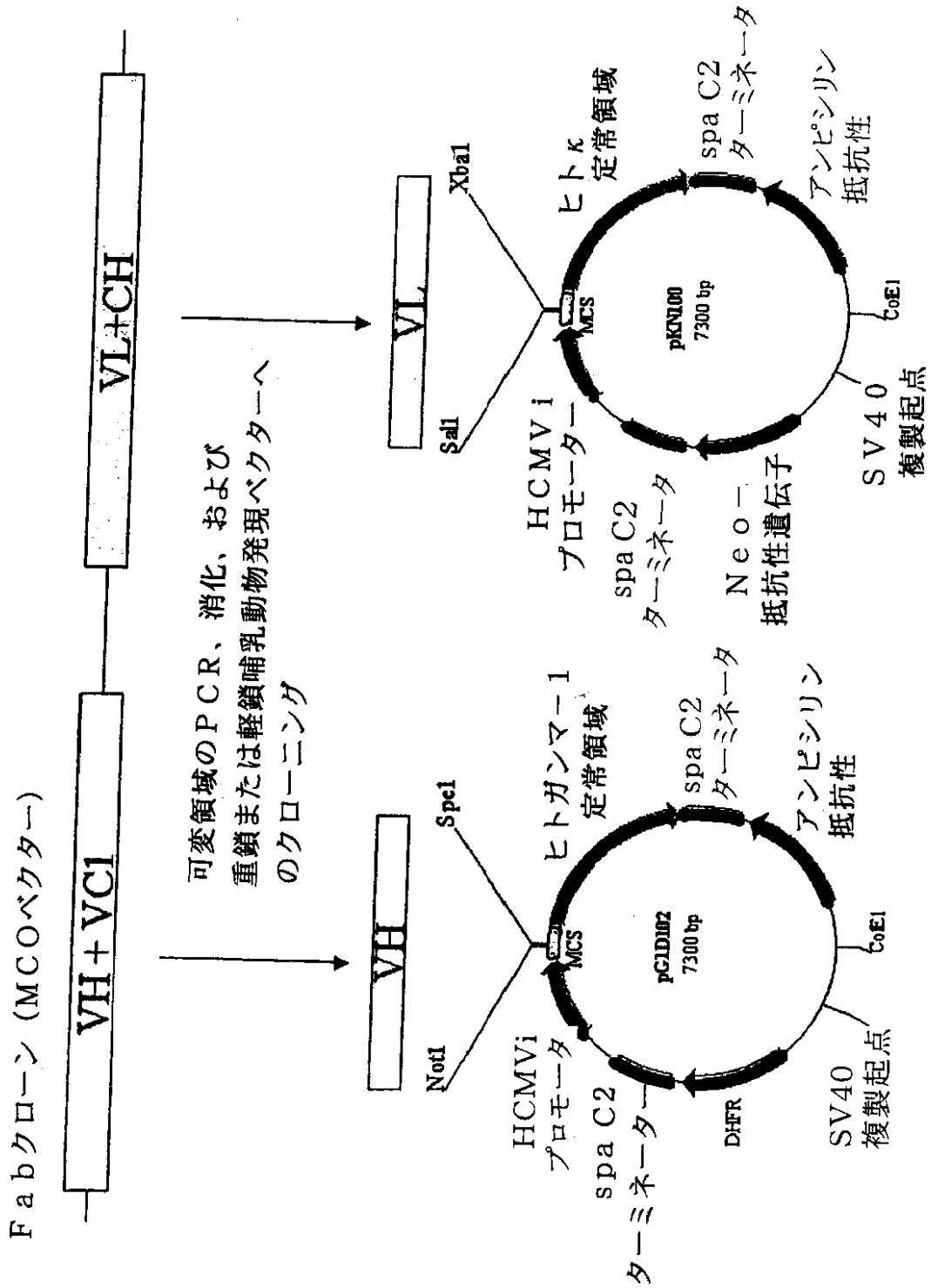
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4			
DP-7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCHASGYSITIS	S--YTHH	WYRQAFGGGLHWG	IINF--SGGSI	SYAQRQGG	RVYTRDITSTVYV	NELSSLRSEDTAVIYC	AR-YFDY	WGQGLTVIVSS	JH4B
163.22	VQL-E---em-R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-I-			V-n-----	g-AN-aps	LS-S-A-N-v-KI	Tse---	LSQALK		A---
163.15	VQL-E---em-R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-I-			V-n-----	g-AN-aps	LS-S-A-N-v-KI	Tse---	LSQALK		A---
163.16	VQL-E---em-R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-I-			V-n-----	g-AN-aps	LS-S-A-N-v-KI	Tse---	LSQALK		A---
163.23	VQL-E---em-R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-I-			V-n-----	g-AN-aps	LS-S-A-N-v-KI	Tse---	LSQALK		A---
163.1	VQL-E---em-R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-I-			V-n-----	g-AN-aps	LS-S-A-N-v-KI	Tse---	LSQALK		A---
163.9	VQL-E---em-R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-c	LIQALKH		A---
163.20	VQL-E-g---R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-c	LIQALKH		A---
163.1	VQL-E-g---R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-yc	LIQALKH		A---
163.5	VQL-E-g---R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-c	LIQALKH		A---
163.14	VQL-E-g---R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-c	LIQALKH		A---
163.2	VQL-E-g---R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-yc	LIQALKH		A---
163.6	VQL-E-g---R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-yc	LIQALKH		A---
163.24	VQL-E-g---R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-f	LIQALKH		A---
163.17	VQL-E-g---R---s-TI-cQa-RQ-S G-Q-Ih			n-----	gsAN-APK-K	L-S-S-D-v-TIT	Tse--v-yc	LIQALKH		GP---

【 4 A 】

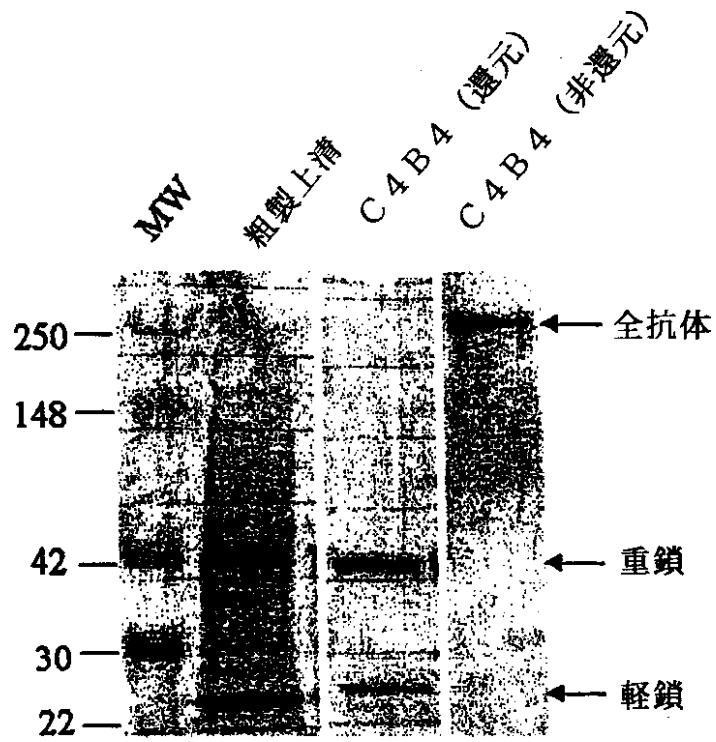
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DPK24	DI VMTQSPDLSAVSLGRRATINCK	SSQSVLYSSRNKNHTLA	WYQKRPQPPKLLY	WASTRES	GVPRFSQSGSGTDFLTITLTISSIQAEQVAVYIC	QOYIYTP	LT FQGGTKVBEIK JK4
163.15	AAEL					-y-R	
163.17	AAEL					F	
163.2	AAEL					q-F	
163.6	AAEL	-v				q-F	
163.7	AAEL	-v				q-F-R	YT FQGGTKVBEIK JK2
163.24	AAEL						
163.23	AAEL	-N	-S			F	
163.16	AAEL	-N	-S			F	
163.1	AAEL	-N	-S			F-S	
163.22	AAEL	-N	-S			F-S	
163.14	AAEL	-g				-TN	
163.9	AAEL	-g				-TN	
163.20	AAEL	-d	-A			-E	
163.5	AAEL	-d	-A			-E	

4B

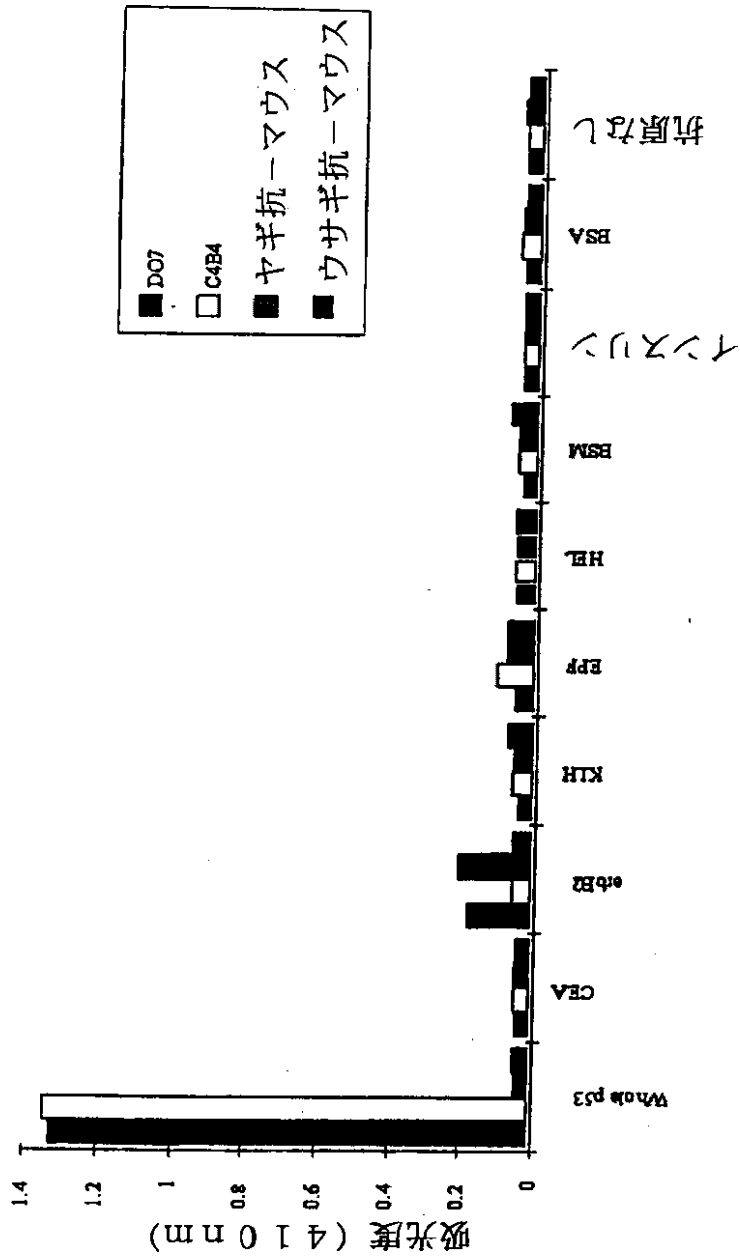
【図5】



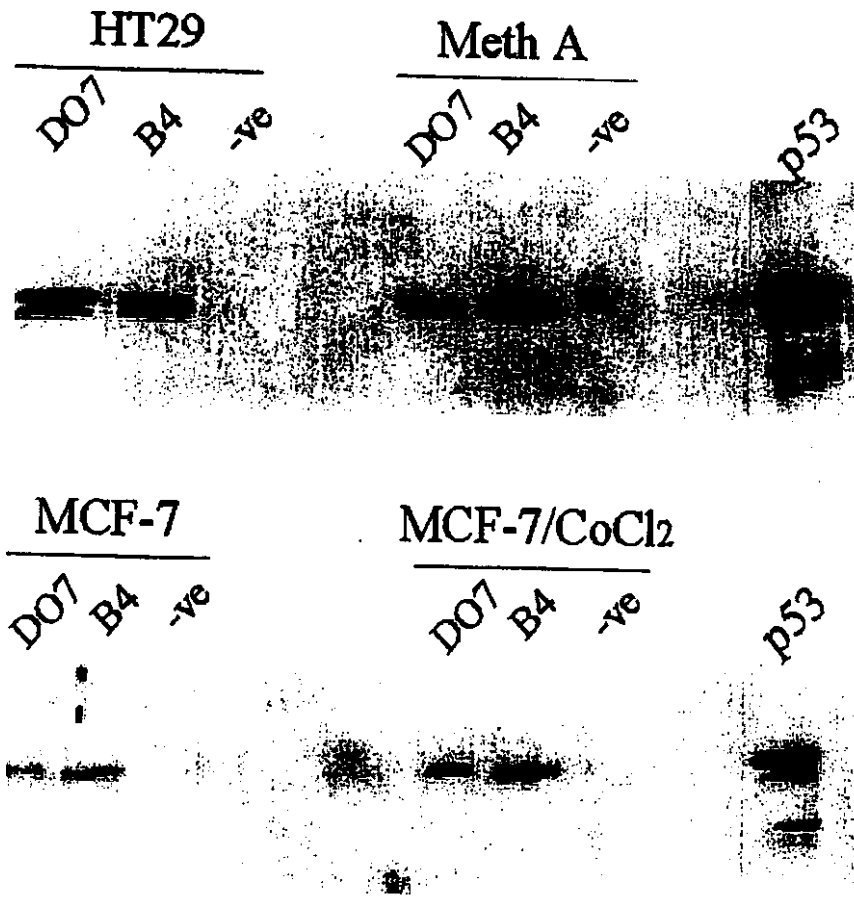
【圖6】



【図7】



【图8】



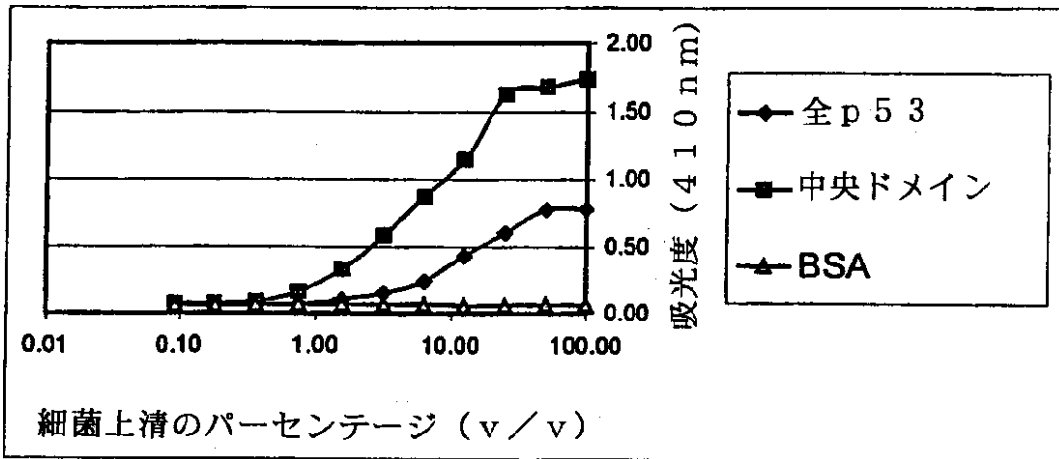
【图9】

p53 -SDLWKLLPENNVLSP LPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEA-
 20 30 40 50 60
 Clone 1 WKLLPENNVLSP LPSQAMDDLMLSPDDIEQWF
 Clone 7 SQAMDDLMLSPDDIEQWF
 Clone 34 DDIMLSPDDIEQWF

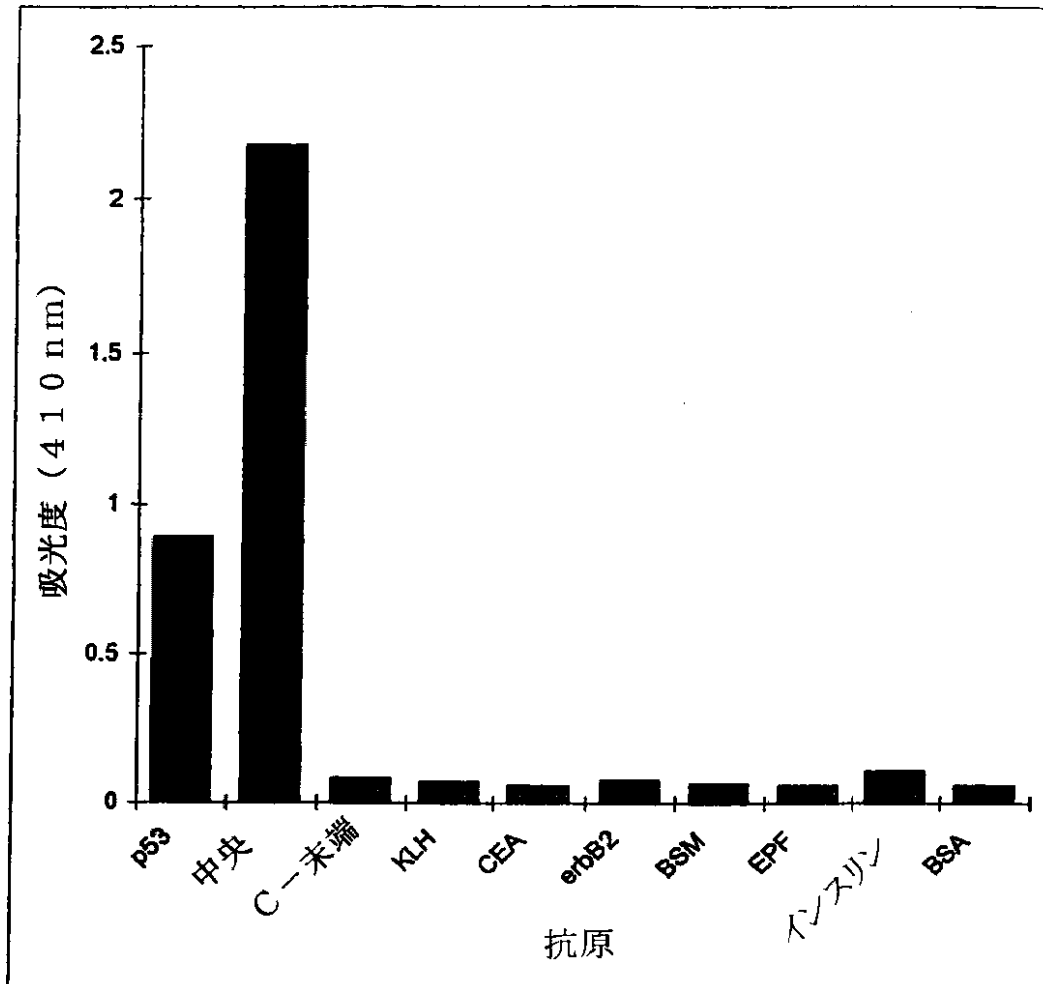
【图 10】



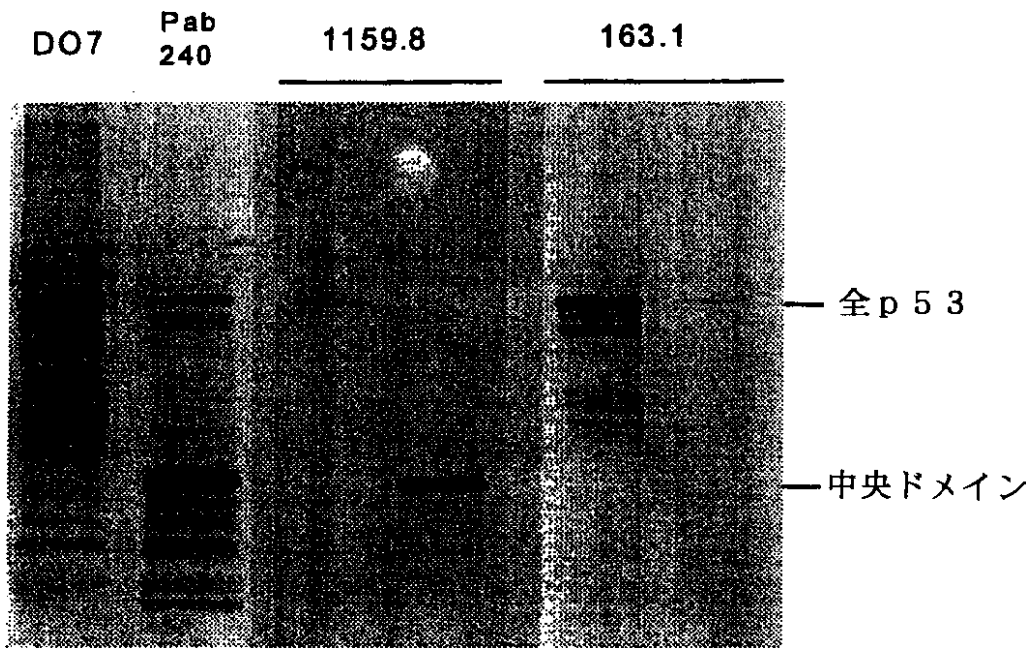
【図11】



【図12】



【図13】



【手続補正書】

【提出日】平成13年11月8日(2001.11.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0336

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0336】

本発明の抗体は、抗体（またはその断片）と同一の療法で有用であろうペプチドまたは非ペプチド化合物（ミメティックス）いずれかのデザインおよび合成で必要であろうことにも注意すべきである。

【表I】

62

表I：研究用に選択した患者の臨床的詳細、抗-p53血清力価および抗体ライブラリーサイズ

患者ID	性別	腫瘍の部位	Dukes 段階	分化の 程度	過剰発現 された p53の 検出	p53 突然 変異	抗-p53 力価 (IgG)	支配的 IgG アイソ タイプ	ライ ブラ リー サイ ズ
100	M	sigmoid colon	B	Poor	yes		0	NA	$1.3 \cdot 10^6$
107	F	sigmoid colon	B	Poor	yes		512	IgG1	$1.7 \cdot 10^6$
149	M	rectum	C	Moderate	yes		1024	IgG1	$1.6 \cdot 10^7$
163	M	sigmoid colon	B	Poor	yes		8192	IgG1	$4.5 \cdot 10^7$
357	F	rectum	C	Moderate	no		512	IgG1	$2.4 \cdot 10^7$
790	M	sigmoid colon	C	Moderate	yes		16384	IgG1	$3.0 \cdot 10^7$

【表II】

表 I I : 最も相同な生殖系配列をヌクレオチド突然変異の数と共に示す。

クローン 数	VH 遺伝子	D 遺伝子	J 遺伝子	V領域におけ るヌクレオチ ド突然変異*	VK 遺伝子 ファミリー	J 遺伝子	V領域におけ るヌクレオチ ド突然変異*
163.16	DP-7	ND	JH4b	43/294 (14.6)	DPK24	JK2	10/305 (3.2)
163.23	DP-7	ND	JH4b	43/294 (14.6)	DPK24	JK2	10/305 (3.2)
163.22	DP-7	ND	JH4b	44/294 (15)	DPK24	JK2	11/305 (3.6)
163.1	DP-7	ND	JH4b	44/294 (15)	DPK24	JK2	11/305 (3.6)
163.15	DP-7	ND	JH4b	45/294 (15.3)	DPK24	JK4	3/305 (1)
163.20	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.5	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	18/305 (5.9)
163.7	DP-7	ND	JH4b	51/294 (17.3)	DPK24	JK4	7/305 (2.3)
163.6	DP-7	ND	JH4b	51/294 (17.3)	DPK24	JK4	6/305 (2)
163.9	DP-7	ND	JH4b	50/294 (17)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.2	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK4	4/305 (1.3)
163.14	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.24	DP-7	ND	JH4b	54/294 (18.5)	DPK24	JK2	0/305 (0)
163.17	DP-7	ND	JH4b	54/294 (18.5)	DPK24	JK4	2/294 (0.6)

* V領域におけるヌクレオチド突然変異の数/ヌクレオチドの全数 (%)

【表 I I I A】

表 I I I A : 可変遺伝子突然変異分析 : 各重鎖遺伝子のFRおよびCDR領域1および2における置換 (R) およびサイレント (S) 突然変異の全数

クローン数	R突然変異の全数	FRR突然変異(予測)	CDRR突然変異(予測)	FR R:S比	CDR R:S比	p(FR) [*]	p(CDR) [*]
163.16	35	15 (23.12)	8 (7.13)	15:8	8:2	0.02	0.13
163.23	35	15 (21.34)	8 (6.40)	15:8	8:2	0.02	0.13
163.22	36	15 (21.34)	8 (6.58)	15:8	8:3	0.01	0.13
163.1	36	15 (21.34)	8 (6.58)	15:8	8:3	0.01	0.13
163.15	37	15 (21.94)	8 (6.76)	15:9	8:3	0.01	0.14
163.20	38	16 (21.34)	7 (6.95)	16:9	7:6	0.01	0.16
163.5	38	16 (22.53)	7 (6.9)	16:9	7:6	0.01	0.16
163.17	39	16 (23.12)	7 (7.13)	16:10	7:6	0.01	0.16
163.6	36	16 (21.34)	7 (6.58)	16:9	7:6	0.03	0.16
163.9	37	16 (21.94)	7 (6.77)	16:8	7:6	0.02	0.16
163.2	36	16 (22.53)	7 (6.58)	16:9	7:6	0.03	0.16
163.14	36	16 (21.34)	7 (6.58)	16:9	7:6	0.03	0.16
163.24	42	19 (24.90)	8 (7.68)	19:8	8:5	0.02	0.15
163.17	39	16 (23.14)	5 (7.13)	16:9	7:6	0.01	0.16

*影をつけた領域はR突然変異の非ランダム分布を持つクローンを示す。

【表 I I I B】

表 I I I B : 可変遺伝子突然変異分析 : 各軽鎖遺伝子のFRおよびCDR
領域1および2における置換 (R) およびサイレント (S) 突然変異の全数

クローン 数	Rおよび S 突然変異 の全数	FRR 突然変異 (予測)	CDRR 突然変異 (予測)	FR R:S 比	CDR R:S 比	* p(FR)	* p(CDR)
163.16	6	0 (1.97)	4 (1.05)	0:2	4:0	0.04	0.09
163.23	6	0 (2.55)	4 (2.05)	0:2	4:0	0.04	0.09
163.22	7	1 (2.97)	5 (2.38)	2:0	5:1	0.07	0.07
163.1	7	1 (2.98)	5 (2.38)	1:1	5:1	0.07	0.07
163.15	2	0 (0.85)	1 (0.68)	0:0	1:1	0.33	0.44
163.20	10	3 (4.25)	7 (3.41)	3:3	2:2	0.19	0.19
163.5	13	6 (5.53)	2 (4.43)	6:3	2:2	0.21	0.09
163.17	5	3 (1.70)	1 (1.36)	1:0	2:2	0.32	0.30
163.6	4	1 (1.70)	1 (1.36)	1:0	1:2	0.32	0.30
163.9	11	5 (4.68)	2 (3.75)	5:4	2:0	0.23	0.15
163.2	2	0 (0.85)	1 (0.68)	0:0	1:1	0.33	0.45
163.14	11	5 (4.68)	2 (3.75)	5:4	2:0	0.23	0.15
163.24	0	0 (0)	0 (0)	0:0	0:0	1	1
163.17	2	0 (0.85)	1 (0.68)	1:1	0:0	0.33	0.44

* 影をつけた領域はR突然変異の非ランダム分布を持つクローンを示す。

【表 I V A】

表I V A : プライマー

プライマー	配列	アニーリグ部位
VH1a	5'-CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGG-3'	5' V FR1 of VH1 family
VH3a	5'-GAG GTG CAG CTC GAG GAG TCT GGG-3'	5' V FR1 of VH3 family
VH1f	5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG-3'	5' V FR1 of VH1 family
VH2f	5'-CAG GTG CAG CTA CTC GAG TCG GG- 3'	5' V FR1 of VH2 family
VH3f	5'-GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG-3'	5' V FR1 of VH3 family
VH4f	5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG- 3'	5' V FR1 of VH4 family
VH5f	5'-GAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGA-3'	5' V FR1 of VH5 family
VH6f	5'-CAG GTA CAG CTG CTC GAG TCA GGT CCA-3'	5' V FR1 of VH6 family
CG1Z	5'-GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG -3'	3' primer, γ 1 hinge region (reverse transcription primer)
CG2Z	5'-CGG TGG ACT AGT GAC ACA ACA TTT GCG	3' primer, γ 2 hinge region (reverse transcription primer)
CG3Z	5'-TGG GCA ACT AGT GCA TGT GTG AGT TGT G	3' primer, γ 3 hinge region (reverse transcription primer)
CG4Z	5'-TGG GCA ACT AGT GCA TGG GGG ACC ATA TTT GGA	3' primer, γ 4 hinge region (reverse transcription primer)

ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子の逆転写および増幅で用いるプライマー。
太線の核酸残基は制限酵素部位を表す。

【表I V B】

表IVB: プライマー

プライマー	配列	アニーログ部位
VK1a	5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CCA-3'	5' VFR1 of V κ 1 family
VK2a	5'-GAT ATT GAG CTC ACT CAG TCT CCA-3'	5' VFR1 of V κ 2 family
VK3a	5'-GAA ATT GAG CTC ACG CAG TCT CCA-3'	5' VFR1 of V κ 3 family
CK1Z	5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CCG GCG AAC TCA G-3'	3' primer, 3' end of κ light chain (reverse transcription primer)
CL2	5'-cgc cgt cta gaa cta tga aca ttc tgt agg	3' primer, 3' CL region of human lambda light chain (reverse transcription primer)
VL1-2	5'-CAG TCT GAG CTC ACT CAG CCR CCC	FR1 of human lambda light chain VL1 and VL2 families
VL3	5'-TCC TAT GAG CTC ACT CAG	FR1 of human lambda light chain VL3 family
VL4-5-9	5'-CAG CCT GAG CTC ACT CAG	FR1 of human lambda light chain VL4, VL5 and VL9 families
VL6	5'-AAT TTT GAG CTC ACT CAG CCC	FR1 of human lambda light chain VL6 family
VL7	5'-CAG GCT GAG CTC ACT CAG GAG	FR1 of human lambda light chain VL7 family
VL8	5'-CAG ACT GAG CTC ACC CAG GAG	FR1 of human lambda light chain VL8 family
VL10	5'-CAG GCA GAG CTC ACT CAG CCA	FR1 of human lambda light chain VL10 family

ヒト κ 軽鎖免疫グロブリン遺伝子の逆転写および増幅で用いるプライマー。
太線の核酸残基は制限酵素部位を表す。

【表V】

表V：個々の配列の同定

配列番号	クローン	タイプ	軽鎖または重鎖
1	163.1	DNA	Light
2	163.1	DNA	Heavy
3	163.2	DNA	Light
4	163.2	DNA	Heavy
5	163.5	DNA	Light
6	163.5	DNA	Heavy
7	163.6	DNA	Light
8	163.6	DNA	Heavy
9	163.7	DNA	Light
10	163.7	DNA	Heavy
11	163.9	DNA	Light
12	163.9	DNA	Heavy
13	163.14	DNA	Light
14	163.14	DNA	Heavy
15	163.15	DNA	Light
16	163.15	DNA	Heavy
17	163.16	DNA	Light
18	163.16	DNA	Heavy
19	163.17	DNA	Light
20	163.17	DNA	Heavy
21	163.20	DNA	Light
22	163.20	DNA	Heavy
23	163.22	DNA	Light
24	163.22	DNA	Heavy
25	163.23	DNA	Light
26	163.23	DNA	Heavy
27	163.24	DNA	Light
28	163.24	DNA	Heavy
29	1159.8	DNA	Light
30	1159.8	DNA	Heavy
31	163.1	Amino acid	Light
32	163.1	Amino acid	Heavy
33	163.2	Amino acid	Light
34	163.2	Amino acid	Heavy
35	163.5	Amino acid	Light

配列番号	クローン	タイプ	軽鎖または重鎖
36	163.5	Amino acid	Heavy
37	163.6	Amino acid	Light
38	163.6	Amino acid	Heavy
39	163.7	Amino acid	Light
40	163.7	Amino acid	Heavy
41	163.9	Amino acid	Light
42	163.9	Amino acid	Heavy
43	163.14	Amino acid	Light
44	163.14	Amino acid	Heavy
45	163.15	Amino acid	Light
46	163.15	Amino acid	Heavy
47	163.16	Amino acid	Light
48	163.16	Amino acid	Heavy
49	163.17	Amino acid	Light
50	163.17	Amino acid	Heavy
51	163.20	Amino acid	Light
52	163.20	Amino acid	Heavy
53	163.22	Amino acid	Light
54	163.22	Amino acid	Heavy
55	163.23	Amino acid	Light
56	163.23	Amino acid	Heavy
57	163.24	Amino acid	Light
58	163.24	Amino acid	Heavy
59	1159.8	Amino acid	Light
60	1159.8	Amino acid	Heavy

文献

1. Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris. 1991. p53 mutations in human cancers. Science. 253:49
2. Pavletich, N. P. K. A. Chambers, C. O. Pabo: 1993. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. Genes & Development 7:2556
3. Vogelstein, B., K. W. Kinzler. 1992. p53

- function and dysfunction. *Cell*. 70:523.
4. Winter, S.F., J.D. Minna B.E. Johnson, T. Takahashi, A.F. Gazdar, D.P. Carbone. 1992. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Research*. 52:4168
5. Abrams, P.G., J.L. Rossio, H.C. Stevenson, K.A. Foon. 1986. Optimal strategies for developing human-human monoclonal antibodies. *Methods in Enzymology* 121:107.
6. Clark, M.A., N.J. Hawkins, A. Papaioannou, R.J. Fiddes, R.L. Ward. 1997. Isolation of Human Anti-C-ErbB-2 Fabs From a Lymph Node-Derived Phage Display Library. *Clinical & Experimental Immunology*. 109:166
7. Coomber, D., N.J. Hawkins, M. Clark, A. Meagher, R.L. Ward. 1996. Characterisation and Clinicopathological Correlates of Serum Anti-P53 Antibodies in Breast and Colon Cancer. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*. 122:757
8. Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by

acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry. 162:156

9. Ward, R. L. M. A. Clark, J. Lees. N. J. Hawkins. 1996. Retrieval of Human Antibodies From Phage-Display Libraries Using Enzymatic Cleavage. Journal of Immunological Methods. 189:73

10. Nissim, A., H. R. Hoogenboom, I. M. Tomlinson, G. Flynn. C. Midgley, D. Lane, G. Winter. 1994. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. Embryo Journal. 13:692

11. Chang, B., P. Casali. 1994. The CDR 1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. Immunol Today. 15:367

12. Hengen. P. N. 1995. Fidelity of DNA polymerases for PCR. Trends in Biochemical Sciences 20:324

13. Lubin, R., B. Schlichtholz, D. Bengoufa, G. Zalzman, J. Tredaniel, A. Hirsch, C. C. de Fromental. C. Preudhomme, P. Fenaux. G. Fournier, et al. 1993. Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on

primary structure and exposure on protein surface. Cancer Research. 53: 5872

14. Soussi T., P May. 1996 Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. J Mol Biol 260:623

15. Ko. L. J. C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm Genes Dev. 10:1054

16. Nagesha H. S., M. Yu and L. F. Wang, 1996, Application of linker-ligation-PCR for construction of phage display epitope libraries, Journal of Biological Methods. 60, 147-54

17. Petersen G. D. Song, B. Huggle-Dorr. I. Oldenburg and E. K. Bautz; 1995, Mapping of linear epitopes recognized by monoclonal antibodies with gene-fragment phage display libraries. Mol Gen Genet, 249. 425-31

18. Smith G. P., 1985, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, Science, 228, 1315-7

国際出願日における明細書の第68頁に記載の表Vの後半部分(配列番号第36から60)が欠落したため、正しい表と変更させていただきます。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU 00/0189
CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int Cl ⁷ : C07K 16/18, 16/44; C07H 21/04, 21/06, C12N 5/10, 15/63; C12Q 1/68; G01N 33/53; A61K 31/7052, 38/17, 39/395; A61P 37/02.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN (WPIDS): Keywords- p53, antibod?, immunoglob? ANGIS (BLASTP, FASTA): sequence ID No.s 31, 32, 59 and 60.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database Swiss-Prot, accession number P01625, 21 July 1996.	1-131
X	Database PIR, accession number s58207, 13 January 1996.	1-131
X	Proceedings of the National Academy of Sciences, Volume 94, 1997, M. Welschof et al., 'The Antigen-Binding Domain of a Human IgG-anti-F(ab') ₂ Autoantibody', pages 1902-1907 (see in particular page 1903, figure 2).	1-131
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex
* Special categories of cited documents:	"J" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A" Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 March 2000	Date of mailing of the international search report 19 APR 2000	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: (02) 6285 3929	Authorized officer MARIE-ANNE FAM Telephone No.: (02) 6283 2259	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU 00/00189

Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/15834 (Schering Corporation) 16 April 1998 (see the whole document).	1-131

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/AU 00/00189

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-131 (in Part) because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: The claims, as presently drafted, are exceedingly broad in scope and hence a complete search was not feasible for economic reasons. A search of the preferred embodiments, namely sequence ID No.s 1-60, also gave numerous answers. Consequently the documents cited in this report represent only a small selection of the relevant prior art.
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/AU 00/00189

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 98/15834	AU 45833/97
	BR 9712504
	CN 1240028
	EP 929811

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395	T 4 C 0 8 5
			48/00	4 C 0 8 7
	48/00		49/00	C 4 H 0 4 5
	49/00	A 6 1 P	9/00	
	51/00		19/02	
A 6 1 P	9/00		35/00	
	19/02	C 0 7 K	16/18	
	35/00		16/42	
C 0 7 K	16/18	C 1 2 N	1/15	
	16/42		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19		7/00	
	1/21	C 1 2 Q	1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/53	D
	7/00		33/577	B
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53	C 1 2 R	1:19	
	33/577		1:07	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 R	1:38	
(C 1 2 N	1/21		1:465	
C 1 2 R	1:19)	C 1 2 R	1:42	
(C 1 2 N	1/21		1:425	
C 1 2 R	1:07)	C 1 2 R	1:91	
(C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	15/00	Z N A C
C 1 2 R	1:38)		5/00	B
(C 1 2 N	1/21			C
C 1 2 R	1:465)	A 6 1 K	37/02	
(C 1 2 N	1/21		43/00	
C 1 2 R	1:42)		49/02	B
(C 1 2 N	1/21			C
C 1 2 R	1:425)			
(C 1 2 N	1/21			
C 1 2 R	1:91)			
(C 1 2 Q	1/68			
C 1 2 R	1:91)			

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

(72)発明者 クームバー, デイビッド, ウィリアム, ジョーン
オーストラリア国 ニューサウスウェールズ 2050, カンパーダウン, デニソン ストリート 145

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA45 CA04
DA02 DA05 DA06 DA07 DA08
DA09 DA12 EA04 GA11 HA12
HA15 HA17
4B063 QA19 QQ46 QR08 QR33 QR42
QR56 QS25 QS34 QX02
4B064 AG27 CA02 CA04 CA06 CA10
CA19 CA20 CC24 DA01 DA05
DA13 DA14
4B065 AA01X AA15X AA26X AA41X
AA46X AA48X AA72X AA90X
AA91X AA93X AA93Y AB01
BA02 CA44 CA45 CA46
4C084 AA02 AA07 AA12 AA13 BA02
CA17 MA52 MA55 ZA36 ZB15
ZB26
4C085 AA02 AA03 AA13 AA14 AA19
AA26 AA27 CC23 CC24 HH03
HH07 KA03 KA04 KA29 KB07
KB09 KB10 LL18
4C087 AA02 BC83 CA12 ZA36 ZB15
ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41
DA75 DA76 EA20 EA23 EA28
EA50 EA51 FA73

专利名称(译)	抗-p53抗体		
公开(公告)号	JP2002542768A	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2000606630	申请日	2000-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	圣仙Vin的悉尼医院有限公司		
申请(专利权)人(译)	圣Vinsentsu医院悉尼有限公司		
[标]发明人	ワードロビンリン クームバーデイビッドウィリアムジョーン		
发明人	ワード,ロビン,リン クームバー,デイビッド,ウィリアム,ジョーン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K49/00 A61K51/00 A61P9/00 A61P19/02 A61P35/00 A61P37/02 C07K16/18 C07K16/42 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12Q1/6883 C12R1/19 C12R1/91 G01N33/574 G01N33/577 C12R1/07 C12R1/38 C12R1/465 C12R1/42 C12R1/425		
CPC分类号	A61K48/00 A61K2039/505 A61P19/02 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/55 C12Q1/6883 C12Q2600/156 G01N33/57484		
FI分类号	A61K35/76 A61K39/00.G A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.N A61K39/395.T A61K48/00 A61K49/00.C A61P9/00 A61P19/02 A61P35/00 C07K16/18 C07K16/42 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08 C12R1/19 C12R1/07 C12R1/38 C12R1/465 C12R1/42 C12R1/425 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N5/00.C A61K37/02 A61K43/00 A61K49/02.B A61K49/02.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA07 4B024/DA08 4B024/DA09 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ46 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA04 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA15X 4B065/AA26X 4B065/AA41X 4B065/AA46X 4B065/AA48X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA12 4C084/AA13 4C084/BA02 4C084/CA17 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/ZA36 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C085/AA02 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/CC23 4C085/CC24 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085/KB07 4C085/KB09 4C085/KB10 4C085/LL18 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/ZA36 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA73		
优先权	1999PP9321 1999-03-19 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在脊椎动物中编码针对p53蛋白的抗体的多肽的核苷酸序列，以及由这些核苷酸序列编码的多肽和抗体（或其片段）。本发明还涉及在诊断和治疗组合物的开发中使用的核苷酸和多肽序列，以及表现出p53异常，类风湿性关节炎和其他疾病状态的癌症的诊断和治疗。一种使用组合物的方法。

クローン 数	VH 遺伝子	D 遺伝子	J 遺伝子	V領域におけ るヌクレオチ ド突然変異*	VK 遺伝子 ファミリー	J 遺伝子	V領域におけ るヌクレオチ ド突然変異*
163.16	DP-7	ND	JH4b	43/294 (14.6)	DPK24	JK2	10/305 (3.2)
163.23	DP-7	ND	JH4b	43/294 (14.6)	DPK24	JK2	10/305 (3.2)
163.22	DP-7	ND	JH4b	44/294 (15)	DPK24	JK2	11/305 (3.6)
163.1	DP-7	ND	JH4b	44/294 (15)	DPK24	JK2	11/305 (3.6)
163.15	DP-7	ND	JH4b	45/294 (15.3)	DPK24	JK4	3/305 (1)
163.20	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.5	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	18/305 (5.9)
163.7	DP-7	ND	JH4b	51/294 (17.3)	DPK24	JK4	7/305 (2.3)
163.6	DP-7	ND	JH4b	51/294 (17.3)	DPK24	JK4	6/305 (2)
163.9	DP-7	ND	JH4b	50/294 (17)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.2	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK4	4/305 (1.3)
163.14	DP-7	ND	JH4b	52/294 (17.7)	DPK24	JK2	14/305 (4.6)
163.24	DP-7	ND	JH4b	54/294 (18.5)	DPK24	JK2	0/305 (0)
163.17	DP-7	ND	JH4b	54/294 (18.5)	DPK24	JK4	2/294 (0.6)