

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 502028

(P2003 - 502028A)

(43)公表日 平成15年1月21日(2003.1.21)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-コード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 35/26	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/26		39/00	H 4 B 0 6 3
38/00		39/395	T 4 B 0 6 4
39/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
39/395		C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全114数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 500662(P2001 - 500662)

(86)(22)出願日 平成12年5月26日(2000.5.26)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月27日(2001.11.27)

(86)国際出願番号 PCT/US00/14845

(87)国際公開番号 W000/073338

(87)国際公開日 平成12年12月7日(2000.12.7)

(31)優先権主張番号 60/136,528

(32)優先日 平成11年5月28日(1999.5.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/137,048

(32)優先日 平成11年6月1日(1999.6.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 コリクサ コーポレイション
アメリカ合衆国 ワシントン 98104, シ
アトル, コロンビア ストリート 1124,
スイート 200

(72)発明者 ファンガー, ギャリー リチャード
アメリカ合衆国 ワシントン 98012, ミ
ル クリーク, 29ティーエイチ ドライブ
エスイー - 15906

(72)発明者 ヘンドリクソン, ロナルド シー .
アメリカ合衆国 ワシントン 98116, シ
アトル, エスダブリュー チャールズタウ
ン ストリート 4114

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌の治療、診断およびモニタリングのための組成物および方法

(57) 【要約】

乳癌の治療、診断およびモニタリングのための組成物および方法が開示される。組成物は、1以上のママグロビンエピトープ、またはそれに対する抗体もしくはT細胞を含み得、そして例えば、乳癌の予防および処置のために用いられ得る。サンプル中のママグロビンエピトープまたはそれに対する抗体もしくはT細胞の存在を検出することに基づく診断方法もまた提供される。患者の血液またはその画分中のママグロビンをコードするRNAを検出するための方法もまた提供される。これらの方法を用いて、乳癌の進行を検出および/またはモニタリングし得る。

名称	種	抗体-?	マスタグロビン	IHC	FACS	抗体-?
2SC11	マウス	Pro2	あり	あり**	n.d.	IDELKECFNQDTELNSVE
31A8	マウス	Pro2	あり	あり**	n.d.	ELLCEFDNATTTNAIDELK
8A1	マウス	Pro2-3	あり	n.d.	n.d.	TTNAIDELKECFNQ
14A12	マウス	Pro3	あり	n.d.	n.d.	ELLCEFDNATTTNAIDELK
6B12	マウス	Pro3	あり	n.d.	n.d.	ELLCEFDNATTTNAIDELK
2D1	マウス	Pro3	あり	n.d.	n.d.	SCHCYAGSGCPLELVISKTI
15D8	マウス	Pro3	あり	n.d.	n.d.	ELLCEFDNATTTNAIDELK
31-1H7	マウス	n.d.	あり	n.d.	n.d.	
197-1H11	マウス	Pro5	あり	n.d.	n.d.	SCHCYAGSGCPLELVISKTI
32-1G11	マウス	n.d.	あり	n.d.	n.d.	
3B-1A5	マウス	n.d.	あり	n.d.	n.d.	
9B-1F4	マウス	n.d.	あり	n.d.	n.d.	

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトママグロビンの少なくとも7個連続したアミノ酸残基を含む単離されたポリペプチドであって、該連続したアミノ酸残基は、I D E L K E C F L N Q T D E T L S N V E (P r o 2 ; 配列番号1) ; T T N A I D E L K E C F L N Q (P r o 2 - 3 ; 配列番号2) ; S Q H C Y A G S G C P L L E N V I S K T I (P r o 5 ; 配列番号3) ; E Y K E L L Q E F I D D N A T T N A I D (ペプチド5 A ; 配列番号4) および K L L M V L M L A (m g b 1 ; 配列番号5) からなる群より選択される配列内に存在し、そしてヒトママグロビンの30個以下連続した残基が、該ポリペプチド内に存在する、ポリペプチド。

【請求項2】 前記ポリペプチドが、ヒトママグロビンの少なくとも9個連続したアミノ酸残基を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 前記ポリペプチドが、ヒトママグロビンの少なくとも15個連続したアミノ酸残基を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 前記ポリペプチドが、アミノ酸配列 T T N A I D E L K E C F L N Q (P r o 2 - 3 ; 配列番号2) を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】 請求項1に記載のポリペプチドを、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて含む、薬学的組成物。

【請求項6】 請求項1に記載のポリペプチドを、免疫刺激物質と組み合わせて含む、ワクチン。

【請求項7】 前記免疫刺激物質がアジュバントである、請求項6に記載のワクチン。

【請求項8】 配列 T T N A I D E L K E C F L N Q (P r o 2 - 3 ; 配列番号2) を有するママグロビンエピトープに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項9】 請求項8に記載の抗体またはそのフラグメントを、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて含む、薬学的組成物。

【請求項10】 患者における乳癌の発達を阻害するための方法であって、有効量の請求項1に記載のポリペプチドを患者に投与し、それによって該患者に

における乳癌の発達を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項11】 患者における乳癌の発達を阻害するための方法であって、有効量の請求項8に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与し、それによって該患者における乳癌の発達を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項12】 患者における乳癌の存在または非存在を決定するための方法であって、以下の工程：

(a) 患者から得た生物学的サンプルを、請求項8に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；

(b) 該サンプル中の、該抗体またはその抗原結合フラグメントに結合するポリペプチドの量を決定する工程；および

(c) 該ポリペプチドの量を所定のカットオフ値に対して比較し、それにより、該患者における乳癌の存在または非存在を決定する工程を包含する、方法。

【請求項13】 前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 工程(b)が、結合したポリペプチドを、ママグロビンエピトープと特異的に結合する第2の抗体と接触させる工程を包含する、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 工程(b)がさらに、前記第2の抗体から得られたシグナルを標準曲線と比較する工程を包含する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 患者における乳癌の存在または非存在を決定するための方法であって、以下の工程：

(a) 患者から得られた生物学的サンプルを、請求項1に記載のポリペプチドと接触させる工程；

(b) 該サンプル中の、該ポリペプチドに結合する抗体の量を検出する工程；および

(c) 該抗体の量を所定のカットオフ値に対して比較し、それにより該患者における乳癌の存在または非存在を決定する工程を包含する、方法。

【請求項17】 患者における乳癌の進行をモニタリングするための方法であって、以下の工程：

(a) 第1の時点で患者から得られた生物学的サンプルを、請求項8に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；

(b) 該サンプル中の、該抗体またはその抗原結合フラグメントに結合するポリペプチドの量を検出する工程；

(c) その後の時点で該患者から得られた生物学的サンプルを用いて工程(a)および工程(b)を繰り返す工程：ならびに

(d) 工程(c)において検出されたポリペプチドの量を、工程(b)において検出された量に対して比較し、それにより、該患者における乳癌の進行をモニタリングする工程

を包含する、方法。

【請求項18】 前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 工程(b)が、結合したポリペプチドを、ママグロビンエピトープと特異的に結合する第2の抗体と接触させる工程を包含する、請求項17に記載の方法。

【請求項20】 工程(b)がさらに、前記第2の抗体から得られたシグナルを標準曲線と比較する工程を包含する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 患者における乳癌の進行をモニタリングするための方法であって、以下の工程：

(a) 第1の時点で患者から得られた生物学的サンプルを、請求項1に記載のポリペプチドと接触させる工程；

(b) 該サンプル中の、該ポリペプチドに結合する抗体の量を検出する工程；

(c) その後の時点で該患者から得られた生物学的サンプルを用いて工程(a)および工程(b)を繰り返す工程：ならびに

(d) 工程(c)において検出された抗体の量を、工程(b)において検出された量に対して比較し、それにより、該患者における乳癌の進行をモニタリングする工程

を包含する、方法。

【請求項22】 診断キットであって、以下：

(a) 1以上の請求項8に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント；および

(b) レポーター基を含む検出試薬を備える、キット。

【請求項23】 前記検出試薬が、ママグロビンに特異的に結合する抗体である、請求項22に記載のキット。

【請求項24】 診断キットであって、以下：

(a) 1以上の請求項8に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント；および

(b) 組換えママグロビンを備える、キット。

【請求項25】 前記抗体が固体支持体に固定されている、請求項22または24に記載のキット。

【請求項26】 前記固体支持体が、ニトロセルロース、ラテックスまたはプラスチック材料を含む、請求項25に記載のキット。

【請求項27】 前記検出試薬が、免疫グロブリン、抗免疫グロブリン、プロテインG、プロテインAまたはレクチンを含む、請求項22に記載のキット。

【請求項28】 前記レポーター基が、放射性同位体、蛍光基、発光基、酵素、ビオチンおよび色素粒子からなる群より選択される、請求項22に記載のキット。

【請求項29】 診断キットであって、以下：

(a) 1以上の請求項1に記載のポリペプチド；および

(b) レポーター基を含む検出試薬を備える、キット。

【請求項30】 前記ポリペプチドが、固体支持体に固定されている、請求項29に記載のキット。

【請求項31】 前記固体支持体が、ニトロセルロース、ラテックスまたは

プラスチック材料を含む、請求項30に記載のキット。

【請求項32】 前記検出試薬が、免疫グロブリン、抗免疫グロブリン、プロテインG、プロテインAまたはレクチンを含む、請求項29に記載のキット。

【請求項33】 前記レポーター基が、放射性同位体、蛍光基、発光基、酵素、ビオチンおよび色素粒子からなる群より選択される、請求項29に記載のキット。

【請求項34】 グリコシル化ママグロビンに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項35】 請求項34に記載の抗体またはそのフラグメントを、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて含む、薬学的組成物。

【請求項36】 患者における乳癌の発達を阻害するための方法であって、有効量の請求項34に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与し、それにより、該患者における乳癌の発達を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項37】 患者における乳癌の存在または非存在を決定するための方法であって、以下の工程：

(a) 患者から得た生物学的サンプルを、請求項34に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；

(b) 該サンプル中の、該抗体またはその抗原結合フラグメントに結合するポリペプチドの量を決定する工程；および

(c) 該ポリペプチドの量を所定のカットオフ値に対して比較し、それにより、該患者における乳癌の存在または非存在を決定する工程を包含する、方法。

【請求項38】 前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 工程(b)が、結合したポリペプチドを、ママグロビンエピトープと特異的に結合する第2の抗体と接触させる工程を包含する、請求項37に記載の方法。

【請求項40】 工程(b)がさらに、前記第2の抗体から得られたシグナルを標準曲線と比較する工程を包含する、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 患者における乳癌の進行をモニタリングするための方法であって、以下の工程：

(a) 第1の時点で患者から得られた生物学的サンプルを、請求項34に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；

(b) 該サンプル中の、該抗体またはその抗原結合フラグメントに結合するポリペプチドの量を検出する工程；

(c) その後の時点で該患者から得られた生物学的サンプルを用いて工程(a)および(b)を繰り返す工程：ならびに

(d) 工程(c)において検出されたポリペプチドの量を、工程(b)において検出された量に対して比較し、それにより、該患者における乳癌の進行をモニタリングする工程

を包含する、方法。

【請求項42】 前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 工程(b)が、結合したポリペプチドを、ママグロビンエピトープと特異的に結合する第2の抗体と接触させる工程を包含する、請求項41に記載の方法。

【請求項44】 工程(b)がさらに、前記第2の抗体から得られたシグナルを標準曲線と比較する工程を包含する、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 診断キットであって、以下：

(a) 1以上の請求項34に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント；および

(b) レポーター基を含む検出試薬を備える、キット。

【請求項46】 前記検出試薬が、ママグロビンに特異的に結合する抗体である、請求項45に記載のキット。

【請求項47】 診断キットであって、以下：

(a) 1以上の請求項34に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント；および

(b) 組換えママグロビン

を備える、キット。

【請求項48】 前記抗体が固体支持体に固定されている、請求項45または47に記載のキット。

【請求項49】 前記固体支持体が、ニトロセルロース、ラテックスまたはプラスチック材料を含む、請求項48に記載のキット。

【請求項50】 前記検出試薬が、免疫グロブリン、抗免疫グロブリン、プロテインG、プロテインAまたはレクチンを含む、請求項45に記載のキット。

【請求項51】 前記レポーター基が、放射性同位体、蛍光基、発光基、酵素、ビオチンおよび色素粒子からなる群より選択される、請求項45に記載のキット。

【請求項52】 生物学的サンプルから腫瘍細胞を除去するための方法であって、生物学的サンプルを、EYKELLQEFIDDNATTNAID（ペプチド5A；配列番号4）およびKLLMVLMLA（mg b 1；配列番号5）からなる群より選択されるママグロビンエピトープと特異的に反応するT細胞と接触させる工程を包含し、ここで、該接触させる工程が、該サンプルからのママグロビンまたはそのペプチドエピトープを発現する細胞の除去を可能にするに十分な条件下および時間にわたって行われる、方法。

【請求項53】 前記生物学的サンプルが、血液またはその画分である、請求項52に記載の方法。

【請求項54】 患者における乳癌の発達を阻害するための方法であって、請求項52に記載の方法に従って処理された生物学的サンプルを患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項55】 ママグロビンに特異的なT細胞を刺激および/または増加させるための方法であって、T細胞を、ヒトママグロビンの少なくとも7個でかつ30個以下連続したアミノ酸残基を含むペプチドと接触させる工程を包含し、ここで、該ペプチドが、配列EYKELLQEFIDDNATTNAID（ペプチド5A；配列番号4）またはKLLMVLMLA（mg b 1；配列番号5）を含み、該接触が、T細胞の刺激および/または増加を可能にするに十分な条件下

でおよび時間にわたって行われる、方法。

【請求項56】 前記ペプチドが、ヒトママグロビンの少なくとも9個連続した残基を含む、請求項55に記載の方法。

【請求項57】 前記ペプチドが、ヒトママグロビンの少なくとも15個連続した残基を含む、請求項55に記載の方法。

【請求項58】 請求項55に記載の方法に従って調製されたT細胞を含む、単離されたT細胞集団。

【請求項59】 患者における乳癌の発達を阻害するための方法であって、有効量の請求項58に記載のT細胞集団を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項60】 患者における乳癌の発達を阻害するための方法であって、以下の工程：

(a) 患者から単離されたCD4⁺および/またはCD8⁺のT細胞を、ヒトママグロビンの少なくとも7個でかつ30個以下連続したアミノ酸残基を含むペプチドと共にインキュベートし、その結果、T細胞が増殖する工程であって、ここで、該ペプチドが、配列EYKELLQEFIDDNATTNAID(ペプチド5A;配列番号4)またはKLLMVLMLA(mgb1;配列番号5)を含む、工程;および

(b) 有効量の該増殖したT細胞を該患者に投与し、それにより、該患者における乳癌の発達を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項61】 前記ペプチドが、ヒトママグロビンの少なくとも9個連続した残基を含む、請求項60に記載の方法。

【請求項62】 前記ペプチドが、ヒトママグロビンの少なくとも15個連続した残基を含む、請求項60に記載の方法。

【請求項63】 患者における乳癌の発達を阻害するための方法であって、以下の工程：

(a) 患者から単離されたCD4⁺および/またはCD8⁺のT細胞を、ヒトママグロビンの少なくとも7個でかつ30個以下連続したアミノ酸残基を含むペプ

チドと共にインキュベートし、その結果、T細胞が増殖する工程であって、ここで、該ペプチドが、配列EYKELLQEFIDDNATTNAID（ペプチド5A；配列番号4）またはKLLMVLMLA（mg b 1；配列番号5）を含む、工程；

（b）少なくとも1つの増殖した細胞をクローニングする工程；および

（c）該患者に有効量の該クローニングされたT細胞を投与し、それにより、該患者における乳癌の発達を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項64】 前記ペプチドが、ヒトママグロビンの少なくとも9個連続した残基を含む、請求項63に記載の方法。

【請求項65】 前記ペプチドが、ヒトママグロビンの少なくとも15個連続した残基を含む、請求項63に記載の方法。

【請求項66】 患者における乳癌の存在または非存在を決定するための方法であって、患者から得られた全血またはその画分のサンプル中のママグロビンmRNAのレベルを検出する工程を包含し、ここで上皮細胞が、該サンプルから除去されている、方法。

【請求項67】 ママグロビンRNAのレベルが、以下：

（a）前記サンプルを、ママグロビンをコードするポリヌクレオチドまたはその相補体にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させる工程；

（b）該サンプルにおいて、該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出する工程；および

（c）該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、所定のカットオフ値に対して比較し、それにより、該患者における乳癌の存在または非存在を決定する工程によって検出される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量が、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて決定される、請求項67に記載の方法。

【請求項69】 前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレ

オチドの量が、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて決定される、請求項67に記載の方法。

【請求項70】 患者における乳癌の進行をモニタリングするための方法であって、以下の工程：

(a) 患者から得られた全血またはその画分のサンプル中のママグロビンmRNAのレベルを検出する工程であって、ここで上皮細胞が、該サンプルから除去されている、工程；

(b) その後の時点で該患者から得たサンプルを用いて工程(a)を繰り返す工程；および

(c) 工程(b)において検出されたポリヌクレオチドの量を、工程(a)において検出された量と比較し、それにより、該患者における該癌の進行をモニタリングする工程

を包含する、方法。

【請求項71】 工程(a)が、以下：

(i) 患者から得られた生物学的サンプルを、ママグロビンポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させる工程；および

(ii) 該サンプル中の、該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出する工程

によって行われる、請求項70に記載の方法。

【請求項72】 前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量が、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて決定される、請求項71に記載の方法。

【請求項73】 前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量が、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて決定される、請求項71に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は一般的に、癌（例えば、乳癌）の治療、診断およびモニタリングに関する。本発明はさらに詳細には、ママグロビン（mammaglobin）の特異的エピトープに、このようなエピトープを認識する抗体および免疫細胞に、そして患者の血清中のママグロビンを検出するための方法に関する。このようなペプチド、抗体および細胞は、乳癌の予防および処置のため、ならびに乳癌の診断およびモニタリングのための、ワクチンおよび薬学的組成物において用いられ得る。

【0002】**(発明の背景)**

乳癌は、合衆国および世界中の女性にとって重要な健康問題である。この疾患の検出および処置は進歩してきているが、乳癌は、女性における癌関連死の2番目に主な原因のままであり、米国において毎年180,000人を超える女性に罹患している。北アメリカの女性については、生涯で乳癌になる確率は現在、8分の1である。

【0003】

乳癌の予防または処置のために、ワクチンも他の普遍的に好首尾の方法も現在利用可能でない。この疾患の管理は現在、早期診断（慣用的な乳房スクリーニング手順を通して）および攻撃的処置（これは、1以上の種々の処置（例えば、手術、放射線治療、化学治療およびホルモン治療）を含み得る）の組み合わせに頼る。特定の乳癌についての処置経過はしばしば、特異的腫瘍マーカーの分析を含む、種々の予後パラメーターに基づいて選択される。例えば、Porter-JordanおよびLippman, Breast Cancer 8:73-100, 1994を参照のこと。しかし、確立されたマーカーの使用はしばしば、解釈することが困難である結果をもたらし、そして乳癌患者において観察される高い死亡率は、この疾患の処置、診断および予防において改善が必要であることを示す。

【0004】

治療方法および診断方法におけるかなりの研究にもかかわらず、当該分野には、乳癌を検出および処置するための方法を改善する必要がある。本発明は、これらの必要性を満たし、そしてさらに、他の関連する利点を提供する。

【0005】

(発明の要旨)

手短に述べると、本発明は、乳癌の診断、治療およびモニタリングのための組成物および方法を提供する。1つの局面では、本発明は、ヒトママグロビンのエピトープの少なくとも7個、好ましくは少なくとも9個、そしてより好ましくは少なくとも15個連続したアミノ酸残基を含むポリペプチドを提供し、ここで、このエピトープは、IDELKECFLNQTDETL SNVE (Pro2; 配列番号1); TTNAIDELKECFLNQ (Pro2-3; 配列番号2); SQHCYAGSGCPLLENVISKTI (Pro5; 配列番号3); EYKELLQEFIDDNATTNAID (ペプチド5A; 配列番号4) およびKLLMVLMLA (mg b1; 配列番号5) からなる群より選択され、その結果、このポリペプチドは、ヒトママグロビン内に存在する30個以下連続したアミノ酸残基を含む。

【0006】

他の局面では、本発明は、上記の通りのポリペプチドおよび生理学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物を提供する。

【0007】

本発明の関連した局面では、ワクチンが提供される。このようなワクチンは、上記のポリペプチドおよび免疫刺激物質を含む。

【0008】

さらなる局面では、本発明は、上記の通りのママグロビンエピトープに結合する抗体(例えば、モノクローナル抗体)またはその抗原結合フラグメントを、ならびにこのような抗体を含む診断キットを提供する。

【0009】

グリコシル化ママグロビンに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原

結合フラグメント、およびこのような抗体を含む診断キットもまた提供される。

【0010】

本発明はさらに、以下を含む薬学的組成物を提供する：(a)上記の通りのエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；および(b)生理学的に受容可能なキャリア。

【0011】

さらなる局面では、本発明は、上記に記載した通りの薬学的組成物またはワクチンを患者に投与する工程を包含する、患者における乳癌の発達を阻害するための方法を提供する。

【0012】

さらなる局面では、本発明は、患者における乳癌の存在または非存在を決定するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：(a)患者から得た生物学的サンプルを、上記の通りのエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；(b)サンプル中の、抗体またはそのフラグメントに結合するポリペプチドの量を検出する工程；および(c)ポリペプチドの量を所定のカットオフ値に対して比較する工程。好ましい実施形態では、この抗体は、モノクローナル抗体である。工程(b)は、例えば、2抗体サンドイッチアッセイを含み得る。

【0013】

本発明はまた、他の局面では、患者における乳癌の進行のモニタリングのための方法を提供する。このような方法は、以下の工程を包含する：(a)第1の時点で患者から得られた生物学的サンプルを、上記の通りのエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；(b)該サンプル中の、この抗体またはそのフラグメントに結合するポリペプチドの量を検出する工程；(c)その後の時点で該患者から得られた生物学的サンプルを用いて工程(a)および工程(b)を繰り返す工程；ならびに(d)工程(c)において検出されたポリペプチドの量を、工程(b)において検出された量に対して比較する工程。

【0014】

さらなる局面では、本発明は、生物学的サンプルから腫瘍細胞を除去するための方法を提供し、この方法は、生物学的サンプルを、EYKELLQEFIDDNATTNAID（ペプチド5A；配列番号4）およびKLLMVLMLA（mg b 1；配列番号5）からなる群より選択されるママグロビンエピトープと特異的に反応するT細胞と接触させる工程を包含し、この接触させる工程は、該サンプルからのママグロビンまたはそのペプチドエピトープを発現する細胞の除去を可能にするに十分な条件下および時間にわたって行われる。生物学的サンプルとしては例えば、血液およびその画分が挙げられる。

【0015】

他の局面では、上記の通りに処理された生物学的サンプルを患者に投与する工程を包含する、患者における乳癌の発達を阻害するための方法がさらに提供される。

【0016】

本発明はまた、さらなる局面において、ママグロビンに特異的なT細胞を刺激および/または増加（expand）させるための方法を提供し、この方法は、T細胞を、配列EYKELLQEFIDDNATTNAID（ペプチド5A；配列番号4）またはKLLMVLMLA（mg b 1；配列番号5）を含むペプチドと接触させる工程を包含し、ここで、このペプチドは、ヒトママグロビンの少なくとも7個、好ましくは少なくとも9個、そしてより好ましくは少なくとも15個連続したアミノ酸残基を含み、ここでこのペプチドは、ヒトママグロビンの30個以下連続したアミノ酸残基を含み、そして接触は、T細胞の刺激および/または増加を可能にするに十分な条件下および時間にわたって行われる。

【0017】

関連した局面では、上記の通りに調製されたT細胞を含む、単離されたT細胞集団が提供される。

【0018】

さらなる局面では、有効量の上記の通りのT細胞集団を患者に投与する工程を包含する、患者における乳癌の発達を阻害するための方法が提供される。

【0019】

さらなる局面では、患者における乳癌の発達を阻害するための方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：(a)患者から単離されたCD4⁺および/またはCD8⁺のT細胞を、ヒトママグロビンの少なくとも7個、好ましくは少なくとも9個、そしてより好ましくは少なくとも15個連続したアミノ酸残基を含むペプチドと共にインキュベートし、その結果、T細胞が増殖する工程であって、ここで、このペプチドは、ヒトママグロビンの30個以下連続したアミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドは、配列EYKELLQEFIDDNATTNAID(ペプチド5A;配列番号4)またはKLLMVLMLA(mgb1;配列番号5)を含む、工程;および(b)有効量の増殖したT細胞を患者に投与する工程。

【0020】

さらに、患者における乳癌の発達を阻害するための方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：(a)患者から単離されたCD4⁺および/またはCD8⁺のT細胞を、ヒトママグロビンの少なくとも7個、好ましくは少なくとも9個、そしてより好ましくは少なくとも15個連続したアミノ酸残基を含むペプチドと共にインキュベートし、その結果、T細胞が増殖する工程であって、ここで、このペプチドは、ヒトママグロビンの30個以下連続したアミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドは、配列EYKELLQEFIDDNATTNAID(ペプチド5A;配列番号4)またはKLLMVLMLA(mgb1;配列番号5)を含む、工程;(b)少なくとも1つの増殖した細胞をクローニングする工程;および(c)患者に有効量のクローニングされたT細胞を投与する工程。

【0021】

なおさらに、患者から得られた全血またはその画分のサンプル中のママグロビンmRNAのレベルを検出することにより、乳癌の存在または非存在が患者において決定され得る方法が提供され、ここで上皮細胞は、このサンプルから除去されている。例えば、このような検出は、以下の工程によって達成され得る：(a)患者から得られた生物学的サンプルを、ママグロビンをコードするポリヌクレオチドまたはその相補体にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させる工程;(b)このサンプルにおいて、このオリゴヌクレオチドにハイブリダイズ

するポリヌクレオチドの量を検出する工程；および(c)オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、所定のカットオフ値に対して比較し、それにより、この患者における乳癌の存在または非存在を決定する工程。

【0022】

他の局面では、乳癌の進行は、患者から得られた全血またはその画分のサンプル中のママグロビンmRNAのレベルを検出することによって患者においてモニタリングされ得、ここで上皮細胞は、2つの異なる時点でこのサンプルから除去されている。例えば、このようなモニタリングは、以下の工程によって達成され得る：(a)患者から得られたサンプルを、ママグロビンポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させる工程；(b)このサンプル中の、このオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出する工程；(c)その後の時点でこの患者から得られたサンプルを用いて工程(a)および工程(b)を繰り返す工程；ならびに(d)工程(c)において検出されたポリヌクレオチドの量を、工程(b)において検出された量に対して比較し、それにより、この患者におけるこの癌の進行をモニタリングする工程。

【0023】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明らかになる。本明細書中に開示された全ての参考文献は、あたかも各々が個々に援用されたかのように、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0024】

(発明の詳細な説明)

上述のように、本発明は、一般に、癌(例えば、乳癌)の治療、診断およびモニタリングのための組成物および方法に関する。本明細書中に記載の組成物は、ママグロビンのポリヌクレオチド、ポリペプチド、エピトープまたはこのようなエピトープを特異的に認識する抗体を含み得る。本発明は、ヒトママグロビンのある特定のエピトープおよびこのようなエピトープを結合する抗体の発見の一部に基づく。本発明はさらに、グリコシル化感受性様式でママグロビンを結合する抗体の発見の一部に基づく。本明細書中に記載の他の方法は、患者の血液またはその

画分におけるママグロビン核酸を検出するための技術を使用する。本発明の状況下での、これらの発見は、診断目的に適切な抗体の生成、乳癌の改善された治療法、ならびに乳癌の高感度の診断を可能にする血中のママグロビンRNAの検出に基づき得る診断方法を可能にする。

【0025】

(ママグロビンポリヌクレオチド)

本明細書中に提供される診断方法は、一般に、患者から得られたサンプル中のママグロビン核酸のレベルを検出するためのプローブまたはプライマーとして、ママグロビンポリヌクレオチド(例えば、オリゴヌクレオチド)を使用する。ママグロビンオリゴヌクレオチドは、ママグロビタンパク質の一部をコードし得る(例えば、15個連続するヌクレオチド、30個連続するヌクレオチド、および45個連続するヌクレオチド)。任意のこのような配列に相補的なポリヌクレオチドはまた、本発明によって含まれる。ポリヌクレオチドは、一本鎖(コードまたはアンチセンス)または二本鎖であり得、そしてDNA分子(ゲノム、cDNAもしくは合成)またはRNA分子であり得る。RNA分子は、HnRNA分子(イントロンを含み、そして1対1の様式でDNA分子に対応する)およびmRNA(イントロンを含まない)を含む。さらなるコード配列または非コード配列は、必要ではないが、本発明のポリヌクレオチド中に存在し得、そしてポリヌクレオチドは、必要ではないが、他の分子および/または支持材料に連結され得る。

【0026】

ポリヌクレオチドは、ネイティブ配列(すなわち、内因性ママグロビンの一部)を含み得るか、またはこのような配列の改変体を含み得る。ポリヌクレオチド改変体は、アッセイ条件下でママグロビンポリヌクレオチドにハイブリダイズするこのポリヌクレオチドの能力を実質的に減少させないように、1以上の置換、付加、欠失および/または挿入を含み得る。好ましくは、このようなポリペプチド改変体は、ネイティブママグロビンをコードする天然に存在するDNA配列(または相補性配列)に中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る。適切な中程度にストリンジェントな条件は、以下を含む: $5 \times S S C$ 、0 .

5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) の溶液中での予備洗浄；50 ~ 65 °C、5 × SSCでの、一晚のハイブリダイゼーション；続いて各々0.1% SDS含有の2 × SSC、0.5 × SSCおよび0.2 × SSCを用いた20分間、65 °Cでの2回の洗浄。

【0027】

ポリヌクレオチドは、任意の種々の技術を用いて調製され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ママグロビンを発現する細胞（例えば、乳房腫瘍細胞）から調製されるcDNAから増幅され得る。このようなポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を介して増幅され得る。このアプローチについて、配列特異的プライマーが、既知のママグロビン配列に基づいて設計され得、そして購入され得るか、または合成され得る。

【0028】

コード配列または相補的配列の一部は、遺伝子発現を検出するためのプローブまたはプライマーとして設計され得る。プローブは、種々のレポーター基（たとえば、放射性核種および酵素）によって標識され得、そして好ましくは、少なくとも10ヌクレオチド長、より好ましくは、少なくとも20ヌクレオチド長、そしてなおより好ましくは、少なくとも30ヌクレオチド長である。プライマーは、好ましくは、22 ~ 30ヌクレオチド長である。

【0029】

任意のポリヌクレオチドをさらに改変して、インビボでの安定性を増加させ得る。可能な改変としては、5'末端および/または3'末端での隣接配列の付加；骨格中のリン酸ジエステル結合に代わるホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用；および/または非古典的塩基（例えば、イノシン、キューオシンおよびワイプトシン（wybutosine）、ならびにアセチル-、メチル-、チオ-および他の改変形態のアデニン、シトシン、グアニン、チミン、およびウリジン）の含有が挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

本明細書中に記載されるようなヌクレオチド配列は、確立された組換えDNA技術を用いて種々の他のヌクレオチド配列に連結され得る。例えば、ポリヌクレ

オチドは、種々のクローニングベクター（プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、およびコスミドを含む）のいずれかにクローニングされ得る。特定の目的のベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクターおよび配列決定ベクターが挙げられる。一般に、ベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、都合の良い制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つ以上の選択マーカーを含む。他のエレメントは、所望される用途に依存して、そして当業者に明らかである。

【0031】

（ママグロビンエピトープおよびポリペプチド）

本発明の状況下で、ポリペプチドは、少なくとも1つのママグロビンエピトープまたはその改変体を含む。「エピトープ」は、本明細書中に記載されるような、抗ママグロビン抗血清内の1以上の抗体が特異的に結合するか、または1以上のママグロビン特異的T細胞と特異的に反応する、ママグロビンの一部である。エピトープは、必要ではないが、グリコシル化感受性様式で、抗体によって特異的に結合され得る（すなわち、抗体は、グリコシル化されたエピトープ、脱グリコシル化されたエピトープまたは両方に結合し得る）。ママグロビンエピトープを含むポリペプチドは、一般に、ヒトママグロビンの少なくとも7連続するアミノ酸残基、および好ましくは、ヒトママグロビンの9～30個連続するアミノ酸残基を含む。エピトープのサイズは、そのエピトープがCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞または抗体によって認識されるか否かに依存して変化し得ることに留意する。しかし、一般に、9アミノ酸配列が、TCL認識に十分である。本明細書中に記載のようなポリペプチドは、任意の長さのポリペプチドであり得る。ネイティブタンパク質および/または異種配列由来のさらなる配列が存在し得、そしてこのような配列は、（必要ではないが）免疫原性特性または抗原性特性をさらに有し得る。

【0032】

特定の好ましいエピトープは、以下の配列のうちの1つを含むか、またはこのような配列の少なくとも7個連続したアミノ酸残基、好ましくは少なくとも9個連続したアミノ酸残基、そしてより好ましくは少なくとも15個連続したアミノ

酸残基を含む、その部分を含む：

【0033】

【化1】

IDELKECFLNQTDETLNVE (Pro2; 配列番号1);
TTNAIDELKECFLNQ (Pro2-3; 配列番号2);
SQHCYAGSGCPLEENVISKTI (Pro5; 配列番号3);
EYKELLQEFIDDNATTNAID (ペプチド 5A; 配列番号4); または
KLLMVLMLA (mgb 1; 配列番号5).

他の好ましいエピトープは、ママグロビンのグリコシル化部位を含む。このようなエピトープは、グリコシル化ママグロビンに特異的に結合する抗体の生成に特に有用である。このような2つの部位は、N結合型グリコシル化部位アスパラギン(Asp)-53(QEFIDDNATTNAI)(配列番号6)およびAsp-68(LKECFLNQTDETL)(配列番号7)である。他のこのような部位は、例えば、異なるグリコシル化の組み合わせに対する抗体を含む抗体ライブラリーを使用して、容易に同定され得る。乳癌細胞由来のネイティブママグロビンに対するこのような抗体の結合は、従来のELISAおよびブロッティング技術を使用してアッセイされ得る。確立された生化学的技術もまた、他のママグロビングリコシル化部位を同定するために使用され得る。

【0034】

上記のように、ポリペプチドは、種々のネイティブママグロビンエピトープの改変体を含み得る。本明細書において用いるような「改変体」は、ネイティブエピトープに特異的な抗体によって結合されるその改変体の能力が実質的に減少されないように、そのネイティブエピトープとは、1以上の置換、欠失、付加および/または挿入で異なる。換言すれば、改変体がエピトープ特異的な抗血清または単離された抗体と反応する能力は、そのネイティブタンパク質に対して増強されてもよく、もしくは変化しなくてもよく、またはネイティブタンパク質に対して50%未満まで、そして好ましくは20%未満まで減少されてもよい。このような改変体は、一般に、本明細書において記載されるように、上記で提供される

ようなエピトープを改変し、そして上記のようにこの改変エピトープとエピトープ特異的な抗体または抗血清との反応性を評価することによって同定され得る。好ましい改変体としては、そのエピトープ中の20%未満の残基で置換が作製されているエピトープが挙げられる。

【0035】

好ましくは、改変体は、保存的置換を含む。「保存的置換」は、ペプチド化学の当業者にポリペプチドの二次構造および疎水性親水性特性が実質的に不変であることが予測されるような、アミノ酸が類似の特性を有する別のアミノ酸により置換されている置換である。アミノ酸置換は、一般に、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性特性の類似性に基づいて生成され得る。例えば、負に荷電したアミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ；正に荷電したアミノ酸としては、リジンおよびアルギニンが挙げられ；そして類似の親水性価を有する非荷電極性ヘッド基を有するアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。保存的变化を示し得るアミノ酸の他の群としては、以下が挙げられる：(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2) cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；および(5) phe、tyr、trp、his。改変体はまた、またはあるいは、非保存的变化を含み得る。改変体はまた、(またはあるいは)例えば、アミノ酸の欠失または付加により改変され得、この欠失または付加は、そのポリペプチドの免疫原性、二次構造および疎水性親水性特性に最小限の影響しか有さない。

【0036】

上記のように、ポリペプチドは、そのタンパク質のN末端にシグナル(またはリーダー)配列を含み得、この配列は、そのタンパク質の移動を翻訳同時的にまたは翻訳後に指向する。このポリペプチドはまた、このポリペプチドの合成、精製、または同定の容易さのために(例えば、ポリ-His)、または固体支持体へのポリペプチドの結合を増強するために、リンカーまたは他の配列に結合体化

され得る。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域に結合体化され得る。

【0037】

ポリペプチドは、任意の周知の技術を用いて調製され得る。組換えポリペプチドは、当業者に公知の任意の種々の発現ベクターを用いて、ママグロビンDNA配列から容易に調製され得る。発現は、組換えポリペプチドをコードするDNA分子を含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた任意の適切な宿主細胞において達成され得る。適切な宿主細胞としては、原核生物細胞、酵母細胞および高等真核生物細胞が挙げられる。好ましくは、使用される宿主細胞は、E. coli、酵母、またはCOSもしくはCHOのような哺乳動物細胞株である。培養培地中に組換えタンパク質またはポリペプチドを分泌する適切な宿主/ベクター系由来の上清は、まず、市販のフィルターを用いて濃縮され得る。濃縮後、濃縮物を適切な精製マトリックス（例えば、アフィニティマトリックスまたはイオン交換樹脂）に適用し得る。最終的に、1回以上の逆相HPLC工程を用いて、組換えポリペプチドをさらに精製し得る。

【0038】

約100アミノ酸より少ない、そして一般に約50アミノ酸より少ないアミノ酸を有するポリペプチドはまた、当業者に周知の技術を用いる合成手段により生成され得る。例えば、このようなポリペプチドは、任意の市販の固相技術（例えば、メリフィールド固相合成方法）（ここでは、アミノ酸が、伸長しているアミノ酸鎖に連続的に付加される）を用いて合成され得る。Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149~2146, 1963を参照のこと。ポリペプチドの自動合成のための装置は、Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA)のような供給業者から市販されており、そして製造業者の指示に従って操作され得る。

【0039】

関連する局面において、本明細書中に提供されるようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供される。一般に、本明細書中に記載されるようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、単離されている。「単離された」ポリペ

プチドおよびポリヌクレオチドは、その元々の環境から取り出されたものである。例えば、天然に存在するタンパク質は、その天然の系において共に存在する材料のいくらかまたは全てから分離されている場合に、単離されている。好ましくは、このようなポリペプチドは、少なくとも約90%純粋、より好ましくは、少なくとも約95%純粋、そして最も好ましくは少なくとも約99%純粋である。ポリヌクレオチドは、例えば、その天然の環境の一部でないベクターにクローニングされている場合に、単離されているとみなされる。

【0040】

(抗体およびそのフラグメント)

本発明はさらに、ママグロビンエピトープに特異的に結合する薬剤(例えば、抗体およびその抗原結合フラグメント)を提供する。本明細書中で使用される場合、抗体またはその抗原結合フラグメントは、それが、ママグロビンエピトープと検出可能なレベルで反応するが(例えば、ELISAにおいて)、類似の条件下で無関係なタンパク質と検出可能に反応しない場合に、ママグロビンエピトープに「特異的に結合する」と言われる。好ましい抗体は、ママグロビンのエピトープに検出可能に結合するが、このエピトープと重複しない(または、5アミノ酸残基未満で重複する)ママグロビンの他の部分に検出可能に結合しない。本明細書中で使用される場合、「結合」とは、複合体が形成されるような、2つの別々の分子間の非共有結合をいう。結合する能力は、例えば、この複合体の形成についての結合定数を決定することにより評価され得る。結合定数は、その複合体の濃度が構成成分の濃度の積で除算される場合に得られる値である。一般に、2つの化合物は、複合体形成についての結合定数が約 10^3 L/molを超える場合に、本発明の文脈において、「結合する」と言われる。結合定数は、当業者に周知の方法を使用して決定され得る。

【0041】

結合因子は、さらに、本明細書に記載の代表的なアッセイを使用して、癌(例えば、乳癌)を有する患者と有さない患者との間を区別し得る。つまり、ママグロビンエピトープに結合する抗体または他の結合因子、あるいはそれらの適切な部分は、癌に冒されている患者の少なくとも約20%において、その疾患の存在

を示すシグナルを生成し、ならびに癌を有さない個体の少なくとも約90%において、その疾患の非存在を示す陰性シグナルを生成する。結合因子がこの要件を満足するか否かを決定するために、癌を有する患者および有さない患者（標準的な臨床試験を使用して決定されるような）由来の生物学的サンプル（例えば、血液、血清、尿および/または腫瘍生検）を、本明細書中に記載されるように、結合因子に結合するポリペプチドの存在についてアッセイし得る。疾患を有するまたは有さない統計的に有意な数のサンプルをアッセイすべきことは明らかである。各結合因子は、上記の基準を満足すべきであるが；当業者は、結合因子を組み合わせて使用して感度を改善し得ることを認識する。

【0042】

上記の要件を満足させる任意の物質は、結合因子であり得る。例えば、結合因子は、ペプチド成分を有するリボソームまたは有さないリボソーム、RNA分子、あるいはペプチドであり得る。好ましい実施形態において、結合因子は、抗体またはその抗原結合フラグメントである。抗体は、当業者に公知の任意の種々の技術によって調製され得る。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと。一般に、抗体は、組換え抗体の産生を可能にするための、細胞培養技術（本明細書中に記載されるようなモノクローナル抗体の生成を含む）によって、または抗体遺伝子の適切な細菌宿主または哺乳動物細胞宿主へのトランスフェクションを介して産生され得る。1つの技術において、このポリペプチドを含む免疫原を、任意の広範な種々の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジおよびヤギ）に最初に注射し得る。この工程において、本発明のポリペプチドは、改変することなく、免疫原として供給され得る。あるいは、特に比較的短いポリペプチドに関して、このポリペプチドがキャリアタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニン）に連結される場合に、優れた免疫応答が誘導され得る。好ましくは、1つ以上のブースター免疫化を組み込む所定の計画に従って、この免疫原が動物の宿主内に注射され、そしてこの動物を定期的に採血する。次いで、このポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、例えば、

適切な固体支持体に結合されたポリペプチドを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって、このような抗血清から精製される。

【0043】

目的の抗原性ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、例えば、KohlerおよびMilstein、Eur. J. Immunol. 6:511~519、1976ならびにそれに対する改良の技術を使用して調製され得る。簡潔に言えば、これらの方法は、所望の特異性（すなわち、目的のポリペプチドとの反応性）を有する抗体を産生する能力を有する不死細胞株の調製を包含する。このような細胞株は、例えば、上記のような免疫化された動物から得られる脾細胞から産生され得る。ついで、この脾細胞を、例えば、ミエローム細胞融合パートナーとの融合、好ましくは、免疫化された動物と同系であるパートナーとの融合によって不死化する。種々の融合技術を使用し得る。例えば、この脾細胞およびミエローム細胞は、数分間、非イオン性界面活性剤と合わせられ、次いで、ハイブリッド細胞の増殖を支持するがミエローム細胞の増殖を支持しない選択培地上に低密度で播種され得る。好ましい選択技術は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を使用する。十分な時間、通常は約1~2週間の後、ハイブリッドのコロニーが観察される。単一のコロニーを選択し、そしてこのポリペプチドに対する結合活性について試験する。高い反応性および特異性を有するハイブリドーマが、好ましい。

【0044】

モノクローナル抗体は、増殖するハイブリドーマコロニーの上清から単離され得る。さらに、種々の技術（例えば、適切な脊椎動物宿主（例えば、マウス）の腹膜腔へのハイブリドーマ細胞株の注射）が、収量を増大するために使用され得る。次いで、モノクローナル抗体は、腹水または血液から採取され得る。夾雑物は、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈殿、および抽出のような従来技術によって抗体から除去され得る。本発明のポリペプチドは、例えば、アフィニティークロマトグラフィー工程における精製プロセスにおいて使用され得る。

【0045】

特定の好ましいモノクローナル抗体は、上記のエピトープ配列（Pro2、P

ro2~3、Pro5、ペプチド5Aまたはmgb1)に特異的に結合する。このような抗体としては、本明細書中で29C11、6A1、2D3および16D8と称されるウサギ抗体、および197-1H11と称されるマウス抗体が挙げられる。他の好ましい抗体は、他の配列(例えば、立体配置的に依存した配列)に結合する。このような抗体としては、本明細書中で、31-1H7、32-G11、304-1A5および98-1F4と称される抗体が挙げられる。他の好ましい抗体は、グリコシル化に依存する親和性でママグロビンのグリコシル化部位に結合する。例えば、特定の抗体がグリコシル化ママグロビンに特異的に結合する(すなわち、最適な結合のための特定のグリコシル化部位のグリコシル化を必要とする)。本明細書中で使用されるように、脱グリコシル化ママグロビン(周知技術を使用して、酵素学的に脱グリコシル化されたママグロビンであって、その結果、実質的にすべてのグリコシル化が除去される)に結合する親和性よりも、少なくとも2倍、好ましくは少なくとも5倍より高い親和性で、グリコシル化ママグロビンに結合する場合、抗体、またはその抗原結合フラグメントは、グリコシル化ママグロビンに特異的に結合する。オリゴサッカリドユニットが、アスパラギン(N-結合)またはセリンおよびスレオニン残基(O-結合)を介してタンパク質に付着された場合、グリコシル化が生じる。正常な細胞に比較して、タンパク質のグリコシル化は、しばしば腫瘍細胞において改変される。タンパク質のグリコシル化におけるこの差異は、診断(例えば、乳癌の診断)目的のために腫瘍特異的抗体を提供するために開発され得る。これは、ひどくグリコシル化されたタンパク質(例えば、ママグロビン)について特にあてはまる。ママグロビンの推定分子量は、9.2kDaであるが、乳癌細胞において発現されたこのタンパク質の成熟形態は、約18~25kDaの分子量であった。本発明の内容において、ママグロビンのさらなる分子量は、オリゴサッカリドの付着に起因することが見出された。従って、ママグロビンの分子量のおよそ1/2以上が、グリコシル化による。

【0046】

特定の実施形態において、抗体の抗原結合フラグメントの使用が好ましい。このようなフラグメントは、標準方法を使用して調製されたFabフラグメントを

含む。簡単には、免疫グロブリンは、Protein Aビーズカラム (HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) のアフィニティークロマトグラフィーによってウサギ抗血清から精製され得、そしてパパインによって消化され、FabおよびFcフラグメントを生じる。FabおよびFcフラグメントは、プロテインAビーズカラムのアフィニティークロマトグラフィーによって分別され得る。

【0047】

本発明のモノクローナル抗体は、1つ以上の治療剤と結合されて使用され得る。これに関して、適切な薬剤としては、放射性核種、分化のインデューサー、薬物、毒素、およびそれらの誘導体が挙げられる。好ましい放射性核種としては、 ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、および ^{212}Bi が挙げられる。好ましい薬物としては、メトトレキサート、ならびにピリミジンアナログおよびプリンアナログが挙げられる。好ましい分化のインデューサーとしては、ホルボールエステルおよび酪酸が挙げられる。好ましい毒素としては、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン (gelonin)、Pseudomonas外毒素、Shigella毒素、およびヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質が挙げられる。

【0048】

治療剤は、適切なモノクローナル抗体に対して直接的または間接的 (例えば、リンカー基を介して) のいずれかで結合 (例えば、共有結合) され得る。薬剤と抗体との間の直接的な反応は、各々が他方と反応する能力を有する置換基を有する場合に可能である。例えば、一方における求核基 (アミノ基またはスルフヒドリル基) は、他方におけるカルボニル含有基 (例えば、無水物もしくはハロゲン酸) または良好な脱離基 (例えば、ハロゲン) を含むアルキル基と反応する能力を有し得る。

【0049】

あるいは、リンカー基を介して治療剤と抗体とを結合させることが所望され得る。リンカー基は、結合能を妨害することを避けるために、抗体を試薬から離す

ためのスペーサーとして機能し得る。リンカー基はまた、薬剤または抗体の置換基の化学的反応性を増大させるように作用し、結合効率を増大し得る。化学的反応性における増大はまた、薬剤、または薬剤の官能基の使用を容易にし得、そうでなければ、可能でない。

【0050】

種々の二官能性または多官能性試薬（ホモ - およびヘテロ - 官能性の両方（例えば、Pierce Chemical Co.、Rockford、ILのカタログに記載される試薬））がリンカー基として使用され得ることは、当業者に明らかである。結合は、例えば、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、または酸化された炭水化物残基によって影響され得る。このような方法論（例えば、Rodwellらに対する米国特許第4,671,958号）を記載する、多くの参考文献が存在する。

【0051】

本発明の免疫結合体の抗体部分を有さない治療剤がより強力である場合、細胞への内在化の間または細胞への内在化に際して切断され得るリンカー基を使用することが所望され得る。多くの異なる切断され得るリンカー基が、記載されている。これらのリンカー基からの薬剤の細胞内放出に関する機構としては、ジスルフィド結合の還元（例えば、Spitlerに対する米国特許第4,489,710号）、感光性結合の照射（例えば、Senterらに対する米国特許第4,625,014号）、誘導体化されたアミノ酸側鎖の加水分解（例えば、Kohnらに対する米国特許第4,638,045号）、血清補体媒介加水分解（例えば、Rodwellらに対する米国特許第4,671,958号）、および酸触媒化加水分解（例えば、Blattlerらによる米国特許4,569,789）による切断が挙げられる。

【0052】

抗体に1つ以上の薬剤を結合することが、所望される。1つの実施形態において、薬剤の複数分子が、1つの抗体分子に結合される。別の実施形態において、1つ以上の型の薬剤が、1つの抗体に結合され得る。特定の実施形態に関わらず、1つ以上の薬剤を有する免疫結合体は、種々の方法において調製され得る。例

例えば、1つ以上の薬剤は、抗体分子、またはリンカー（これは、使用され得る付着について複数の部位を提供する）に直接結合され得る。あるいは、キャリアが使用され得る。

【0053】

キャリアは、直接的かまたはリンカー基を介してのいずれかの共有結合を含む、種々の方法において薬剤を保有し得る。適切なキャリアとしては、アルブミンのようなタンパク質（例えば、Katoらに対する米国特許第4,507,234号）、ペプチドおよびアミノデキストランのようなポリサッカリド（例えば、Shihらに対する米国特許第4,699,784号）が挙げられる。キャリアはまた、非共有結合によってか、またはリポソーム小胞内へのような封入によって薬剤を保有し得る（例えば、米国特許第4,429,008号および同第4,873,088号）。放射性核種薬剤に特異的なキャリアとしては、放射性ハロゲン化低分子およびキレート化合物が挙げられる。例えば、米国特許4,735,792号は、代表的な放射性ハロゲン化低分子およびそれらの合成を開示する。放射性核種のキレートは、金属、または金属酸化物、放射性核種を結合するためのドナー原子として窒素原子および硫黄原子を含む化合物を含む、キレート化合物から形成され得る。例えば、Davisonらに対する米国特許第4,673,562号は、代表的なキレート化合物およびそれらの合成を開示する。

【0054】

抗体および免疫結合体についての種々の投与経路が、使用され得る。代表的には、投与は、静脈内、筋肉内、皮下または切除された腫瘍の床においてである。抗体/免疫結合体の正確な用量が、使用される抗体、腫瘍上の抗原の密度、および抗体のクリアランス速度に依存して変化することは明白である。

【0055】

（T細胞）

免疫治療組成物はまた、あるいは、ママグロビンを特異的に認識するT細胞を含み得る。このような細胞は、一般的に標準的手順を使用して、インビトロまたはエキソビボで調製され得る。例えば、T細胞は、市販の細胞分離システム（例えば、ISOLEX™システム（Nexell Therapeutics I

nc. , (Irvine , CAから入手可能、米国特許第5 , 240 , 856号 ; 米国特許第5 , 215 , 926号 ; WO89 / 06280 ; WO91 / 16116およびWO92 / 07243もまた参照のこと)) を使用して、患者の骨髄、末梢血あるいは骨髄または末梢血の画分中から単離され得る。あるいは、T細胞は、関連または無関連のヒト、非ヒト哺乳動物、細胞株または培養物から誘導され得る。簡単には、患者、関連するドナーまたは関連しないドナーから、慣用的技術 (例えば、末梢血リンパ球のFicoll / Hypaque密度勾配遠心分離) によって、単離され得るT細胞は、ママグロビンポリペプチドと共にインキュベートされる。例えば、T細胞は、ママグロビンポリペプチド (例えば、5 ~ 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$) または匹敵する量のママグロビンポリペプチドを合成する細胞とともに、37 °Cで2 ~ 9日間 (代表的には4日間) 、インビトロでインキュベートされ得る。T細胞サンプルの別のアリコート、コントロールとして役立つように、ママグロビタンパク質の非存在下でインキュベーションすることが、所望され得る。

【0056】

T細胞は、ママグロビンポリペプチド、ママグロビンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび / またはそのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞 (APC) を用いて刺激され得る。このような刺激は、このポリペプチドに特異的であるT細胞の生成を可能にする条件下および十分な時間で行われる。好ましくは、ママグロビンポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、送達ビヒクル (例えば、ミクロスフェア) 中に存在して、特異的T細胞の生成を容易にする。

【0057】

T細胞は、このT細胞が特異的に増殖、サイトカインを分泌、またはこのポリペプチドで被覆された標的細胞またはこのようなポリペプチドをコードする遺伝子を発現する標的細胞を殺傷する場合に、ママグロビンポリペプチドに特異的であるとみなされる。T細胞特異性は、任意の種々の標準的技術を使用して評価され得る。例えば、クロム放出アッセイまたは増殖アッセイにおいて、ネガティブコントロールと比較して、溶解および / または増殖において2倍を超える増加の刺激指数は、T細胞特異性を示す。このようなアッセイは、例えば、Chenら

、Cancer Res. 54:1065-1070, 1994に記載されるように、実行され得る。あるいは、T細胞の増殖の検出は、種々の公知の技術によって達成され得る。例えば、T細胞増殖は、DNA合成の速度の増加を測定することによって検出され得る(例えば、トリチウム化チミジンでT細胞の培養物をパルス標識し、DNAに取り込まれたトリチウム化チミジンの量を測定することによって)。T細胞増殖を検出する他の方法は、インターロイキン2(IL-2)、Ca²⁺流動、または色素の取り込み(例えば、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル-テトラゾリウム)の増加を測定することである。あるいは、リンフォカイン(例えば、インターフェロン)の合成が測定され得るか、またはママグロビンポリペプチドに応答し得る相対的な数のT細胞が定量され得る。3~7日間のママグロビンポリペプチド(100 ng/ml~100 µg/ml、好ましくは、200 ng/ml~25 µg/ml)との接触は、T細胞の増殖において少なくとも2倍の増加を生じる。2~3時間の上記のような接触は、標準的なサイトカインアッセイを使用して測定されるように、T細胞の活性化を生じ、ここで、サイトカイン(例えば、TNFまたはIFN-)放出のレベルの2倍の増加が、T細胞の活性化を示す(Coliganら、Current Protocols in Immunology, 第1巻、Wiley Interscience (Greene 1998)を参照のこと)。ママグロビン特異的T細胞を、標準的な技術を使用して増加させ得る。好ましい実施形態において、T細胞は、患者または関連するドナーもしくは無関連のドナーから誘導され、そして刺激および増加後にその患者に投与される。

【0058】

ママグロビンポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはAPCを発現するポリペプチドに反応して活性化されたT細胞は、CD4⁺および/またはCD8⁺であり得る。CD4⁺またはCD8⁺T細胞の特異的な活性は、種々の方法で検出され得る。特異的なT細胞活性化を検出する方法としては、T細胞の増殖の検出、サイトカイン(例えば、リンフォカイン)の産生の検出、または細胞溶解活性の産生(すなわち、ママグロビンに特異的な細胞毒性T細胞の産生)の検出が挙げられる。CD4⁺T細胞について、特定のT細胞活性化を検出するための好ましい方

法は、T細胞の増殖の検出である。CD8⁺細胞について、特定のT細胞活性化を検出するための好ましい方法は、細胞溶解活性の産生の検出である。

【0059】

治療目的で、ママグロビンポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはAPCに反応して増殖するCD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞を、インビトロまたはインビボのいずれかで大量に増加させ得る。このようなT細胞のインビトロでの増殖は、種々の方法において達成され得る。例えば、T細胞は、T細胞増殖因子（例えば、インターロイキン-2）の添加を伴うか、または伴わずに、ママグロビンポリペプチド（例えば、このようなポリペプチドの免疫原性部分に対応する短いペプチド）、および/またはママグロビンポリペプチドを合成する刺激細胞に再曝露され得る。CD8⁺T細胞応答が産生される場合、刺激細胞の添加は好ましい。T細胞は、ママグロビンポリペプチドとの断続的な再刺激に反応する特異性を保持してインビトロで多数まで増殖し得る。簡単には、インビトロの刺激について、リンパ球は、ヒト血清、ママグロビタンパク質またはペプチドおよびサイトカイン（例えば、IL-2、IL-10およびIL-7）を含む媒体を有する血管に配置され得る。細胞は、7~14日間インキュベートされ得、次いで、細胞に存在する自己抗原提示細胞、ママグロビタンパク質またはペプチドおよびサイトカインを使用して類似の様式で再刺激され得る。抗原特異的T細胞はまた、抗原またはマイトジェンまたは非特異的の刺激因子（例えば、CD3またはPHA）のいずれかを使用してインビトロで増殖し得る。

【0060】

あるいは、ママグロビンポリペプチドの存在下で増殖する1以上のT細胞は、クローニングによって数が増加し得る。細胞をクローニングするための方法は、当該分野で周知であり、そして限界希釈を意味しない。応答者T細胞は、密度勾配遠心分離およびヒツジ赤血球ロゼット形成によって、感作された親の末梢血より精製され得、そして、照射された自己フィラー（filler）細胞の存在下で正常抗原を用いて刺激することによって培養物中に確立される。CD4⁺細胞株を産生するために、ママグロビンポリペプチドは、抗原性刺激として使用され、そして自己末梢血リンパ球（PBL）由来のAPCまたはエプスタイン-バー

ウイルスでの感染によって不死化されたリンパ芽球腫細胞株 (LCL) を、抗原提示細胞として使用した。CD8⁺T細胞株を産生するために、ママグロビンポリペプチドを産生する発現ベクターを用いてトランスフェクトされた自己抗原提示細胞は、刺激細胞として使用され得る。確立されたT細胞株は、96ウェルの平らな底のプレートにウェルあたり0.5細胞の頻度で、 1×10^6 の照射されたPBLまたはLCL細胞および組換えインターロイキン2 (rIL-2) (50 U/ml) で刺激されたT細胞をプレートすることによって抗原刺激後にクローン化され得る。確立されたクローンの増殖を有するウェルは、初めのプレート後、約2~3週間で同定され得、そして自己抗原提示細胞の存在化で適切な抗原を用いて再刺激される。引き続き、抗原刺激の後、2~3日間の低用量のrIL-2 (10 U/ml) の添加によって増殖した。T細胞クローンは、およそ2週間おきの抗原およびrIL2を用いる周期性の再刺激によって24ウェルプレート内で維持され得る。クローンおよび/または増殖した細胞は、例えばChangら、Crit. Rev. Oncol. Hematol. 22:213, 1996に記載されたように患者に再び投与され得る。

【0061】

特定の実施形態において、同種のT細胞は、インビボおよび/またはインビトロでプライムされ得る (すなわち、ママグロビンに感作される)。このようなプライミングは、T細胞のプライミングを可能にするのに十分な条件および時間、ママグロビンポリペプチド、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはこのようなポリペプチドを産生する細胞とT細胞との接触によって達成され得る。一般的に、例えば、ママグロビンポリペプチドと接触が、本明細書中に記載される標準増殖アッセイ、クロム放出アッセイおよび/またはサイトカイン放出アッセイによって測定されるようなT細胞の増殖および/または活性化を生じた場合、T細胞はプライムされたと考えられる。ネガティブコントロールと比較したサイトカインレベルの増殖または溶解における刺激指標の2倍以上の増加、および3倍以上の増加は、T細胞特異性を示す。インビトロでプライムされた細胞は、例えば、骨髄移植においてか、またはドナーのリンパ球感染注入として使用され得る。

【0062】

(薬学的組成物およびワクチン)

特定の局面では、本明細書中に開示されるようなポリペプチド、ポリヌクレオチド、T細胞および/または結合因子を、薬学的組成物または免疫原性組成物(すなわち、ワクチン)中に組み込み得る。あるいは、薬学的組成物は、ママグロビンポリペプチドでトランスフェクトされた抗原提示細胞(例えば、樹状細胞)を含み、その結果、抗原提示細胞はママグロビンポリペプチドを発現する。薬学的組成物生物は、1つ以上のこのような化合物または細胞および生理的に受容可能なキャリアを含む。ワクチンは、1つ以上のこのような化合物または免疫賦活薬を含み得る。免疫賦活薬は、外因性の抗原に対する(抗体および/または細胞媒介性の)免疫応答を増強または強化する任意の物質であり得る。免疫賦活薬の例としては、アジュバント、生分解性ミクロスフェア(例えば、ポリ乳酸ガラクトイド(poly lactic galactide)およびリポソーム(この中に、化合物を取り込む;例えば、Fullerton、米国特許第4,235,877号を参照のこと)が挙げられる。ワクチン調製物は、一般的に、例えば、M.F.PowellおよびM.J.Newman編、「Vaccine Design(the subunit and adjuvant approach)」、Plenum Press(NY、1995)に記載される。本発明の範囲内にある薬学的組成物およびワクチンはまた、生物学的に活性または不活性であり得る他の化合物を含み得る。例えば、他の腫瘍抗原の1つ以上の免疫原性部分は、組成物またはワクチンにおいて、融合ポリペプチドに組み込まれてかまたは個々の化合物としてのいずれかで存在し得る。

【0063】

薬学的組成物またはワクチンは、上記のような1つ以上のポリペプチドをコードするDNAを含み得、その結果、そのポリペプチドはインサイチュで生成される。上記のように、DNAは、当業者に公知の種々の任意の送達系(核酸発現系、細菌性発現系、およびウイルス性発現系ならびに哺乳動物発現系を含む)において存在し得る。多数の遺伝子送達技術(例えば、Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:1

43-198、およびその中で援用される参考文献)が当該分野で周知である。適切な核酸発現系は、患者における発現のために必要なDNA配列を含む(例えば、適切なプロモーターおよび終結シグナル)。細菌性送達系は、細胞表面上でポリペプチドの免疫原性部分を発現するか、または分泌(エプトープ)する細菌(例えば、*Bacillus-Calmette-Guerrin*)の投与を含む。好ましい実施形態では、ウイルス性発現系(例えば、ワクシニアもしくは他のポックスウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルス)を使用してDNAを導入し得る。このウイルス発現系は、非病原性(欠損性)の複製コンピテンツなウイルスの使用を含み得る。適切な系は、例えば、以下において開示される: Fisher-Hochら、PNAS U.S.A. 86:317-321、1989; Flexnerら、Ann.N.Y.Acad.Sci. 569:86-103、1989; Flexnerら、Vaccine 8:17-21、1990; 米国特許第4,603,112号、同第4,769,330号、および同第5,017,487号; WO 89/01973; 米国特許第4,777,127号; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner、Biotechniques 6:616-627、1988; Rosenfeldら、Science 252:431-434、1991; Kollisら、PNAS 91:215-219、1994; Kass-Eislerら、PNAS U.S.A. 90:11498-11502、1993; Guzmanら、Circulation 88:2838-2848、1993; およびGuzmanら、Cir.Res. 73:1202-1207、1993。このような発現系にDNAを組み込む技術は、当業者に周知である。DNAはまた、例えば、Ulmerら、Science 259:1745-1749、1993において記載され、そしてCohen、Science 259:1691-1692、1993によって概説されるように、「裸」であり得る。裸のDNAの取り込みは、生分解性ビーズ(これは、細胞に効率的に輸送される)上にDNAをコーティングすることによって増加され得る。ワクチンが、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド成分の両方を含み得ることは明らかである。このようなワクチンは、増強された免疫応答を提供し得る。

【0064】

ワクチンは、本明細書中で提供されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学的に受容可能な塩を含み得ることが明らかである。このような塩は、薬学的に受容可能な非毒性の塩基（有機塩基（例えば、1級、2級および3級のアミンならびに塩基性アミノ酸の塩）、および無機塩基（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩）を含む）から調製され得る。

【0065】

当業者に公知の任意の適切なキャリアが、本発明の薬学的組成物において使用され得るが、キャリアの型は、投与の様式に依存して変化する。本発明の組成物は、任意の適切な投与の様式（例えば、局所的投与、経口投与、経鼻投与、静脈内投与、頭蓋内投与、腹腔内投与、皮下投与、または筋肉内投与を含む）について処方され得る。非経口投与（例えば、皮下注射）については、キャリアは、好ましくは、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ろう、または緩衝液を含む。経口投与については、任意の上記のキャリアまたは固体キャリア（例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、および炭酸マグネシウム）を使用し得る。生分解性マイクロスフェア（例えば、ポリラクテートポリグリコレート）もまた、本発明の薬学的組成物のためのキャリアとして使用され得る。適切な生分解性マイクロスフェアは、例えば、米国特許第4,897,268号；同第5,075,109号；同第5,928,647号；同第5,811,128号；同第5,820,883号；同第5,853,763号；同第5,814,344号；および同第5,942,252号に開示される。

【0066】

このような組成物はまた、以下を含み得る：緩衝液（中性の緩衝化生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水）、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、スクロース、またはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、またはアミノ酸（例えば、グリシン）、抗酸化剤、静菌剤、キレート剤（例えば、EDTAまたはグルタチオン）、アジュバント（例えば、水酸化アルミニ

ウム)、処方物を患者の血液に対して等張性、低浸透性またはわずかに高浸透性にする溶質、懸濁剤、濃化剤、および/または保存剤。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物(lyophilizate)として処方され得る。化合物はまた、周知技術を使用して、リポソーム内にカプセル化され得る。

【0067】

任意の種々の免疫刺激薬が、本発明のワクチンにおいて使用され得る。例えば、アジュバントが含まれ得る。大半のアジュバントは、迅速な異化作用から抗原を保護するために設計された物質(例えば、水酸化アルミニウムまたは鉱油)、および免疫応答の刺激物質(例えば、リポドA、Bordetella pertussisまたはMycobacterium tuberculosis由来のタンパク質)を含む。適切なアジュバントは、例えば、フロイントの不完全アジュバントおよび完全アジュバント(Difco Laboratories, Detroit, MI)、Merck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2(SmithKline Beecham, Philadelphia, PA);水酸化アルミニウムゲル(ミョウバン)またはリン酸アルミニウムのようなアルミニウム塩;カルシウム、鉄または亜鉛の塩;アシル化チロシンの不溶性懸濁液;アシル化糖;カチオン性またはアニオン性の誘導体化多糖類;ポリホスファゼン(polyphosphazene);生分解性マイクロスフェア;モノホスホリルリポドAおよびクイルA(Quil A)として市販されている。GM-CSFまたはインターロイキン-2、インターロイキン-7、もしくはインターロイキン-12のようなサイトカインもまた、アジュバントとして使用され得る。

【0068】

本明細書中に提供されるワクチンでは、アジュバント組成物は、好ましくは、優勢にTh1型の免疫応答を誘導するように設計され得る。高レベルのTh1型サイトカイン(例えば、IFN- γ 、IL-2およびIL-12)は、投与された抗原に対する細胞媒介性免疫応答の誘導に有利な傾向がある。対照的に、高レベルのTh2型サイトカイン(例えば、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10およびTNF- α)は、体液性免疫応答の誘導に有利な傾向がある。本明細

書中に提供されるようなワクチンの適用後、患者は、Th1型応答およびTh2型応答を含む免疫応答を支持する。応答が優勢にTh1型である好ましい実施形態では、Th1型サイトカインのレベルは、Th2型サイトカインのレベルよりも高い程度に増加する。これらのサイトカインのレベルは、標準的アッセイを使用して容易に評価され得る。サイトカインのファミリーの概説については、MossmanおよびCoffman、Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173、1989を参照のこと。

【0069】

優勢にTh1型応答を誘発する際の使用のために好ましいアジュバントとしては、例えば、モノホスホリルリピドA（好ましくは、3-デオ-アシル化モノホスホリルリピドA（3D-MPL）とアルミニウム塩との組み合わせが挙げられる。MPLアジュバントは、Corixa Corporation（Seattle、WA；米国特許第4,436,727号；同第4,877,611号；同第4,866,034号；および同第4,912,094号を参照のこと）から入手可能である。CpGを含有するオリゴヌクレオチド（ここで、CpGジヌクレオチドはメチル化されていない）もまた、優勢にTh1型応答を誘導する。このようなオリゴヌクレオチドは周知であり、そして例えば、WO 96/02555およびWO 99/33488に記載されている。免疫刺激DNA配列もまた、例えば、Satoら、Science 273: 352、1996により記載される。別の好ましいアジュバントはサポニン、好ましくは、QS21（Aquila Biopharmaceuticals Inc.、Framingham、MA）であり、これは単独または他のアジュバントと組み合わせて使用され得る。例えば、増強される系としては、モノホスホリルリピドAとサポニン誘導体の組み合わせ（例えば、WO 94/00153に記載のようなQS21と3D-MPLの組み合わせ）、またはWO 96/33739に記載のような、反応原性の低い組成物（ここでは、QS21は、コレステロールでクエンチされる）が挙げられる。他の好ましい処方物は、水中油エマルジョンおよびトコフェロールが挙げられる。水中油エマルジョン中にQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含有する特定の強力なアジュバント処方物が、WO 95/172

10中に記載される。

【0070】

他の好ましいアジュバントには、Montanide ISA 720 (Seppic, France)、SAF (Chiron, California, United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、SBASシリーズのアジュバント例えば、SmithKline Beecham、Rixensart、Belgiumから入手可能なSBAS-2またはSBAS-4)、Detox (Corixa Corporation; Seattle, WA)、RC-529 (Corixa Corporation; Seattle, WA) およびアミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート (AGP) が挙げられる。

【0071】

本明細書中で提供される任意のワクチンは、抗原、免疫刺激薬および適切なキャリアまたは賦形剤の組み合わせを生じる周知の方法を使用して調製され得る。本明細書において記載される組成物は、徐放性処方物 (すなわち、投与後、化合物の緩徐な放出をもたらすカプセル、スポンジ、またはゲル (例えば、多糖類からなる) のような処方物) の一部として投与され得る。このような処方物は一般に、周知の技術を用いて調製され得 (例えば、Coombesら、Vaccine 14: 1429~1438、1996を参照のこと)、そして例えば、経口、直腸または皮下移植によってか、あるいは所望の標的部位への移植によって投与され得る。徐放性処方物は、キャリアマトリックスに分散され、そして/または速度制御膜に囲まれる貯蔵所内に含まれる、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体を含み得る。

【0072】

このような処方物内での使用のためのキャリアは、生体適合性であり、そしてまた生分解性であり得る; 好ましくは、この処方物は比較的一定レベルの活性成分の放出を提供する。このようなキャリアには、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)、ならびにポリアクリレート、ラテックス、スターチ、セルロースおよびデキストランの微粒子が挙げられる。他の徐放性キャリアには、超分子バイオベ

クターが挙げられ、これは、非液体親水性コア（例えば、架橋ポリサッカリドまたはオリゴサッカリド）、および必要に応じて、リン脂質のような両親媒性化合物を含む外層を含む（例えば、米国特許第5,151,254号、およびPCT出願WO 94/20078、WO/94/23701およびWO96/06638を参照のこと）。適切な処方物内に含まれる活性化化合物の量は、移植の部位、放出の速度および予測持続時間、ならびに処置または予防される状態の特徴に依存する。

【0073】

任意の種々の送達ビヒクルが、腫瘍細胞を標的化する抗原特異的な免疫応答の産生を容易にするために、薬学的組成物およびワクチンにおいて使用され得る。送達ビヒクルは、抗原提示細胞（APC）（例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球、および効率的なAPCとなるように操作され得る他の細胞）を含む。このような細胞は、抗原を提示する能力を増加させるために、T細胞応答の活性化および/または維持を改善するために、抗腫瘍効果自体を有するように、および/または受け手（すなわち、整合したHLAハプロタイプ）と免疫学的に適合性であるように、遺伝的に改変され得るが、必要ではない。APCは、一般的に、任意の種々の生物学的液体および器官（腫瘍組織および腫瘍周囲組織を含む）から単離され得、そして自系、同種異系、同系または異種の細胞であり得る。

【0074】

本発明の特定の好ましい実施形態は、抗原提示細胞として、樹状細胞またはその前駆細胞を使用する。樹状細胞は、高度に強力なAPCであり（BancheureauおよびSteinman、Nature 392:245-251、1998）、そして予防的または治療的な抗腫瘍免疫性を誘発するための生理学的アジュバンドとして有効であることが示されてきた（TimmermanおよびLevy、Ann.Rev.Med.50:507-529、1999を参照のこと）。一般に、樹状細胞は、それらの代表的な形状（インサイチュでは星状、インビトロでは目に見える顕著な細胞質突起（樹枝状結晶）を有する）、高い効率で抗原を取り込み、処理し、そして提示するそれらの能力、および未処置の（

naive) T細胞応答を活性化するそれらの能力に基づいて同定され得る。もちろん樹状細胞は、インビボまたはエキソビボで樹状細胞上に通常見出されない特定の細胞表面レセプターまたはリガンドを発現するように操作され得、このような改変樹状細胞は本発明によって意図される。樹状細胞の代替として、分泌小胞抗原装荷樹状細胞 (secreted vesicles antigen-loaded dendritic cells) (エキソソーム (exosome) と呼ばれる) がワクチン内で使用され得る (Zitvogelら、Nature Med. 4: 594 - 600, 1998を参照のこと)。

【0075】

樹状細胞および前駆体は、末梢血、骨髓、腫瘍浸潤細胞、腫瘍周囲の組織浸潤細胞、リンパ節、脾臓、皮膚、臍帯血、または任意の他の適切な組織もしくは液体から獲得され得る。例えば、樹状細胞は、末梢血から回収された単球の培養物に対して、GM-CSF、IL-4、IL-13および/またはTNFのようなサイトカインの組み合わせを添加することによって、エキソビボで分化され得る。あるいは、末梢血、臍帯血または骨髓から回収されたCD34陽性細胞は、GM-CSF、IL-3、TNF、CD40リガンド、LPS、flt3リガンドおよび/または樹状細胞の成熟および増殖を誘導する他の化合物の組み合わせを、培養培地に添加することによって、樹状細胞に分化され得る。

【0076】

樹状細胞は、「未熟」細胞および「成熟」細胞として都合良く分類され、このことは、2つの十分に特徴付けられた表現型の間を区別する単純な方法を与える。しかしこの学名は、あらゆる可能な分化の中間段階を排除するように解釈されるべきではない。未熟な樹状細胞は、抗原の取り込みおよび処理の高い能力を有するAPCとして特徴付けられ、この能力は、Fcレセプターおよびマンノースレセプターの高度な発現と相関する。成熟表現型は、代表的に、クラスIおよびクラスII MHC、接着分子 (例えば、CD54およびCD11) ならびに同時刺激性分子 (例えば、CD40、CD80、CD86および4-1BB) のようなT細胞活性化の原因である細胞表面分子の高度な発現ではなく、これらのマーカーのより低い発現によって特徴付けられる。

【0077】

A P C は、一般に、胸部腫瘍タンパク質（またはその部分もしくは他の改変体）をコードするポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトされ得、その結果、胸部腫瘍ポリペプチドまたはその免疫原性部分が細胞表面上に発現される。このようなトランスフェクションはエキソビボで生じ得、次いでこのようなトランスフェクトされた細胞を含む組成物またはワクチンは、本明細書中に記載されるように、治療目的のために使用され得る。あるいは、細胞を提示する樹状または他の抗原を標的とする遺伝子送達ビヒクルが、患者に投与され得、インビボで起こるトランスフェクションを生じる。樹状細胞のインビボおよびエキソビボでのトランスフェクションは、例えば、WO 97 / 274447 に記載される方法、または Mahvi ら、*Immunology and cell Biology* 75 : 456 - 460、1997 によって記載される遺伝子銃アプローチのような当該分野で公知の任意の方法を使用して一般に実施され得る。樹状細胞の抗原装荷は、樹状細胞または前駆細胞を、胸部腫瘍ポリペプチド、DNA（裸のもしくはプラスミドベクター中の）またはRNA；あるいは抗原発現性組換え細菌またはウイルス（例えば、牛痘、鶏痘、アデノウイルスまたはレンチウイルスのベクター）とインキュベートすることによって達成され得る。装荷の前に、ポリペプチドは、T細胞補助（例えば、キャリア分子）を提供する免疫学的パートナーに共有結合され得る。あるいは、樹状細胞は、単独でかまたはポリペプチドの存在下で、結合していない免疫学的パートナーでパルス（pulse）され得る。

【0078】

ワクチンおよび薬学的組成物は、密閉アンプルまたはバイアルのような単位用量または多用量容器内に提供され得る。このような容器は、好ましくは、使用するまで処方物の無菌状態を損なわないために、密閉される。一般に、処方物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンとして保存され得る。あるいは、ワクチンまたは薬学的組成物は、使用直前の滅菌液体キャリアの添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存され得る。

【0079】

(癌治療)

本発明のさらなる局面において、本明細書中に記載される組成物は、癌（例えば、乳癌）の免疫療法のために使用され得る。このような方法では、代表的に、薬学的組成物およびワクチンが患者に投与される。本明細書中で使用される場合、「患者」は、任意の温血動物、好ましくはヒトをいう。患者は、癌に冒されていても冒されていなくともよい。従って、上記の薬学的組成物およびワクチンは、癌の発症を妨げるためか、または癌に冒された患者を処置するために使用され得る。癌は、当該分野で一般に認められている判定基準（悪性腫瘍の存在を含む）を使用して診断され得る。薬学的組成物およびワクチンは、原発性腫瘍の外科的除去ならびに / または放射線療法および従来の化学療法薬物の投与のような処置の前後のいずれかに投与され得る。

【 0 0 8 0 】

特定の実施形態では、免疫療法は能動免疫療法であり得る。能動免疫療法において、処置は、免疫応答改変因子（例えば、腫瘍ワクチン、細菌性アジュバント、および / またはサイトカイン）の投与による、腫瘍に対して反応する内因性宿主免疫系のインビボ刺激に依存する。

【 0 0 8 1 】

他の実施形態では、免疫療法は受動免疫療法であり得る。受動免疫療法において、処置は、確立された腫瘍免疫反応性を有する因子（例えば、エフェクター細胞または抗体）の送達を包含する。この因子は、抗腫瘍効果を直接または間接的に媒介し得、そして、必ずしもインタクトな宿主免疫系に依存するとは限らない。エフェクター細胞の例としては、以下が挙げられる：Tリンパ球（例えば、CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球およびCD4⁺ Tヘルパー腫瘍浸潤リンパ球）、キラー細胞（例えば、ナチュラルキラー細胞およびリンホカイン活性化キラー細胞）、B細胞、および本明細書中に提供されるポリペプチドを発現する抗原提示細胞（例えば、樹状細胞およびマクロファージ）。本明細書中に列挙されるポリペプチドに対して特異的なT細胞レセプターおよび抗体レセプターは、養子免疫療法のために、クローン化され、発現され、そして他のベクターまたはエフェクター細胞中に移入され得る。本明細書中に提供されるポリペプチドはまた、受動免

疫療法のために、抗体または抗イディオタイプ抗体（上記および米国特許第4,918,164号に記載のような）を生成するために使用され得る。

【0082】

エフェクター細胞は、本明細書中に記載されるように、一般的にインビトロでの増殖によって養子免疫療法のために十分な量で獲得され得る。単一抗原特異的エフェクター細胞を、インビボでの抗原認識を保持しながらその数を何十億にまで増殖させるための培養条件は、当該分野で周知である。このようなインビトロ培養条件は、代表的に、しばしばサイトカイン（例えば、IL-2）および非分裂性フィーダー細胞の存在下における、抗原での断続刺激を利用する。上記のように、本明細書中に提供される免疫反応性ポリペプチドは、疫療法のために十分な数の細胞を生成するために、抗原特異的T細胞培養物を迅速に増殖させるように使用され得る。特に、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージまたはB細胞）は、当該分野で周知の種々の標準的技術を使用して、免疫反応性ポリペプチドを適用（pulse）され得るか、または1つ以上のポリヌクレオチドでトランスフェクトされ得る。例えば、抗原提示細胞は、組換えウイルスまたは他の発現系において発現を増加させるために適切なプロモーターを有するポリヌクレオチドでトランスフェクトされ得る。治療における使用のための培養エフェクター細胞は、インビボで広く増殖および分布し得、そして長期間生存し得なければならない。培養エフェクター細胞が、IL-2を補充された抗原での反復刺激により、インビボで増殖しそして実質的な数で長期間生存するように誘導され得ることが、研究により示されている（例えば、Cheeverら、Immunological Reviews、157:177、1997を参照のこと）。

【0083】

本明細書中に開示されたポリペプチドはまた、腫瘍反応性のT細胞を生成および/または単離するために用いられ得、このT細胞は、次いで、患者に投与され得る。1つのこのような技術において、抗原特異的なT細胞株は、開示されたポリペプチドの免疫原性部分に対応する短いペプチドを用いて、インビボで免疫化することによって生成され得る。得られた抗原特異性CD8⁺CTLクローン

が患者から単離され得、標準的な組織培養技術を使用して増加され得、そして患者に戻され得る。

【0084】

別の実施形態において、同系または自己樹状細胞は、本明細書に開示されたポリペプチドの少なくとも免疫原性部分に対応するペプチドでパルスされ得る。得られた抗原特異的な樹状細胞は、患者に移入され得るか、またはT細胞を刺激して順に患者に投与され得る抗原特異的なT細胞を提供するために用いられ得るかのいずれかである。抗原特異的なT細胞を生成するためのペプチドパルスされた樹状細胞の使用、ならびにマウスモデルにおいて腫瘍を根絶するためのこのような抗原特異的なT細胞の続く使用が、Cheeverら(Immunological Reviews, 157:177, 1997)により示される。

【0085】

あるいは、本明細書中に示されるポリペプチドを発現するベクターは、患者から採取され、そしてその同じ患者に移植し戻すためにエキソビボでクローン増殖された抗原提示細胞に導入され得る。形質転換細胞は、当該分野で公知の任意の手段を使用して、好ましくは、静脈内投与、腔内投与、腹腔内投与または腫瘍内投与により、滅菌形態でその患者に再導入され得る。

【0086】

投与の経路および頻度ならびに投薬量は、個体間で変化し、そして標準的技術を使用して容易に確立され得る。一般に、薬学的組成物およびワクチンは、注射により(例えば、皮内、筋肉内、静脈内または皮下)、鼻腔的に(例えば、吸入)、経口的に投与され得る。好ましくは、1~10の間の用量が、52週間にわたり投与され得る。好ましくは、1ヶ月の間隔で、6用量が投与され、そしてその後、追加免疫が定期的に与えられ得る。代替的プロトコルが、個々の患者に適切であり得る。適切な用量は、上記されるように投与される場合に、抗腫瘍免疫応答を促進し得、そして基底(すなわち、未処理)レベルより少なくとも10~50%上である化合物の量である。このような応答は、患者において抗腫瘍抗体を測定することによってか、またはインビトロで患者の腫瘍細胞を殺傷し得る細胞傷害性エフェクター細胞のワクチン依存的産生によってモニターされ得る。こ

のようなワクチンは、ワクチン接種されていない患者と比較して、ワクチン接種された患者において改善された臨床結果（例えば、より頻繁な寛解、完全もしくは部分的、またはより長い、疾患のない生存）に導く免疫応答を引き起こし得るべきである。一般に、1つ以上のポリペプチドを含む薬学的組成物およびワクチンについて、1用量中に存在する各ポリペプチドの量は、宿主1kgあたり約100 μ g~5mgの範囲である。適切な用量サイズは、患者のサイズによって変化するが、代表的には、約0.1mL~約5mLの範囲である。

【0087】

一般的に、適切な投薬量および処置レジメンは、治療的および/または予防的利点を提供するに十分な量の活性化化合物を提供する。このような応答は、処置されていない患者と比較して、処置された患者において改善された臨床結果（例えば、より頻繁な寛解、完全もしくは部分的、またはより長い、疾患のない生存）を確立することによって、モニターされ得る。ママグロビンに対する既存の免疫応答の増加は、一般的に、改善された臨床結果と相関する。このような免疫応答は、標準的な増殖アッセイ、細胞傷害性アッセイまたはサイトカインアッセイを使用して評価され得る。これらのアッセイは、処置の前後の患者から得られたサンプルを用いて実施され得る。

【0088】

（癌を検出する方法）

一般的に、癌は、患者から得られた生物学的サンプルにおける1つ以上のママグロビンエピトープまたはこれに対する抗体の存在に基づいて、患者において検出され得る。換言すれば、このようなエピトープは、乳癌のような癌の存在または非存在を示すためのマーカーとして使用され得る。一般的に、このようなエピトープまたは抗体は、正常組織においてよりも腫瘍組織において少なくとも3倍高いレベルで存在すべきである。

【0089】

サンプル中のポリペプチドマーカーを検出するために結合剤を使用することに関して、当業者に公知の種々のアッセイ様式が存在する。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manu

a1、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと。一般的に、患者における癌の存在または非存在は、(a)患者から得られた生物学的サンプルを結合剤と接触させること；(b)この結合剤に結合するポリペプチドのレベルを、サンプル中において検出すること；および(c)このポリペプチドのレベルを、所定のカットオフ値(cut-off value)と比較すること、によって決定され得る。

【0090】

好ましい実施形態では、このアッセイは、サンプルの残渣(remainder)由来のポリペプチドに結合し、そしてそれを取り出すための固体支持体に固定された結合剤の使用を含む。次いで、レポーター基(reporter group)を含み、そして結合剤/ポリペプチド複合体に特異的に結合する検出試薬を使用して、結合したポリペプチドを検出し得る。このような検出試薬は、例えば、ポリペプチドもしくは抗体に特異的に結合する結合剤、またはこの結合剤に特異的に結合する他の因子(例えば、抗免疫グロブリン、プロテインG、プロテインA、またはレクチン)を含み得る。あるいは、競合的アッセイが使用され得る。ここでは、ポリペプチドをレポーター基で標識し、そして結合剤とサンプルとのインキュベーションの後に、固定された結合剤に結合させる。サンプルの成分が、結合剤への標識化ポリペプチドの結合を阻害する程度は、固定された結合剤とのサンプルの反応性の指標である。

【0091】

この固体支持体は、結合剤が結合され得ることが当業者に公知である、任意の材料であり得る。例えば、この固体支持体は、マイクロタイタープレート中の試験ウェルであっても、ニトロセルロース膜であっても、または他の適切な膜であってもよい。あるいは、この支持体は、ビーズまたはディスク(例えば、ガラス)、ガラス繊維、ラテックスであっても、あるいはプラスチック材料(例えば、ポリスチレンまたはポリ塩化ビニル)であってもよい。この支持体はまた、磁性粒子であっても、光ファイバー検出器(例えば、米国特許第5,359,681号に記載されるもの)であってもよい。この結合剤は、当業者に公知の種々の技術を使用して、この固体支持体上に固定され得、このような技術は、特許および

科学文献に十分記載されている。本発明の文脈において、用語「固定」とは、非共有結合（例えば、吸着）および共有結合（この薬剤とこの支持体上の官能基との間の直接の結合であっても、架橋剤による結合であってもよい）の両方をいう。マイクロタイタープレート中のウェルまたは膜への吸着による固定が、好ましい。このような場合、吸着は、適切な緩衝液中にあるこの結合剤を固体支持体と適切な時間接触させる工程によって達成され得る。この接触時間は、温度によって変化するが、代表的には、約1時間と約1日との間である。一般的には、プラスチックのマイクロタイタープレート（例えば、ポリスチレンまたはポリ塩化ビニル）のウェルを、約10 ng ~ 約10 µgの範囲の量の結合剤、好ましくは約100 ng ~ 約1 µgの範囲の量の結合剤と接触させる工程が、十分な量の結合剤を固定するに十分である。

【0092】

固体支持体への結合剤の共有結合は、一般的には、まず、この支持体を二官能性試薬と反応させる工程によって達成され得、ここで、この二官能性試薬は、この支持体およびこの結合剤上の官能基（例えば、ヒドロキシル基またはアミノ基）の両方と反応する。例えば、この結合剤は、ベンゾキノンを使用してか、またはこの支持体上のアルデヒド基をこの結合パートナー上のアミンおよび活性水素と縮合させることによって、適切なポリマーコーティングを有する支持体に共有結合され得る（例えば、Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook、1991、A12 ~ A13を参照のこと）。

【0093】

特定の実施形態において、このアッセイは、二抗体サンドイッチアッセイである。このアッセイは、固体支持体（一般的には、マイクロタイタープレートのウェル）上に固定されている抗体を、まずそのサンプルと接触させて、その結果、このサンプル内のポリペプチドがこの固定された抗体に結合するのを可能にすることによって、実施され得る。次いで、未結合サンプルが、この固定されたポリペプチド-抗体複合体から除去され、そしてレセプター基を含む検出試薬（好ましくは、このポリペプチド上の異なる部位に結合し得る2次抗体）が添加される

。次いで、この固体支持体に結合したままである検出試薬の量が、この特定のレポーター基に適切な方法を使用して、決定される。

【0094】

より詳細には、上記のように、一旦この抗体が支持体上に固定されると、この支持体上の残りのタンパク質結合部位は、代表的にはブロックされる。当業者に公知の任意の適切なブロック試薬（例えば、ウシ血清アルブミンまたは Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)）が使用され得る。次いで、この固定された抗体は、そのサンプルとともにインキュベートされ、そしてポリペプチドがこの抗体に結合するのを可能にする。このサンプルは、適切な希釈剤（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)）で希釈された後にインキュベートされ得る。一般的には、適切な接触時間（すなわち、インキュベーション時間）は、乳癌を有する個体から得られたサンプル中のポリペプチドの存在を検出するに十分な時間である。好ましくは、この接触時間は、結合ポリペプチドと非結合ポリペプチドとの間の平衡な状態で達成されるレベルの少なくとも約95%である結合レベルを達成するに十分である。当業者は、平衡を達成するために必要な時間が、一定時間にわたって生じる結合のレベルをアッセイすることによって容易に決定され得ることを認識する。室温では、約30分というインキュベーション時間が、一般的に十分である。

【0095】

次いで、非結合サンプルは、適切な緩衝液（例えば、0.1% Tween 20™）含有PBS）を用いてこの固体支持体を洗浄することによって除去され得る。次に、レポーター基を含む2次抗体が、この固体支持体に添加され得る。好ましいレポーター基としては、上記の基が挙げられる。

【0096】

次いで、検出試薬が、結合されたポリペプチドを検出するのに十分な時間の間、固定化抗体 - ポリペプチド複合体と共にインキュベートされる。適切な時間量は、一般的に、一定時間にわたって生じる結合のレベルをアッセイすることにより決定され得る。次いで、非結合検出試薬が除去され、そして結合された検出試薬が、レポーター基を使用して検出される。レポーター基を検出するために使用

される方法は、レポーター基の性質に依存する。放射活性基については、シンチレーション計数またはオートラジオグラフィ方法が、一般に適切である。分光学的方法が、色素、発光基および蛍光基を検出するために使用され得る。ビオチンは、異なるレポーター基（通常、放射活性基または蛍光基、あるいは酵素）にカップリングされたアビジンを使用して検出され得る。酵素レポーター基は、一般に、基質の添加（一般に、特定の時間の間）、続いてその反応産物の分光学的分析または他の分析により、検出され得る。

【0097】

癌（例えば、乳癌）の存在または非存在を決定するために、固体支持体に結合したままであるレポーター基から検出されるシグナルが、一般的には、所定のカットオフ値に対応するシグナルと比較される。1つの好ましい実施形態において、癌の検出のためのカットオフ値は、癌を有していない患者由来のサンプルとともに固定化抗体をインキュベートした場合に得られる、平均シグナルの平均値である。一般的に、所定のカットオフ値よりも標準偏差3つ分高いシグナルを発生するサンプルは、癌について陽性であるとみなされる。別の好ましい実施形態において、このカットオフ値は、Sackettら、*Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985、106~107頁の方法に従って、Receiver Operator Curveを使用して決定される。手短かに言うと、この実施形態において、このカットオフ値は、診断試験の結果についての各可能なカットオフ値に対応する、真の陽性割合（すなわち、感受性）および偽陽性の割合（100% - 特異性）の対のプロットから決定され得る。左側上方の隅に最も近いプロットに対するカットオフ値（すなわち、最も大きい領域を囲む値）が、最も正確なカットオフ値であり、そしてこの方法によって決定されたカットオフ値より高いシグナルを生成するサンプルは、陽性であるとみなされ得る。あるいは、このカットオフ値は、プロットに沿って左にシフトされて、偽陽性の割合を最小化し得るし、または右にシフトされて偽陰性の割合を最小化し得る。一般的に、この方法によって決定されたカットオフ値より高いシグナルを生成するサンプルは、癌について陽性であ

るとみなされる。

【0098】

特定の実施形態について（例えば、サンドイッチアッセイ）、抗原の定量測定が得られ得る。このような実施形態において、標準曲線が作製され得る。次いで、特定のサンプルにおける抗原レベルについて得られたシグナルは、標準曲線と比較され、定量を可能にし得る。このようなアッセイにおけるカットオフ値は、乳癌の存在を示すママグロビンの量であり得る。

【0099】

関連する実施形態において、このアッセイは、貫流型（flow-through）試験形式または小片型（strip）試験形式で実行され、ここで、結合剤は、膜（例えば、ニトロセルロース）上に固定化される。貫流型試験において、サンプル中のポリペプチドは、そのサンプルが膜を通過するときに、固定化結合剤に結合する。次いで、第2の標識結合剤が、その第2の結合剤を含む溶液が膜を貫流するときに、結合剤-ポリペプチド複合体に結合する。次いで、結合した第2の結合剤の検出が、上記のように実施され得る。小片試験形式において、結合剤が結合される膜の一端が、そのサンプルを含む溶液中に浸される。そのサンプルは、第2の結合剤を含む領域を通過して、固定化結合剤の領域まで膜に沿って移動する。固定化抗体の領域での第2の結合剤の濃縮は、癌の存在を示す。代表的に、その部位での第2の結合剤の濃縮は、視覚的に読取られ得るパターン（例えば、線）を生じる。このようなパターンがないことは、陰性の結果を示す。一般的に、膜上に固定化される結合剤の量は、その生物学的サンプルが、上記で考察した形式で、二抗体サンドイッチアッセイにおいて陽性シグナルを生成するのに十分であるレベルのポリペプチドを含む場合に、視覚的に識別可能なパターンを生成するよう選択される。このようなアッセイにおける使用のための好ましい結合剤は、抗体およびその抗原結合フラグメントである。好ましくは、膜上に固定化された抗体の量は、約25 ng～約1 μg、そしてより好ましくは約50 ng～約500 ngの範囲である。このような試験は、代表的に、非常に少量の生物学的サンプルを用いて実施され得る。

【0100】

もちろん、本発明のエピトープおよび結合剤を用いる使用に適切な、多くの他のアッセイプロトコルが存在する。上記の記載は、例示であることのみ意図される。例えば、上記のプロトコルが、生物学的サンプル中でこのようなポリペプチドに結合する抗体を検出するために本明細書中に記載されるポリペプチドを使用するように容易に改変され得ることが、当業者には明らかである。このようなママグロビンエピトープ特異的抗体の検出は、癌の存在と相関し得る。他の好ましいアッセイプロトコルとしては、レーザースキャニングサイトメトリー（細胞を標識抗体で染色する、顕微鏡技術）および免疫組織化学的検出が挙げられる。このような技術は、一般的に、当該分野で公知の技術に従って実行され得る。本明細書中に提供されたような抗体をさらに使用して細胞同定およびインビトロでの分類を容易にし得る。このことによってママグロビン（または異なるママグロビンレベル）を発現する細胞の選択が可能になる。好ましくは、このような方法で使用するための抗体は、検出可能なマーカーに連結される。適切なマーカーは当該分野で周知であり、そしてそれらとしては、放射性核種、発光基、蛍光基、酵素、色素、定常イムノグロブリンドメインおよびビオチンが挙げられる。1つの好ましい実施形態において、例えば、フルオレセインのような蛍光マーカーに連結された抗体が細胞と接触され、次いで、これは、蛍光活性化セルソーティング（FACS）によって分析される。

【0101】

別の実施形態において、上記ポリペプチドは、癌の進行のためのマーカーとして使用され得る。この実施形態において、癌の診断のための上記のようなアッセイが、経時的に実施され得、そして反応性ポリペプチドのレベルの変化が評価され得る。例えば、このアッセイは、6ヶ月～1年の期間に24～72時間ごとに実施され得、その後も必要ならば実施され得る。一般的に、癌は、結合剤によって検出されるポリペプチドのレベルが経時的に増加する患者において進行している。対照的には、この癌は、反応性ポリペプチドのレベルが一定のままであるかまたは時間とともに減少するかのいずれかである場合には、進行していない。

【0102】

特定のインビボ診断アッセイは、腫瘍に対して直接実施され得る。1つのこの

ようなアッセイは、腫瘍細胞を結合剤と接触させる工程を包含する。次いで、結合された結合剤が、レポーター基を介して直接的または間接的に検出され得る。このような結合剤はまた、組織学的適用において使用され得る。

【0103】

感度を改善するために、本明細書中に記載のアッセイは、他の腫瘍関連抗原を検出するためのアッセイと組み合わせられ得る。異なるタンパク質に特異的な結合剤は、シグナルアッセイにおいて組み合わせられ得ることが明らかである。腫瘍タンパク質マーカーの選択は、最適な感度を生じる組み合わせを決定するための慣用的な試験に基づき得る。

【0104】

本発明の代替的な実施形態によって、癌は、患者から得られる生物学的サンプルにおけるママグロビンポリヌクレオチドの存在に基づいて患者において検出され得る。換言すれば、このようなポリヌクレオチドを、マーカーとして使用し、癌（例えば、乳癌）の存在または非存在を示し得る。特に、ポリヌクレオチドプライマーおよびポリヌクレオチドプローブを使用し、ママグロビンをコードするmRNAのレベルを検出し得る。このmRNAは、乳癌の存在または非存在を示す。一般的には、正常組織より少なくとも2倍高い、好ましくは3倍高いレベルのママグロビンポリヌクレオチドの存在は、乳癌を示す。

【0105】

本明細書中で提供されたアッセイのために用いられ得る種々の体液および腫瘍サンプルを含む、種々の生物学的サンプルが存在する。好ましいサンプルは、血液およびその画分（例えば、末梢血、血清または血漿）である。一般的には、RNAは、血液またはその画分から任意の標準的な技術を用いて単離され得る。

【0106】

PCR分析またはハイブリダイゼーション分析の前に、サンプルを、任意の標準的な技術によって処置し、上皮細胞を除去する。本発明の文脈において、このような処置がアッセイの感度を約10倍まで改善することを見出した。上皮細胞を取り除く1つの方法は、Dyna1の上皮細胞富化ビーズ（Dyna1, Oslo, Norway）を使用する。この方法は、製造業社の説明書に従って使用

され得る。分析のための好ましいサンプルは、上皮細胞を除去した患者の全血サンプルである。

【0107】

特定の実施形態において、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーが、生物学的サンプル由来のママグロビンcDNAの一部を増幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づくアッセイにおいて使用され得、このオリゴヌクレオチドプライマーのうちの少なくとも1つは、ママグロビンをコードするポリヌクレオチドに特異的である(すなわち、ハイブリダイズする)。次いで、この増幅されたcDNAは、当該分野で周知の技術(例えば、ゲル電気泳動およびオートラジオグラフィ)を使用して、分離および検出される。同様に、ママグロビンポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブが、生物学的サンプル中のママグロビンの発現を検出するために、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用され得る。

【0108】

アッセイ条件下でのハイブリダイゼーションを可能にするために、オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブは、少なくとも10ヌクレオチドの長さ、好ましくは少なくとも20ヌクレオチドの長さのママグロビンポリヌクレオチドの一部に対して、少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%そしてより好ましくは少なくとも約90%の同一性を有する、オリゴヌクレオチド配列を含むべきである。本明細書中に記載される診断方法において有用に使用され得るオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブは、好ましくは少なくとも10~40ヌクレオチドの長さである。PCRに基づくアッセイおよびハイブリダイゼーションアッセイの両方についての技術は、当該分野で周知である(例えば、Mullisら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263、1987; Erlich編、PCR Technology、Stockton Press、NY、1989を参照のこと)。

【0109】

1つの好ましいアッセイは、RT-PCRを使用し、RT-PCRにおいては

、PCRが、逆転写と組み合わせて適用される。代表的には、RNAが、生検組織のような生物学的サンプルから抽出され、そしてcDNA分子を生成するように逆転写される。少なくとも1つの特異的プライマーを使用するPCR増幅は、例えば、ゲル電気泳動を使用して分離および可視化され得る、cDNA分子を生じる。増幅は、試験患者および癌に罹患していない個体から採取された、生物学的サンプルに対して実施され得る。この増幅反応は、2桁の大きさに及ぶcDNAのいくつかの希釈物に対して実施され得る。非癌性サンプルの同じ希釈物と比較して、試験患者サンプルのいくつかの希釈物における2倍以上の発現の増加は、代表的に陽性とみなされる。

【0110】

このようなアッセイで使用され得るなお別の増幅技術は、リアルタイムPCRである(Gibson et al., Genome Research 6:995-1001, 1996; Heid et al., Genome Research 6:986-994, 1996を参照のこと)。リアルタイムPCRは、増幅の間のPCR産物の蓄積のレベルを評価する技術である。この技術は、複数のサンプルにおけるmRNAレベルの定量的評価を可能にする。簡単には、mRNAは、標準的な技術を用いて目的の細胞から最初に抽出される。リアルタイムPCRは、例えば、Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA) 7700 Prism装置を使用して、行われ得る。一致するプライマーおよび蛍光プローブは、例えば、Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA)により提供されるプライマー発現プログラムを用いてママグロビンについて設計され得る。プライマーおよびプローブの最適濃度は、当業者により、最初に、決定され得、そしてコントロール(例えば、 β -アクトチン)プライマーおよびプローブは、例えば、Perkin Elmer/Applied Biosystem (Foster City, CA)から商業的に入手され得る。サンプルにおけるママグロビンRNAの量を定量するために、検量線が、ママグロビン遺伝子を含むプラスミドを用いて並行して作成される。目的の遺伝子の $10^1 \sim 10^6$ のコピーの範囲の標準希釈は、一般に十分であ

る。さらに、検量線は、コントロール配列について作成される。これは、比較目的のために、組織サンプルの初期のRNA量の、コントロールの量に対する標準化を可能にする。

【0111】

特定のインビボ診断アッセイは、腫瘍に対して直接実施され得る。1つのこのようなアッセイは、腫瘍細胞を結合剤と接触させる工程を包含する。次いで、結合された結合剤が、レポーター基を介して直接的または間接的に検出され得る。

【0112】

上記のように、感度を改善するために、複数の乳房腫瘍タンパク質マーカーが、所定のサンプルにおいてアッセイされ得る。例えば、本明細書中に記載されるようなポリヌクレオチドプローブまたはプライマーは、異なるマーカーを検出するように設計されたプローブおよびプライマーと同時に使用され得る。乳房腫瘍マーカーの選択は、最適な感度を生じる組み合わせを決定するための慣用的実験に基づき得る。

【0113】

(診断キット)

本発明は、上記の診断方法のうちのいずれかにおける使用のためのキットをさらに提供する。このようなキットは、代表的には、診断アッセイを実施するために必要な2つ以上の成分を含む。成分は、化合物、試薬、容器および/または装置であり得る。例えば、キット中の1つの容器が、ママグロビンエピトープに特異的に結合する、モノクローナル抗体またはそのフラグメントを含み得る。このような抗体またはフラグメントは、上記のように、支持体材料に結合して提供され得る。1つ以上のさらなる容器が、このアッセイにおいて使用される要素(例えば、試薬または緩衝液)を含み得る。このようなキットはまた、またはあるいは、抗体結合の直接検出または間接検出に適切な、レポーター基を含む上記のような検出試薬を含み得る。

【0114】

好ましいキットは、サンドイッチアッセイで使用するために設計されたキットである。このようなキットは、このようなアッセイに使用するために2以上の成

分を含む。例えば、このようなキットは、検量線の作成に使用する組換えママグロビンに基づく標準を含み得る。このようなキットは、アッセイ内で使用するための1つまたは両方の抗体（すなわち、捕捉抗体および/またはシグナル抗体）を、ママグロビン結合の検出に使用するさらなる試薬を伴って、または伴わずに含み得る。

【0115】

キットは、上記のような少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを含み得る生物学的サンプル中で、ママグロビンをコードするmRNAのレベルを検出するように設計した。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用され得る。このようなキット中に存在し得るさらなる成分としては、ママグロビンポリヌクレオチドの検出を容易にするための、第2のオリゴヌクレオチドおよび/または診断試薬もしくは診断容器が挙げられる。

【0116】

以下の実施例は、例示として提供され、限定としては提供されない。

【0117】

（実施例）

（実施例1）

（ママグロビンエピトープの同定および抗体の調製）

本実施例は、抗ママグロビン抗体およびエピトープマッピングの調製を例示する。

【0118】

ウサギおよびマウスを、全長ヒトママグロビタンパク質で免疫化した。マウスモノクローナル抗体を、標準的なハイブリドーマ技術で単離した。ウサギのモノクローナル抗体を、選択細胞質抗体法（SLAM）技術を用いて単離した。これらの抗体に加えて、ママグロビンのC末端に対して指向される精製されたポリクローナル抗体もまた展開され、続いてC末端ペプチドでウサギを免疫化した。

【0119】

図1Aは、ママグロビンに対して展開されたモノクローナル抗体を例示する。

ウサギのモノクローナル抗体に対して、I g 可変領域を配列決定した。各ウサギの抗ママグロビンモノクローナル抗体の可変領域の配列を、図1B～1Cに示す。

【0120】

各モノクローナル抗体のエピトープ結合領域を良好に規定するために、ママグロビタンパク質配列全体にわたる一連のペプチドを生成した。ママグロビンのアミノ酸配列を図2に示し、そして対応するペプチドを示す。ペプチドに加えて、ママグロビンの短い組換え形態を、プロテアーゼで切断することによって生成した。96ウェルマイクロタイタープレート(Costar)を、200ng/ウェルのペプチドまたは組換え抗原のいずれかでコーティングした。4℃で一晩かけてコーティングした。次いで、プレートを吸引し、そして1%(w/v)BSAを含むリン酸緩衝液生理食塩水を用いて2時間室温で保護し、次いで0.1%のTween20を含むPBS(PBST)で洗浄した。PBST中の異なる希釈度(1000～7.8ng/mg)の精製したウサギの抗体を、このウェルに添加し、そして室温で30分間インキュベートした。このウェルをPBSTで6回洗浄し、次いでさらに30分間かけて1/2000希釈度で結合させたタンパク質A-HRPでインキュベートした。プレートをPBST中で6回洗浄し、次いでさらに15分間、テトラメチルベンジジン(Tetramethylbenzidine)(TMS)基質でインキュベートした。この反応を1Nの硫酸を添加することによって停止させ、そしてプレートをELISAプレートリーダーを使用して450nmで読み取った。

【0121】

マウスのモノクローナル抗体を用いるELISAを、アッセイにおいてニートな状態で実施した組織培養物由来の上清で行った。

【0122】

このデータの要約を図3Aに示す。影を付けた細胞は、抗体に対して陽性であると考えられる。3種の異なるエピトープの反応性を、図3B、3Cおよび3Dに示す、ここで2D3は、pro5およびN末端組換え体と反応し、そして29C11は、pro2と弱く反応する。抗ママグロビン抗体のエピトープ結合部位

を、図1Aに要約する。

【0123】

エピトープのマッピングに続き、抗体を、ママグロビンを発現する細胞株(MB415乳癌細胞)でのFACS分析で試験した。抗体結合の特異性について確認するために、ママグロビンを発現しないMCF-7細胞をまた、同一の条件下でFACS分析によって試験した。細胞を、20分間4%のホルムアルデヒドで固定し、その後2回洗浄した。次いで、細胞を、10分間0~0.1%のサポニンを含むPBSで透過処理した。0.5 μ gの抗ママグロビンモノクローナル抗体を添加し、そして細胞を室温で30分間インキュベートし、その後2回洗浄し、そしてFITCで標識したヤギの抗ウサギまたはマウス第二抗体で20分間インキュベートした。2回洗浄した後、細胞を、Excellibur蛍光活性化細胞選別機で分析した。この結果を、図4Aに例示する。

【0124】

ウエスタンブロット分析をまた、抗ママグロビンモノクローナル特異性を特徴づけするために使用した(図5)。SDS-PAGEを、1)MDM-MB-415細胞が増殖する培地上、2)MDA-MB-415細胞溶解物上、および3)細菌的に発現した組換えママグロビン上で実施した。タンパク質をニトロセルロースに移し、次いで抗ママグロビンモノクローナル抗体に対して、1 μ g/mlの抗体濃度でウエスタンブロットした。タンパク質を、ヤギの抗マウスモノクローナル抗体またはタンパク質A-Sepharoseのいずれかに結合されるワサビペルオキシダーゼ(HRP)を使用して検出した。精製した抗ママグロビンポリクローナル抗体は、細菌で発現された組換えママグロビンならびにMDA-MB-415乳癌細胞で発現および分泌されたママグロビンを認識した。マウスおよびウサギの全てのモノクローナル抗体は、組換え細菌で発現されたママグロビンを認識した。1971H11を除いて、全てのマウスのモノクローナル抗体は、細胞培地中に分泌されるママグロビン、または細胞質内で発現されるママグロビンを認識した。ウサギのママグロビン抗体14A12、6B12および2D3は、細菌で発現されたママグロビン、ならびに細胞質で発現されたママグロビンおよび培地中に分泌されるママグロビンを認識した。培地中に分泌されたマ

マグロビンを認識し得ないが、ウサギのモノクローナル抗体6A1は、細菌で発現されたママグロビンおよびMB415細胞の細胞質で発現されたママグロビンを認識し得た。モノクローナル抗体197-1H11および6A1がママグロビンの特異的形態に関連して無力であることは、グリコシル化のような差動的翻訳後改変に影響を与えており、そして/または抗体とママグロビンの親和性に関係しているようである。

【0125】

どの組織がママグロビンを発現しているかを決定するために、免疫組織化学(IHC)分析を、組織分泌の多様な範囲で実施した。組織サンプルを、24時間かけてホルマリン溶液中で固定し、そしてパラフィン中で包埋し、その後に10ミクロンの断片中にスライスさせた。組織断片を透過化処理し、そして1時間かけて抗ママグロビン抗体でインキュベートした。HRP標識した抗マウスまたは抗ウサギ抗体を使用して、ママグロビン免疫反応性を視覚化した。図6は、ママグロビタンパク質の組織特異的分布を要約した。ママグロビンは、乳房の組織中で高く発現したが、試験した他の以下の組織では見出されなかった：副腎、頸部、結腸、十二指腸、胆嚢、回腸、腎臓、卵巣、膵臓、耳下腺、腺、前立腺、骨格筋、脾臓、および精巣。

【0126】

(実施例2)

(ママグロビンのためのサンドイッチ免疫アッセイ)

本実施例は、血清中でママグロビンを検出するために、本明細書中に提供される抗体の使用を例示する。

【0127】

ママグロビンのC末端16アミノ酸ペプチドに関する、モノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体967を、MB415細胞の溶解物(MB415細胞の細胞上清)中、およびまた乳癌患者の血清中のママグロビンを検出する能力について、サンドイッチELISAで評価した。抗体を、異なるエピトープを検出するための能力に基づいて組合せた。以下に、試験したサンドイッチのいくつかの組合せを記載する。全てのアッセイにおいて、検量線を、組換えママグロ

ピンを雄性の血清をスパイクすることによって構築した。

【0128】

(マウス/ウサギ抗体サンドイッチ)

アッセイを、サンドイッチの一部としてヤギの抗マウスIgGの固相を使用する、マウスモノクローナル抗体を捕捉するように設計した。96ウェルプレート(Costar Corning)を、200ng/ウェルのヤギの抗マウスIgG(Rockland抗体、Rockland, Me)で一晩4でコーティングした。プレートを、0.05%のTween20を含むリン酸緩衝液生理食塩水(PBS)(PBST)中で洗浄し、次いでリン酸緩衝液生理食塩水(PBS)中の1%BSAで2時間かけて保護した。次いで、マウスのモノクローナル上清を、PBSとプレートの1:10希釈液(50 μ l)に添加し、そして室温で4時間インキュベートした。プレートをPBS Tween20(PBST)中で6回洗浄し、正常な1%のマウス血清および正常な1%ヒト血清で1時間かけて保護し、次いでさらに洗浄した。サンプルおよび標準をこのウェルに適用し、このプレートを室温で1時間かけてインキュベートした。次いで、このプレートを、0.05%のTweenを含むPBS中で6回洗浄した。ビオチン化した31A5または2D3を、PBSおよび正常な1%のマウス血清中で1 μ g/mlの結合体として使用した。これらを、室温で1時間かけてインキュベートし、次いでPBST中で6回洗浄した。ストレプトアビジンHRPと正常な1%のマウス血清を含むPBSの1:1000希釈液(50 μ l)を添加し、そしてこのプレートを室温で30分間インキュベートした。この時、プレートをさらに6回洗浄した。次いで、TMB(テトラメチルベンジジン)基質(KirkgaardおよびPerry)を、このウェルに添加し、そしてさらに15分間インキュベートした。この反応を1NのH₂SO₄(100 μ l)で停止させ、そして発生するシグナルを、450nmで読み取った。このアッセイにおけるpgママグロビンに関連する検量線を、正常な雄性血清にスパイクした組換えママグロビンを使用して構築し、そしてこの試験で実施したサンプルを、この検量線を使用して定量した。

【0129】

(ウサギ/ウサギ抗体サンドイッチ)

2種のアッセイを実施した。第1は、固相としてアフィニティー精製したウサギ抗967ペプチド(C末端16アミノ酸ペプチド)およびシグナル抗体としてビオチン化した2D3ウサギモノクローナルを利用した。第2は、固相抗体として2D3およびシグナル抗体としてビオチン化した31A5を使用した。第1のアッセイにおいて、このアフィニティー精製したポリクローナル抗体を、pH9.5の炭酸/重炭酸緩衝液(50mM)中で96ウェルプレート(200ng/ウェル)において、4で一晩かけてコーティングした。プレートを、PBSTで洗浄し、次いで室温で2時間かけて1%のBSA(PBS中)で保護した。次いで、血清(50 μ l)をプレートに添加し、室温で1時間かけてインキュベートした。次いで、プレートを0.05%のTween20を含むリン酸緩衝液生理食塩水で6回洗浄した。次いで、正常の1%ウサギ血清を含むPBS中のビオチン化した2D3モノクローナル抗体(2 μ g/ml)を、添加して、そしてプレートを、室温で1時間かけてさらにインキュベートした。さらに6回洗浄した後、ストレプトアビジンHRPと正常な1%のマウス血清を含むPBSの1:10000希釈液(50 μ l)を添加し、そしてこのプレートを室温で30分間インキュベートした。この時、プレートをさらに6回洗浄した。TMB基質でシグナルを展開することを、先に記載した。

【0130】

第2のアッセイにおいて、2D3を、200ng/ウェルの96ウェルプレート(Coster/Corning, Cambridge MA)において4で一晩かけてコーティングし、PBST中で洗浄し、次いで室温で2時間かけて保護した。次いで、血清(50 μ l)をプレートに添加し、そして室温で1時間かけてインキュベートした。次いで、プレートを0.05%のTween20を含むリン酸緩衝液生理食塩水で6回洗浄した。次いで、正常な1%のウサギ血清を含むPBS中の、ビオチン化した31A5モノクローナル抗体(0.5 μ g/ml)を、添加し、そしてこのプレートを、室温で1時間かけてさらにインキュベートした。さらに6回洗浄した後、ストレプトアビジンHRPおよびTMBインキュベーションを、先に記載のように実施した。

【0131】

図7A～7Cは、ビオチン化した31A5、6B12または2D3を含むマウスモノクローナル抗体のサンドイッチングおよびMB415溶解物および上清中のママグロビンを検出する能力の例である。図8において、ビオチン化したモノクローナル2D3と組合せた、ポリクローナル抗967血清についての検量線の直線部分を示す。この線は、転移性乳癌を有する7人の患者のママグロビン血清サンプルを定量するために使用した。これらの5/7が、1～10ng/mlの範囲の血清レベルを有するママグロビンについて陽性であった。同じ実施例において、9/11の正常なサンプルは、陰性であり、そしてカットオフ未満であった。ママグロビンおよびママグロビンRNAは、図9に示されるように2D3および29C11のサンドイッチを使用する、これらと同じ乳癌患者のサンプルにおいて検出可能であった。全実験において、ママグロビンのレベルは、検量線を使用して得られ、そして陰性コントロールおよび陽性コントロールは、期待されたものであった。

【0132】

(実施例3)

(ママグロビンに特異的な抗オリゴサッカライド抗体の同定)

本実施例は、グリコシル化感受性様式でママグロビンに特異的に結合する抗体(乳癌細胞において発現されるママグロビンの示差的にグリコシル化される部位に対する抗体を含む)の調製を示す。

【0133】

異なるグリコシル化の組み合わせに対する20～30個の抗体を含む抗体ライブラリー(Glycotech Corp., Rockville MD)を、従来のELISA技術およびブロットィング技術を介して、乳癌腫細胞株由来のネイティブママグロビンを使用してスクリーニングする。ネイティブママグロビンは、標準的生化学的精製手順を使用して、MDA-MB-415乳癌腫細胞から精製する。ウサギおよびマウスの両方を、ネイティブママグロビンで免疫する。SLAM技術を使用して、ネイティブママグロビンに結合するが脱グリコシル化酵素を使用してオリゴサッカライドを奪われたママグロビンには結合しない、

ウサギモノクローナル抗体を産生する。同一のアプローチを使用して、ネイティブマムグロビンで免疫したマウスから産生されるハイブリドーマ上清をスクリーニングする。

【0134】

ウサギおよびマウスにて産生される抗体についてのグリコシル化エピトープを、糖質(carbohydrate)ライブラリー(Glycotech Corp.)を使用してマッピングする。この糖質ライブラリーは、その抗体に対する糖質(carbohydrate)エピトープの規定を可能にする、種々の群のオリゴサッカライドの組み合わせからなる。マムグロビンに特異的な抗オリゴサッカライド抗体の同定、単離および特徴づけの際、サンドイッチELISAアッセイを実施する。このアッセイにおいて、乳癌患者由来の血清から、抗マムグロビンポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体(マムグロビンのC末端の16個のアミノ酸であるエピトープに結合する)を用いてマムグロビンを捕捉し、そしてその抗糖質抗体を検出に使用する。得られたELISAアッセイは、乳癌について感度が良くかつ正確な診断を提供する。

【0135】

(実施例4)

(マムグロビンについてのヒトCD4 T細胞エピトープの同定)

本実施例は、マムグロビンを認識するCD4 T細胞の産生を示す。

【0136】

CD4 T細胞応答を、マムグロビタンパク質配列全体にわたって重複する20マーペプチドでパルスした樹状細胞(DC)を使用して正常なドナーのPBMCから産生した。CD4+ T細胞を、重複するペプチド(各10μg/mL)の混合物でパルスしたDCを用いて3~4回刺激した。一次刺激はIL-6およびIL-12を含み、そして他のすべての刺激は0.5ng/mL IL-2および5ng/mL IL-7を含む、Iscoves 改変Dulbecco培地(IMDM)にて行った。それらのペプチドを図10に示す。その後これらの株を、プライムしたペプチドまたはE coli由来の組換えマムグロビンとの反応性について、アッセイした。図11Aおよび11Bに示されるように、多数の

CD4 T細胞株が、プライムしたペプチドおよびママグロビタンパク質との反応性を示した。ペプチド5A (EYKELLQEFIDDNATTNAID: 配列番号4)とこれらの株の優勢な反応性が出現した。このペプチド5Aは、そのママグロビン配列のアミノ酸41~60に対応する。これらの結果は、ペプチド5Aが、ママグロビンの免疫原性CD4エピトープを示すことを示す。

【0137】

(実施例5)

(ママグロビンについてのヒトCD8 T細胞エピトープの同定)

本実施例は、ママグロビンを認識するCD8 T細胞の産生を示す。

【0138】

HLA A2Kbマウスを、HLA A2に結合することが予期された9マーペプチド(図12に示される)で免疫した。免疫は、フロイント不完全アジュバント中にある140µgのB型肝炎ウイルスコアペプチド(Thペプチド)とともに100µgのペプチドを使用して、足蹠(footpad)に皮下に実施した。免疫の3週間後、脾細胞を取り出し、そしてペプチドでパルスしたAPCとともにインビトロで培養してCTL株を惹起した。その後、標準的クロム放出アッセイにおいて、ペプチドでパルスした、ママグロビンで形質導入した標的細胞の認識についてCTL株を評価した。次いで、ペプチドでパルスした標的を認識するCTL株を、形質導入されて安定にママグロビタンパク質を発現する標的に関して試験した。ママグロビンのアミノ酸2~10に対応する9マーペプチドKLLMVLMLA(mgb1;配列番号5)で免疫したマウス由来のCTL株は、ペプチドでパルスされた標的およびママグロビンで形質導入された標的の両方を認識することが示された(図13A~13Cおよび14A~14C)。これらのデータは、この9マーペプチドKLLMVLMLA(配列番号5)が、ママグロビンが天然に保有するCTLエピトープでありかつHLA A2により拘束されることを、示す。

【0139】

(実施例6)

(患者の血液サンプルにおけるママグロビンRNAの検出)

本実施例は、乳癌を診断する目的のために血液中のママグロビン発現を検出するためのPCRの使用を示す。

【0140】

RNA抽出：RNAを、凍結した腫瘍および正常組織および細胞株(MB415)から以下のように抽出した。組織サンプルを、ホモジナイザー(Polytron)を使用して、1ml/組織50~100mgのTrizol試薬(Gibco、BRL)中でホモジナイズし、そして細胞を、1ml/5~10×10⁶細胞のTrizol試薬と混合した。。次いで、ホモジナイズしたサンプルを室温で5分間インキュベートし、続いて1mlのTrizol試薬あたり0.2mlのクロロホルムを添加した。サンプルチューブに蓋をし、そして15秒間激しく振盪し、続いて室温で2~3分間さらにインキュベーションした。サンプルを2~8で15分間、12,000gで遠心分離し、そして上部水相を取り出した。このRNA調製物を新しいチューブに移し、そしてホモジネーション工程にて使用したTrizol試薬1mlあたり0.5mlのイソプロピルアルコールを添加して沈殿させた。サンプルを室温で10分間インキュベートし、次いで2~8で12,000gにて10分間遠心分離した。その上清をゲル様ペレットから除去し、そしてそのペレットを75%エタノール(1ml/Trizol 1ml)で1回洗浄した。そのサンプルを混合し、次いで2~8で5分間7,500gで遠心分離した。上清を除去し、そしてそのRNAペレットを室温で短く乾燥し、そしてRNaseを含まない水に溶解した。

【0141】

単離したRNAをDNaseで処理して、いかなるDNA混入物をも除去した。75μlのヌクレアーゼを含まない水および第1鎖緩衝液(Gibco BRL)中のRNA(50μg)を、RNaseインヒビターであるRNasin(Promega)の存在下で、37で30分間、DNaseI(Ambion)とともにインキュベートした。次いで、その反応混合物を、フェノール/クロロホルムを用いて沈殿させ、そしてエッペンドルフ遠心分離機の最大速度で5分間遠心分離した。最上層を新しいチューブに移し、そのチューブに3M酢酸ナトリウムを20μlおよび100%冷エタノールを440μl添加した。この混合

物をボルテックスし、そして再度5分間遠心分離した。上清を捨て、そしてペレットを75%冷エタノールで洗浄しそして遠心分離した。そのRNAペレットを、RNaseを含まない水に1~2 µg/mlで再懸濁した。

【0142】

RNAを、Dyna1's Epithelial cell濃縮ビーズおよびDyna1's mRNA Direct kit(Dyna1、Oslo、Norway)を製造業者の指示書に従って使用して、全血から抽出した。Dyna1抽出キットを介して抽出したRNAを、下記に示される20mlのReverse転写混合物中にすぐに再懸濁し、そして逆転写させた。

【0143】

逆転写：リアルタイムPCR組織パネルにおける使用のためのcDNAを、以下のように調製した：25 µgのRNAを、25 µlのOligo dT(Boehringer Mannheim)(100 ng/ml)とともに70 で10分間インキュベートし、次いで、0.5 mM dNTP、1000単位のRNasin、0.02 mMジチオスレイトールおよびSuperscript II(Gibco、BRL)を含む、125 µlの希釈した逆転写酵素緩衝液(Gibco、BRL)とともに42 で1時間インキュベートした。次いで、この反応混合物を、リアルタイムPCRにおける使用のために4 まで冷却するかまたは凍結した。この上皮から抽出した材料についての反応混合物は、20 µlのSuperscript RT混合物(4 µlの5×緩衝液、2 µlの0.1 M DTT、1 µl 10 mM dNTP混合物、1 µl(200単位)のsuperscript IIおよび12 µlのRNaseを含まない水)であった。次いでこの混合物を50 で5分間インキュベートし、次いで42 で50分間インキュベートし、次いで70 で15分間不活化した。

【0144】

リアルタイムPCR：リアルタイムPCR分析を、Perkin Elmer/Applied Biosystems 7700 Prism装置にて実施した。一致するプライマーおよび蛍光プローブを、Perkin Elmer/Applied Biosystems(Foster City、CA)によ

り提供されるプライマー発現プログラムに従って、目的の遺伝子の各々について設計した。そのように作製したプライマーおよびプローブは、リアルタイムPCRにおいて、ユニバーサル熱サイクリングプログラムにて使用し得る。最初に、そのプライマーおよびプローブを、チェッカーボード (checker board) アプローチを使用して、最適な濃度を決定するために力価測定 (t i t r a t e) した。標的腫瘍由来のcDNAのプールを、この最適化プロセスにおいて使用した。次いで、これらの試薬を、その最適な濃度でリアルタイムPCRにて使用した。この反応は、25 μ lで実施した。すべての場合において、最終プローブ濃度は155 nMであった。dATP、dCTPおよびdGTPは0.2 mMであり、そしてdUTPは0.4 mMであった。Amplitaq gold およびAmperase UNG (Perkin Elmer / Applied Biosystems、Foster City CA) を、1反応あたり0.625単位および0.25単位で使用した。MgCl₂は、最終濃度5 mMであった。微量のグリセロール、ゼラチンおよびTween 20 (Sigma Chem Co、St Louis、MO) を添加して、この反応を安定化した。各反応は2 μ lのテンプレートを含んだ。 - アクチンプライマーおよびプローブは、Perkin Elmer / Applied Biosystems (Foster City、CA) から入手し、そしてそのサンプル中の - アクチンの存在を定量するために類似した様式で使用した。フォワードプライマーは900 nM、リバースプライマーは300 nMであった。

【0145】

そのサンプル中の特定のRNAの量を定量するために、標準曲線を、目的の遺伝子を含むプラスミドを使用して、並行して作製した。標準曲線は、このアッセイにおいて使用した初期cDNA濃度に関連する、リアルタイムPCRで決定したCt値を使用して作製した。目的の遺伝子の10コピー~10⁶コピーの範囲の標準希釈物を、この目的のために使用した。さらに、標準曲線を、200 fg ~ 2000 pgの範囲の - アクチンについて作製した。これにより、組織サンプルの初期RNA含量を、比較目的のために - アクチンの量へと標準化することが可能になった。

【0146】

使用したプライマーおよびプローブは、表1に示されるようであった。

【0147】

(表I)

(ママグロビンプライマーおよびプローブ)

【0148】

【表1】

	ママグロビン	配列番号
フォワードプライマー	TGCCATAGATGAATTGAAGGAATG	8
リバースプライマー	TGTCATATATTAATTGCATAAACACCTCA	9
プローブ	TCTTAACCAAACGGATGAAACTCTGAGCAATG	10

このママグロビン遺伝子配列は、3つのエクソンを含む。エクソン1は塩基92～1110にわたり、エクソン2は塩基1713～1900にわたり、そしてエクソン3は塩基3789～3974にわたる。開始Metは、塩基1056にあり、そして終止コドンは塩基3725にある。定量的リアルタイムPCRに使用するプライマーおよびプローブはエクソン2に位置するが、しかしリバースプライマーはエクソン2とエクソン3との間で分割されている。このプライマー配置は、ゲノムDNAの増幅を排除しない。組織サンプルすべてを、Ambion DNase Iを用いてDNase処理した。これらのサンプルは、使用前に混入DNAの存在について試験した。Dynal's Epithelial cell濃縮ビーズおよびDynal's mRNA Directキットを使用して全血から抽出したRNAは、DNase処理しなかったが、これは、RNAのみについての非常に特異的単離法である。

【0149】

図15は、乳癌組織について高い程度の特異性を示すママグロビンについての組織分布を示す。陽性であることが示された皮膚サンプルは、乳房整復部(reduction)に由来した。図16は、乳癌細胞株MB415にて検出可能な

ママグロビンメッセージのコピーを細胞の量の関数として示し、これは、1つの細胞が約10000コピーを有することを示す。図17は、Dyna1単離法を使用して転移性乳癌の患者の末梢血から単離した上皮細胞におけるママグロビンの検出を、正常な血液サンプルからの類似の単離物と比較して示す。33個の転移性サンプルおよび11個の正常サンプルを試験した。このデータは、ママグロビンが転移性乳癌の個体の血液にて検出され得ること、およびこのような検出を使用してこの疾患を診断し得ることを示す。

【0150】

本発明の特定の実施形態が例示目的のために本明細書中に記載されているが、種々の改変が本発明の趣旨および範囲から逸脱することなくなされ得ることが、上記から理解される。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲によるように制限される以外は、制限されない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Corixa Corporation
 Fangex, Gary R.
 Foy, Theresa M.
 Houghton, Raymond L.
 Reed, Steven G.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE
 THERAPY, DIAGNOSIS AND MONITORING OF BREAST CANCER

<130> 210121.4792C

<140> PCT
 <141> 2000-05-26

<160> 45

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 1
 Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Val Glu
 20

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 2
 Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu Asn Gln
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 3
 Ser Gln His Cys Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val
 1 5 10 15
 Ile Ser Lys Thr Ile
 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 4
 Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr
 1 5 10 15
 Asn Ala Ile Asp
 20

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 5
 Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala
 1 5

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 6
 Gln Glu Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile
 1 5 10

<210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 7
 Leu Lys Glu Cys Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu
 1 5 10

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 8
 tgccatagat gaattgaagg aatg 24

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 9
 tgtcatatat taattgcata aacacctca 29

<210> 10
 <211> 32
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 10

tcttaaccaa acggatgaaa ctctgagcaa tg

32

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 11

Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu

1 5 10 15

Ser Asn Val Glu

20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 12

Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile

1 5 10 15

Asp Glu Leu Lys

20

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 13

Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu Asn Gln

1 5 10 15

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 14

Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile

1 5 10 15

Asp Glu Leu Lys

20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 15

Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile

1 5 10 15

Asp Glu Leu Lys
20

<210> 16
<211> 21
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 16
Ser Gln His Cys Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val
1 5 10 15
Ile Ser Lys Thr Ile
20

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 17
Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile
1 5 10 15
Asp Glu Leu Lys
20

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 16
Ser Gln His Cys Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val
1 5 10 15
Ile Ser Lys Thr Ile
20

<210> 19
<211> 405
<212> DNA
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 19
caccatggag acaggcctgc gctggcttct cctggtcgct gtgctcaaag gtgtccagtg 60
tcagtcgctg gaggagtccg ggggtcgcct ggtaacgcct ggaggatccc tgacactcac 120
ctgcacagtc tctggaatcg acctcagtag ctatggagtg ggetgggtcc gccaggctcc 180
agggaaaggg ctggaatata tcggaatcat tagtaaaatt gataacacat actacgcaa 240
ctgggcgaaa ggccgattca ccatctccaa aacctcgtcg accacgggtg atctgaaaat 300
gaccagtctg acaaccgagg acacggccac ctatttctgt accagagggt cttttgatcc 360
ctggggccca ggcacctgg tcacctctc ctcagggcaa cctaa 405

<210> 20
<211> 414
<212> DNA
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 20
caccatggag acaggcctgc gctggcttct cctggtcgct gtgctcaaag gtgtccagtg 60
tcagtcgctg gaggagtccg ggggtcgcct ggtaacgcct gggacacccc tgacactcac 120

ctgcacagtc	tctggattct	ccctcagcag	ctacgacatg	acctgggtcc	gccaggctcc	180
agggaaaggg	ctggaatgga	tcggaacccat	tagtactatt	ggtagcccat	tttacgcgag	240
ctgggcgaga	ggccgattca	ccatctccaa	aacctcgacc	acggtggatc	tgaaaatcac	300
caatccgaca	accgaggaca	eggccacgta	tttttgccgc	agatttcgga	ttgctggtga	360
tggtgccttc	tggggcccag	gcacgctggt	caccgtctcc	tcagggcaac	ctaa	414

<210> 21

<211> 414

<212> DNA

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 21

caccatggag	acaggcctgc	gctggcttct	cctggctcgt	gtgctcaaag	gtgtccagtg	60
tcagtccggtg	gaggagtccg	ggggtcgcct	ggtcacgcct	aggacacccc	tgacactcac	120
ctgcacagtc	tctggattct	ccctcagcag	ctacgacatg	acctgggtcc	gccaggctcc	180
agggaaaggg	ctggaatgga	tcggaacccat	tagtactatt	ggtagcccat	tttacgcgac	240
ctgggcgaga	ggccgattca	ccatctccaa	aacctcgacc	acggtggatc	tgaaaatcac	300
caatccgaca	accgaggaca	eggccacgta	tttttgccgc	agatttcgga	ttgctggtga	360
tggtgccttc	tggggcccag	gcacgctggt	caccgtctcc	tcagggcaac	ctaa	414

<210> 22

<211> 414

<212> DNA

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 22

caccatggag	acaggcctgc	gctggcttct	cctggctcgt	gtgctcaaag	gtgtccggtg	60
tcagtccggtg	gaggagtccg	ggggtcgcct	ggtcacgcct	gggacacccc	tgagattcac	120
ctgcacagtc	tctggattct	ccctcagcag	ctacgacatg	acctgggtcc	gccaggctcc	180
agggaaaggg	ctggaatgga	tcggaacccat	tagtactctt	ggtacccctt	tttcgcgcaa	240
ttgggcgaga	ggccgattca	ccatctccaa	gacctcgacc	acggtggatc	tgaaaatcgc	300
cagtccgacg	accgaagaca	ctgccacata	tttttggtgc	agatttcgga	ttgctcatga	360
tggtgccttc	tggggcccag	gcacgctggt	caccgtctcc	tcagggcaac	ctaa	414

<210> 23

<211> 422

<212> DNA

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 23

cccattggaga	caggcctgcg	ctggcttctc	ctggctcgtg	tgctcaaagg	tgctccagtgt	60
caggagcagc	tgaaggagtc	cgaggagggc	ctggtcacgc	ctgggacacc	cctgacactc	120
acctgcacag	tgtctggaat	cgacctcaat	atcgatgcaa	tgagctgggt	ccgccaggct	180
ccagggaaag	ggctggaatg	gatcggzaat	attgggtactc	gtggtggcac	atggttccgag	240
agctgggcga	aaggccgatt	caccatctcc	aaaaccccga	ccacagtggg	tctgaaaatc	300
cccagtcgga	caaccgagga	cacggccacc	tatttctgtg	ccagtatcta	ttctgatagt	360
ggtaacttata	cgaccttgtg	gggcccaggc	accccggtca	ccgtctctcc	agggcaacct	420
aa						422

<210> 24

<211> 414

<212> DNA

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 24

caccatggag	acaggcctgc	gctggcttct	cctggctcgt	gtgctcaaag	gtgtccagtg	60
tcagtccggtg	gaggagtccg	ggggtcgcct	ggtcacgcct	gggacacccc	tgacactcac	120
ctgcacagtc	tctggattct	ccctcagcag	ctacgacatg	acctgggtcc	gccaggctcc	180

```

aggggaagggg ctggaatgga tccgaacat tagtactcgt agtagcacat actacgcgag 240
ctgggagaaa ggccgattca ccatctccaa aacctcgacc accgtggatc tgaaaatcac 300
cagtcogaca accgaggaca cggccacgta tttctgtggc agatttcgga ttgctgggtga 360
tggtgccttc tggggcccag gcacgctggt caccgtctcc tcagggcaac ctaa 414

```

```

<210> 25
<211> 412
<212> DNA
<213> Oryctolagus cuniculus

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(412)
<223> n = A,T,C or G

```

```

<400> 25
ggaaggctgc gctggctttt cctggctcgt gtgctcagag gtgtccagtg tcagtcgctg 60
gaggagtcog ggggtngcct ggtaacgect gggacacccc tganantcac ctgcacagcc 120
tttggatttt ccctcagtag ctggtcaatg agctgggtcc gccaggctcc aggggaagggg 180
ctggaatgga tccgaatgat tggattgtt ggtagtggca cataatagc gacctgggag 240
aaaggccgat tcaccatttc caaaaacctg tgaccacggt cgatttgaaa atgaccagtt 300
tgacaaccga ggacacggcc acctattttt gtgtcagagg gggtagtttt anttttgcta 360
ccgecttggt gggcccaggc accctggtea ccgntcctc agggcaacct aa 412

```

```

<210> 26
<211> 402
<212> DNA
<213> Oryctolagus cuniculus

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(402)
<223> n = A,T,C or G

```

```

<400> 26
ttgcaggctg cgtggttttc ctggctcgtg tgcctaaaagg tgtccagtgt cagtcgggtg 60
aggagtccgg ggggtngcctg gtaacnctg ggacacccct gacanttttt tgcaaagtnt 120
ttggattttc ccctcagcagn tacganatga cctgggtccg ccaggctcca ggggaagggg 180
tggaaatggat nggaaccatt agtanttgty gtaatggata atacgcgacc tgggcgaaag 240
gccgattcac catttccaaa accttgacca ccgtggattt gaaaatcacc agtccgacaa 300
ccgaggacac ggccaagtat ttttgggca gatttcggat tgcgtggtgat ggtgcttttg 360
gggccggggc acgctggtea ccgntcctc agggcaacct aa 402

```

```

<210> 27
<211> 93
<212> PRT
<213> Homo sapien

```

```

<400> 27
Met Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala Leu Ser Gln His Cys
1 5 10 15
Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys Thr
20 25 30
Ile Asn Pro Gln Val Ser Lys Thr Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu
35 40 45
Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu
50 55 60
Cys Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu Ser Asn Val Glu Val Phe

```


Gln Glu Phe Ile
20

<210> 33
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 33
Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr
1 5 10 15
Asn Ala Ile Asp
20

<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 34
Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe
1 5 10 15
Leu Asn Gln Thr
20

<210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 35
Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu Ser Asn
1 5 10 15
Val Glu Val Phe
20

<210> 36
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 36
Asp Glu Thr Leu Ser Asn Val Glu Val Phe Met Gln Leu Ile Tyr Asp
1 5 10 15
Ser Ser Leu Cys Asp Leu Phe
20

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 37
Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala
1 5

<210> 38
<211> 9

```

<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 38
Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala
 1                5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 39
Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala Leu
 1                5

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

<400> 40
Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu
 1                5

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 41
Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu
 1                5                10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 42
Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala
 1                5                10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 43
Phe Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu
 1                5                10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 44
Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu
 1                5                10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 45
Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp Asn Ala
 1                5                10

```

【図面の簡単な説明】

【図1A】

図1 Aは、ヒトママグロビンタンパク質に対して惹起された代表的なウサギおよびマウスのモノクローナル抗体のまとめである。これらの抗ママグロビンモノクローナル抗体を用いてママグロビンを検出したアッセイのまとめが含まれる。各モノクローナル抗体についてのエピトープ結合配列（配列番号11～18）もまた列挙する。略号は以下である：n.d.=決定されず；FACS=蛍光活性細胞選別機；IHC=免疫組織化学。

【図1 B】

図1 Bは、ウサギモノクローナル抗体6 A 1（配列番号19）、16 D 8（配列番号20～21）、6 B 1 2（配列番号22）、2 D 3（配列番号23）についてのCDR配列を表す。

【図1 C】

図1 Cは、ウサギモノクローナル抗体14 A 1 2（配列番号24）、29 C 1 1（配列番号25）および31 A 5（配列番号26）についてのCDR配列を表す。

【図2】

図2は、エピトープマッピング研究のために用いたペプチドおよび組換え領域と共にヒトママグロビンのアミノ酸配列（配列番号27）を表す。ママグロビンタンパク質配列に及ぶ種々のペプチド（Pro 1 - 9（配列番号27）、Pro - 20（配列番号27）およびG l o b - 2（配列番号27））を合成し、そしてE L I S A方法を用いたモノクローナル抗体のエピトープマッピングのために用いた。各ペプチド配列は、太字および下線で示される。さらに、ママグロビンのN末端組換えフラグメント（配列番号28）をまた、エピトープマッピング研究のために用いた。

【図3 A】

図3 Aは、E L I S A方法によって得られたウサギおよびマウスのモノクローナル抗体についてのエピトープマッピングデータを表す。図3 Aは、マウスモノクローナル抗体のエピトープ結合領域を示す。陰をつけた領域は、抗体についてポジティブであると考えられる。アフィニティー精製したウサギポリクローナル967についてのエピトープ結合特異性もまた実証される。

【図3B】

図3Bは、ELISA方法によって得られたウサギおよびマウスのモノクローナル抗体についてのエピトープマッピングデータを表す。図3Bは、漸減濃度のママグロビンペプチドおよび組換えフラグメントを用いた、ウサギモノクローナル抗体6B12（図3B）についてのエピトープマッピングデータを表す。

【図3C】

図3Cは、ELISA方法によって得られたウサギおよびマウスのモノクローナル抗体についてのエピトープマッピングデータを表す。図3Cは、漸減濃度のママグロビンペプチドおよび組換えフラグメントを用いた、ウサギモノクローナル抗体29C11（図3C）についてのエピトープマッピングデータを表す。

【図3D】

図3Dは、ELISA方法によって得られたウサギおよびマウスのモノクローナル抗体についてのエピトープマッピングデータを表す。図3Dは、漸減濃度のママグロビンペプチドおよび組換えフラグメントを用いた、ウサギモノクローナル抗体2D3（図3D）についてのエピトープマッピングデータを表す。

【図4A】

図4Aは、FACS分析によるモノクローナル抗体の特徴付けの結果を表す。各モノクローナル抗体を用いて、MDA-MB-415細胞においてママグロビン発現を検出した。サンプルを2%ホルムアルデヒドにおいて固定し、そして0.5%サポニンを用いて透過化した。MCF-7細胞はママグロビンを発現せず、そしてネガティブコントロールとして用いられた。

【図4B】

図4Bは、FACS分析によるモノクローナル抗体の特徴付けの結果を表す。各モノクローナル抗体を用いて、MDA-MB-415細胞においてママグロビン発現を検出した。サンプルを2%ホルムアルデヒドにおいて固定し、そして0.5%サポニンを用いて透過化した。MCF-7細胞はママグロビンを発現せず、そしてネガティブコントロールとして用いられた。

【図5】

図5は、各モノクローナル抗体によるママグロビンのウェスタンブロット検出

を表す。SDS-PAGEを、示されるように、MDA-MB-415細胞を増殖させた培地、MDA-MB-415細胞溶解産物および細菌によって発現された組換えマムグロビンについて行った。マムグロビン発現は、示した抗体を用いて検出された。

【図6】

図6は、試験した他の組織においては発現しないが、乳房組織においてはマムグロビンが発現することを示す表である。種々の組織におけるマムグロビン発現を、29C11ウサギモノクローナル抗体および31A5ウサギモノクローナル抗体の組み合わせを用いた免疫組織化学的分析によって評価した。

【図7A】

図7Aは、MB415細胞の溶解産物および上清中のマムグロビンを検出するために、示したウサギモノクローナル抗体を用いて行ったサンドイッチアッセイの結果を例示するグラフである。

【図7B】

図7Bは、MB415細胞の溶解産物および上清中のマムグロビンを検出するために、示したウサギモノクローナル抗体を用いて行ったサンドイッチアッセイの結果を例示するグラフである。

【図7C】

図7Cは、MB415細胞の溶解産物および上清中のマムグロビンを検出するために、示したウサギモノクローナル抗体を用いて行ったサンドイッチアッセイの結果を例示するグラフである。

【図8】

図8は、ビオチン化したモノクローナル抗体2D3と組み合わせてポリクローナル抗967血清を用いたサンドイッチアッセイについての標準曲線を示すグラフである。

【図9】

図9は、乳癌を有する患者および乳癌を有さない患者におけるマムグロビンを検出するために、代表的な示した抗体を用いたサンドイッチアッセイの結果を示す表である。

【図10】

図10は、エピトープマッピング研究のために用いたペプチド領域（配列番号29～36）に下線を付し、そして太字にした、ヒトママグロビンアミノ酸配列（配列番号27）を表す。

【図11】

図11Aおよび図11Bは、示したように、ママグロビンおよびその種々の部分についてのCD4⁺T細胞株の認識を例示するグラフである。図11Aは、種々のタンパク質およびペプチドに応じた3つの異なるCD4⁺T細胞株のT細胞増殖を示す。図11Bは、同じタンパク質およびペプチドに応じた同じ細胞株によるインターフェロン- γ 産生を示す。

【図12】

図12は、ヒトママグロビンアミノ酸配列（配列番号27）を、CD4⁺およびT細胞エピトープマッピング研究のために用いたペプチド領域（配列番号37～45）と共に表す。

【図13】

図13A～13Cは、mgb1で免疫したHLA-A2トランスジェニックマウス由来のCTLによる、mgb-1でパルスしたJurkatA2Kb細胞の認識を示すグラフである。3つの異なるマウス由来のCTLを、示したように、異なるエフェクター：標的比で試験した。各図は、mgb-1でパルスした細胞（黒丸）およびmgb-1でパルスしていない細胞（白丸）の比溶解パーセント（percent specific lysis）を示す。

【図14】

図14A～14Cは、mgb1で免疫したHLA-A2トランスジェニックマウス由来のCTLによる、mgb-1でパルスしたJurkatA2Kb細胞（三角）、またはって全長ママグロビンを発現するJurkatA2Kb細胞（ママグロビン）の認識を例示するグラフである。3つの異なるマウス由来のCTLを、示したように、異なるエフェクター：標的比で試験した。各図において、mgb-1もママグロビンも発現しない細胞の比溶解パーセントは、丸によって表される。

【図15】

図15は、ママグロビンの組織分布を示すヒストグラムである。1 ngの - アクチンあたりのママグロビンのコピー数を、示したように、種々の正常組織および腫瘍組織について示す。

【図16】

図16は、細胞の量の関数として乳癌細胞株MB415中のママグロビンメッセージのコピー数を示すグラフである。

【図17】

図17は、Dyna1単離方法を用いて転移性の乳癌を有する患者の末梢血から単離された上皮細胞におけるママグロビンの検出を、正常な血液サンプル由来の類似の単離物と比較して示すヒストグラムである。1 ngの - アクチンあたりのママグロビンのコピー数を、示したように、33の転移性サンプルおよび11の正常サンプルについて示す。

【図1A】

名称	種	プロト-7 ^o	ウェスタンブロット	IHC	FACS	プロト-7 ^o 配列
29C11	ウサギ	Pro2	あり	あり	n.d.	IDELKECFUNQTOETLSNVE
31A5	ウサギ	Pro3	あり	あり	あり	ELLCEFDGNATTNAIDELK
8A1	ウサギ	Pro2-3	あり	n.d.	なし	TTNAIDELKECFUNQ
14A12	ウサギ	Pro3	あり	n.d.	あり	ELLCEFDGNATTNAIDELK
6B12	ウサギ	Pro3	あり	n.d.	あり	ELLCEFDGNATTNAIDELK
2D3	ウサギ	Pro5	あり	n.d.	あり	SCHCYAGSGCPLEENVISKTI
16D8	ウサギ	Pro3	あり	n.d.	あり	ELLCEFDGNATTNAIDELK
31-1H7	マウス	n.d.	あり	n.d.	あり	
197-1H11	マウス	Pro5	あり	n.d.	なし	SCHCYAGSGCPLEENVISKTI
32-1G11	マウス	n.d.	あり	n.d.	あり	
304-1A5	マウス	n.d.	あり	n.d.	あり	
98-1F4	マウス	n.d.	あり	n.d.	なし	

【図1B】

pc.h.mam.6a1.cell-57.579.1.f7

CACCATGGAGACAGGCCCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
 GTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCAACGCCF9GAGGATCCCTGACACTCACCTGCAC
 AGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGGAGTGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
 GGCTGGAATACATCGGAATCATTAGTAAAATTGATAACACATACTACGCGAACTGGGCGAAA
 GGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTGGACACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACA
 ACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTACCAGAGGGTCTTTTGATCCCTGGGGCCAGGCACC
 CTGGTCAACGCTCTCTCAGGGCAACCTAA

pc.h.mam.16d8.cell-22.394.1.f7

CACCATGGAGACAGGCCCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
 GTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCAACGCCF9GAGGATCCCTGACACTCACCTGCAC
 AGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGGAGTGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
 GCTGGAATGGATCGGAACCATTAGTACTATTGGTAGCCATTTTACGCGAGCTGGGCGAGAGG
 CCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACACGGTGGATCTGAAAATCACCATCCGACACCGGA
 GGACACGGCCACGTATTTTGGGGCAGATTTCCGATTGCTGGTGA TGGTGCCTTCTGGGGCC
 AGGCACGCTGGTCAACGCTCTCTCAGGGCAACCTAA

pc.h.mam.16d8.cell-21.393.2.f7

CACCATGGAGACAGGCCCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
 GTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCAACGCCF9GAGGATCCCTGACACTCACCTGCAC
 AGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGGAGTGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
 GCTGGAATGGATCGGAACCATTAGTACTATTGGTAGCCATTTTACGCGAGCTGGGCGAGAGG
 CCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACACGGTGGATCTGAAAATCACCATCCGACACCGGA
 GGACACGGCCACGTATTTTGGGGCAGATTTCCGATTGCTGGTGA TGGTGCCTTCTGGGGCC
 AGGCACGCTGGTCAACGCTCTCTCAGGGCAACCTAA

pc.h.mam.6b12.cell-19.339.4.f7

CACCATGGAGACAGGCCCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
 GTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCAACGCCF9GAGGATCCCTGACACTCACCTGCAC
 AGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGGAGTGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
 GACTGGAATGGATCGGAACCATTAGTACTCTTGGTAACTTTTCCGCCAATGGGGGAGAG
 GCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACACGGTGGATCTGAAAATCGCCAGTCCGACGACCG
 AAGACACTGCCACATATTTTGGGCGAGATTGGGATTGCTCATGATGGTGCCTTCTGGGGCC
 CAGGCACGCTGGTCAACGCTCTCTCAGGGCAACCTAA

Fig. 1B

【図 1 C】

pc.h.mam.2d3.cell-65.576.1.f7

```

CCCATGCGAGACAGGCCTGGGCTGGCTTCTCCTGGTCGGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAG
GAGCAGCTGAAGGAGTCCGGAGGAGGCCGGTTCACGCCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTG
CACAGTGTCTGGAATCGAOCCTCAATATCGATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGGCTGGAAATGGATCGGAATTTATTGGTACTCGTGGTGGCACATGGTTCCGGAGCTGGGGG
AAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCCCGACCACAGTGGATCTGAAAATCCCAGTCCGAC
AACCAGGAGACAGGCCACCTATTTCTGTGGCAGTATCTATCTGTATAGTGGTACTTATACGAC
CTTGTGGGGCCAGGCCACCCGGTCCACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAA

```

pc.h.mam.14a12.cell-3.333.1.f7

```

CACCATGGAGACAGGCCTGGGCTGGCTTCTCCTGGTCGGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
GTCCGTGGAGAGTCCGGGGGTGGCTGGTTCACGCCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGAC
CGTCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCGTGCACATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG
GCTGGAATGGATCGGAACCATTAAGTACTCGTAGTACACATACTACGGAGCTGGGCGAAAG
GCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCG
AGGACACGGCCACGATTTCTGTGGCAGATTTCCGGATTGCTGGTATGGTGGCTTCTGGGGCC
CAGGCAGGCTGGTCCCGTCTCCTCAGGGCAACCTAA

```

pcr.g.mam.29c11.c211.11779.780com

```

GGAAAGGCTGGCTGGCTTTCTCCTGGTCGGCTGTGCTCAGAGGTGTCCAGTGTGAGTGGCTGGAG
GAGTCCGGGGGTNGCCTGGTAACGCCCTGGGACACCCCTGANANTCACCTGCACAGCCTTTGG
ATTTTCCCTCAGTAGCTGGTCAATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATG
GATCCGAATGATTGGTATTGTTGGTAGTGGCACATAATANGCAGCTGGGCGAAAGGCCGAT
TCACCATTTCCAAAACCTTGTGACCACGGTCCGATTTGAAAATGACAGTTTGACAACCGAGGA
CACGGCCACCTATTTTGTGTCAGAGGGGTAGTTTTANTTTTGTACCGCTTGTGGGGCCCA
GGCACCCCTGGTACCGTNTCCTCAGGGCAACCTAA

```

pcr.g.mam.31a5.c178.11884.780 com

```

TTGCAGGCTGGCTGGTTTTCTGGTGGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGTGGTGGAGG
AGTCCGGGGGTNGCCTGGTAACGCCCTGGGACACCCCTGACANTTTTTTGAAGTNTTTGGAT
TTTTCCCTCAGCAGNTACGANATGACCTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGG
ATNGBAACCATTAAGTANTTTGGTAATGGATAATACGGACCTGGGCGAAAGGCCGATTAC
CATTTCCAAAACCTTGGACCACGGTGGATTTGAAAATCACAGTCCGACAACCGAGGACACGG
CCAAGTATTTTGTGGCAGATTTCCGGATTGCTGGTATGGTGGTTTTGGGGCCCGGGCACGCT
GGTCCCGTNTCCTCAGGGCAACCTAA

```

Fig. 1C

- Fig. 1 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Fig. 2 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Fig. 3 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Fig. 4 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Fig. 5 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Fig. 7 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Fig. 8 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Fig. 9 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Glob. 2 MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF
- Fig. 20
MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCTLLJENVISKTNIPQVSKTEYKELLQEFIDNATTNAIDELKECFLNQTDDELSNVEVFMQLIYDSSLCDLIF

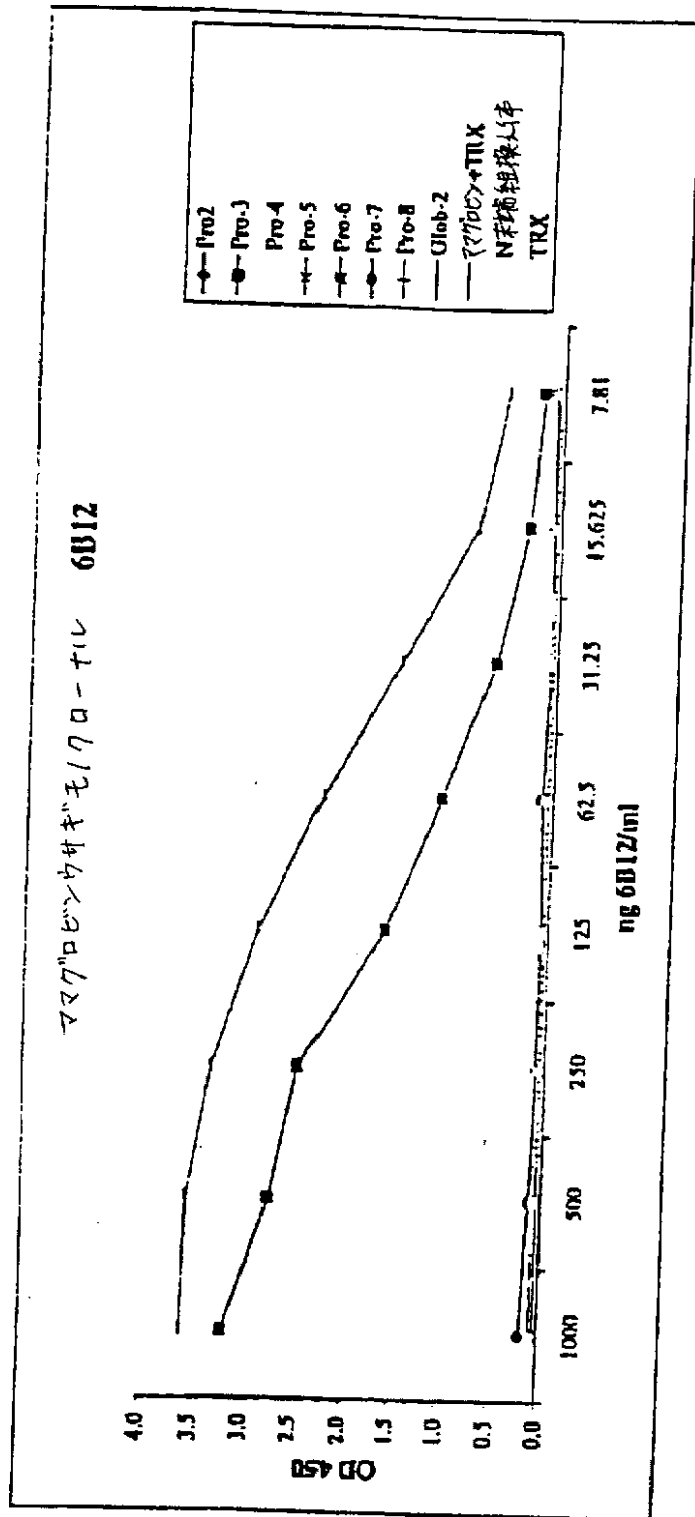
N 事務局 組織図
 GSGMKITAAAKFRIDIMD)STDI.(ITDIDDKAMASIDINSJIC.YAGSGCTLLJENVISK
 エンボキ十一セ七の打替位おふ心トロセン七の打替位を何れも
 ハナガフ
 ママアロヒン 〇七多

【図3A】

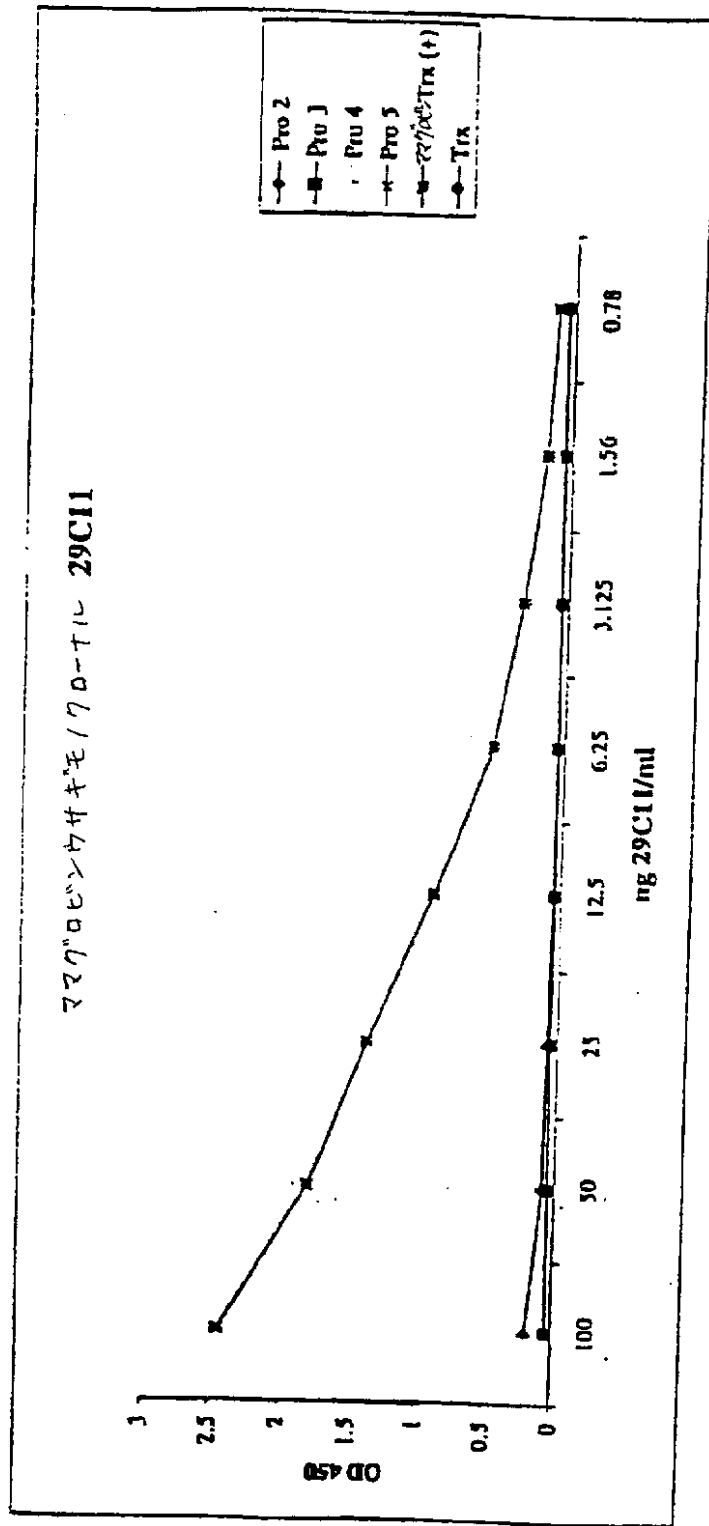
No.7041におお心組探針を有するマウスモ170-TLV抗体の反応性

抗体	Pro-2	Pro-3	Pro-4	Pro-5	Pro-6	Pro-7	Pro-8	(Job-2 270)TLV	N末端相対値TRIX
31-III7	0.085	0.059	0.059	0.061	0.06	0.068	0.07	0.063	0.074
32-IG11	0.058	0.055	0.054	0.054	0.055	0.057	0.055	0.055	0.057
197-III11	0.055	0.054	0.053	0.053	0.054	0.055	0.055	0.055	0.064
304-IA5	0.054	0.054	0.053	0.053	0.054	0.053	0.053	0.054	0.056
98-IF4	0.088	0.055	0.053	0.055	0.059	0.064	0.11	0.112	0.110
967	0.055	0.057	0.056	0.058	0.055	0.053	0.058	0.053	0.009
77>7	0.058	0.055	0.053	0.055	0.052	0.053	0.053	0.053	0.052

【図3B】

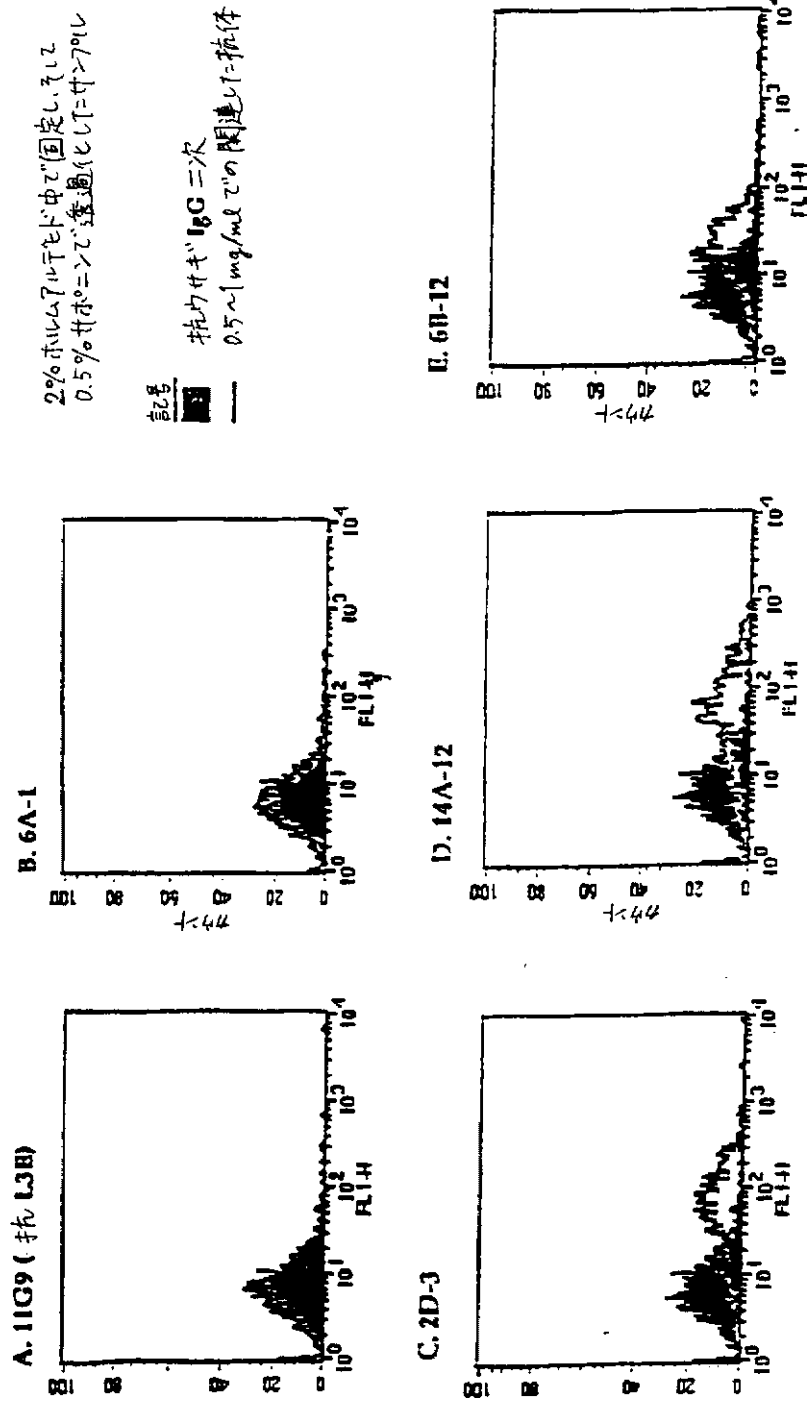


【図3C】



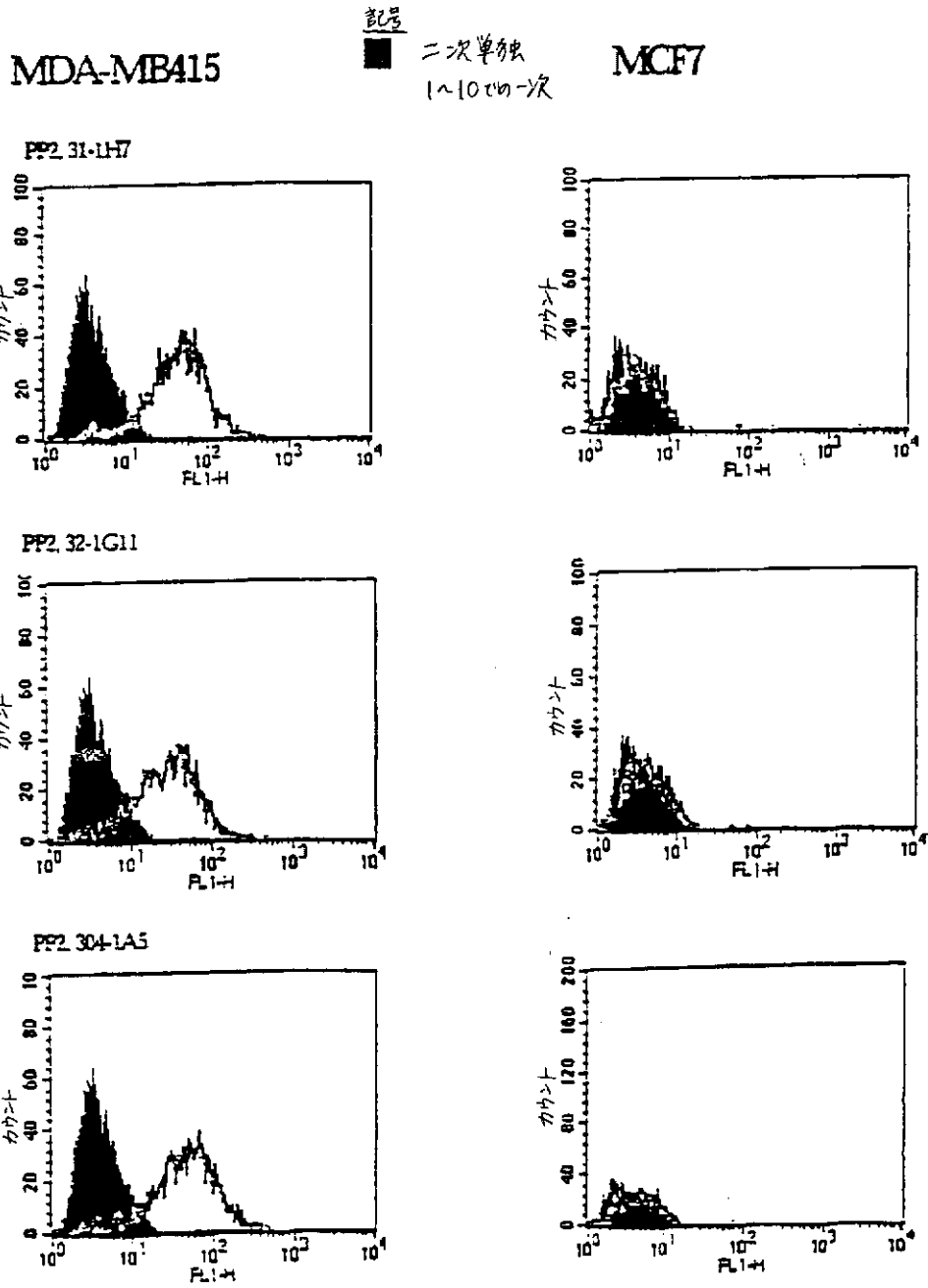
【図4A】

ウサギ抗マブロンモノクローナル抗体を用いた、透過化ヒト乳房腫瘍細胞株MDA-MB415の染色



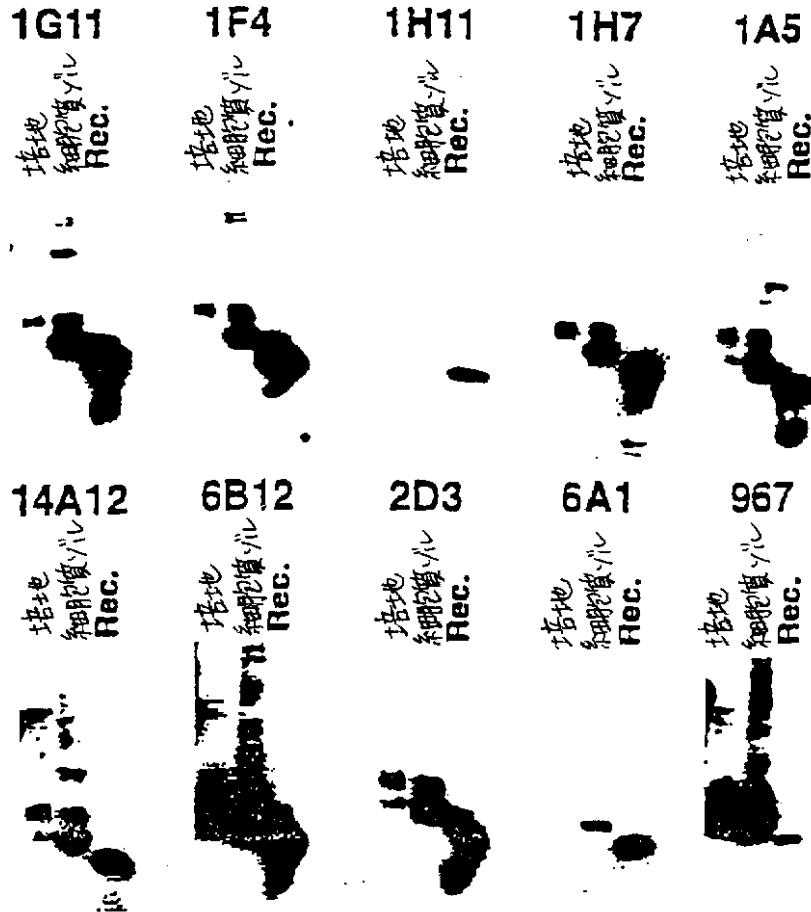
【図4B】

マウス抗マクロビンモノクローナル抗体を用いた。
透過化ヒト乳房腫瘍細胞株の染色



【図5】

MB415細胞由来のママグロビンの
ウェスタンブロット分析



マウスモノクローナル : 1G11, 1F4, 1H11, 1H7, 1A5
 ウサギモノクローナル : 14A12, 6B12, 2D3, 6A1
 ウサギポリクローナル : 967

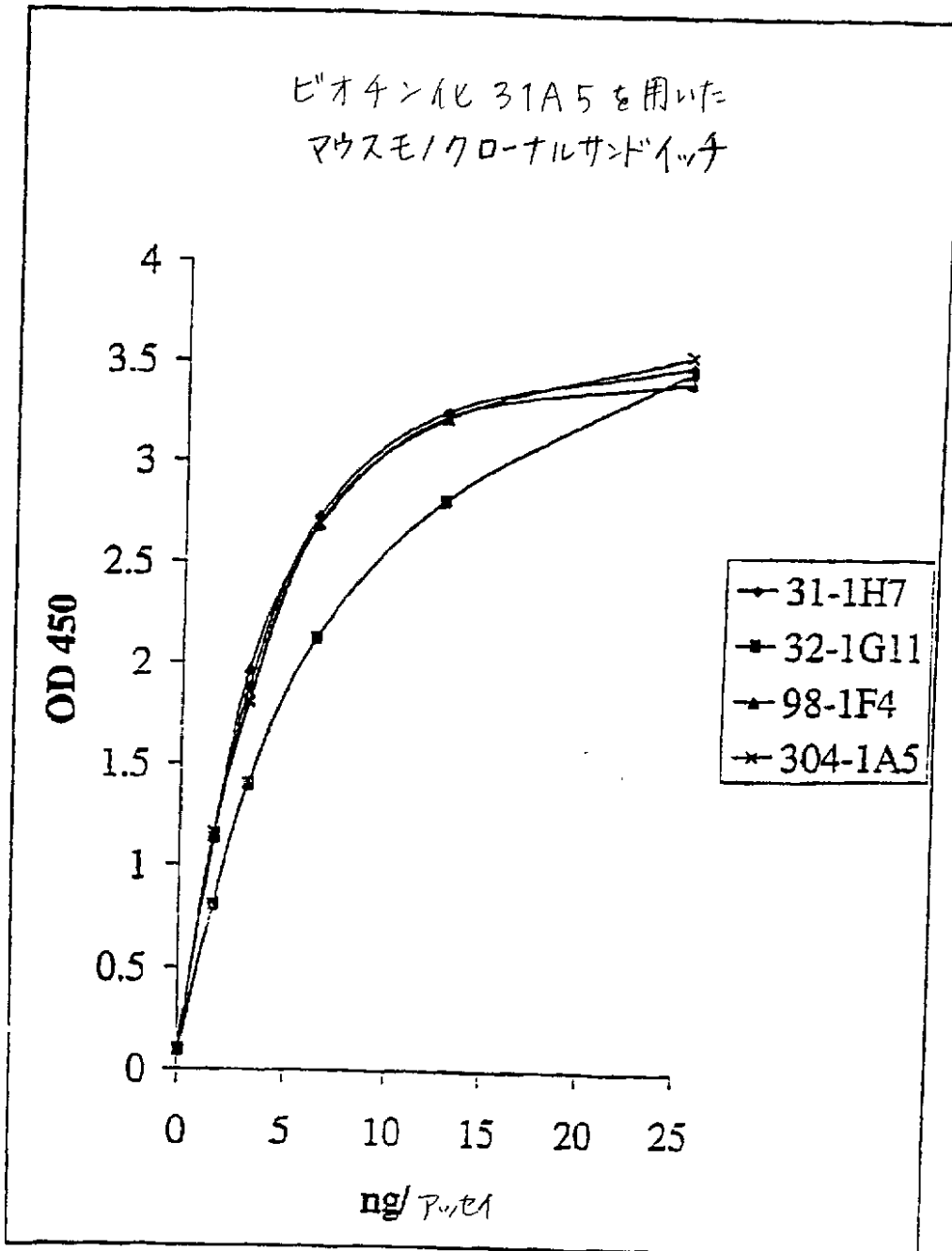
Rec.: 細菌により発現された組換えママグロビン

【図6】

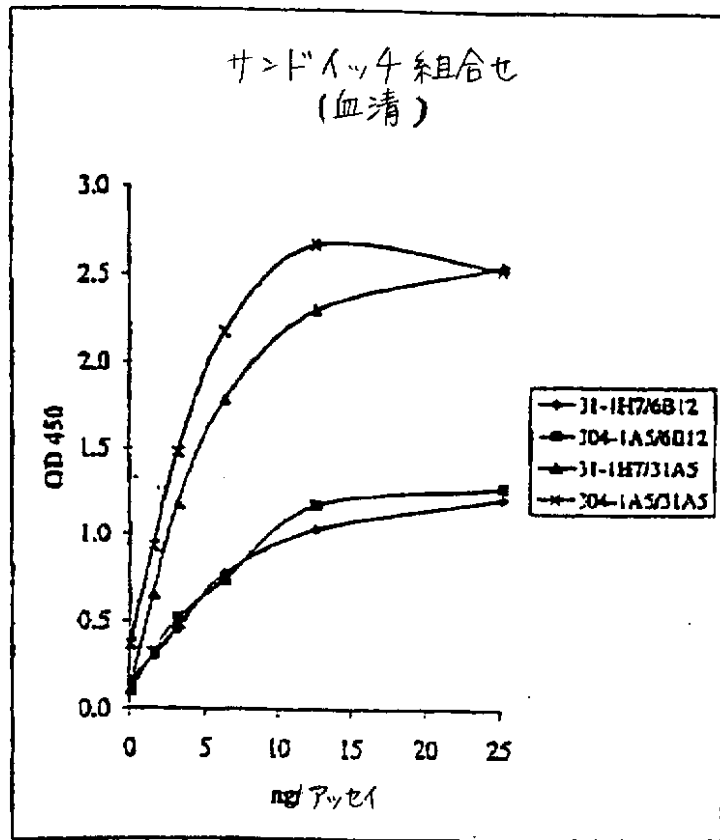
正常組織におけるママグロビン発現のIHC分析

正常組織	Mam-29C11/31A5
乳房	3+
膵臓	0
頸部	0
系腸	0
十二指腸	0
胆のう	0
回腸	0
腎臓	0
卵巣	0
脾臓	0
盲下腺	0
前立腺	0
骨髄	0
膵臓	0
精巣	0

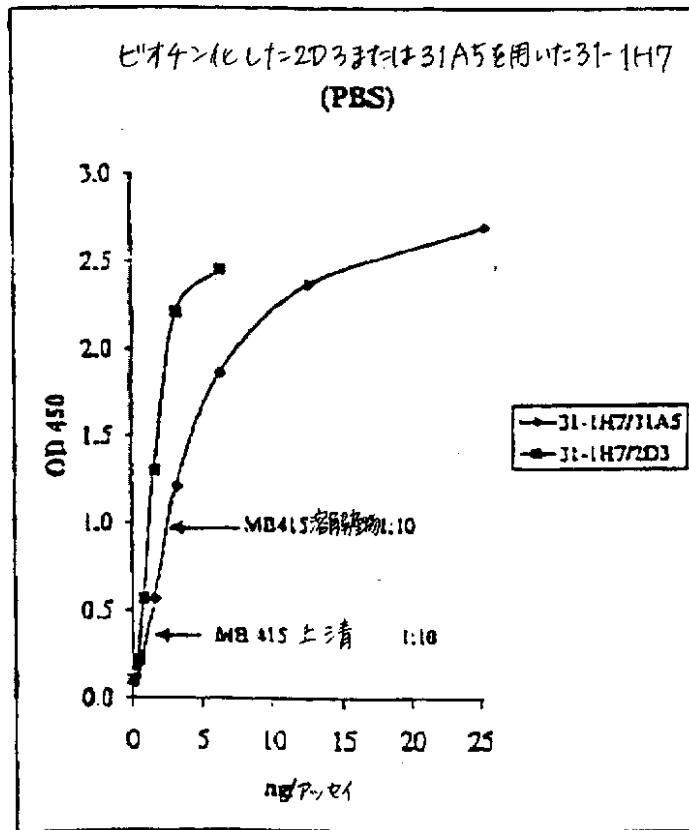
【図7A】



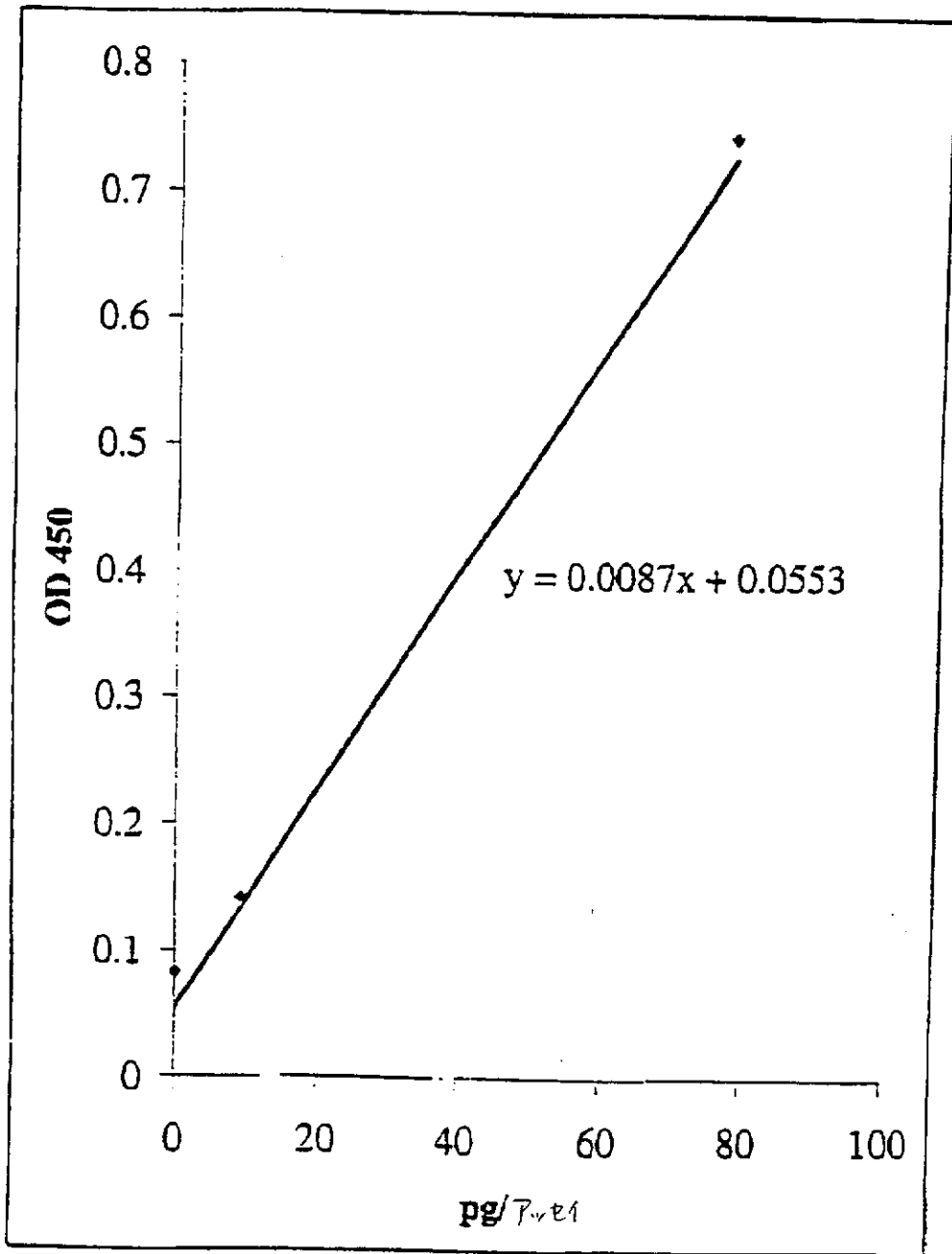
【図7B】



【図7C】



【図8】



【図9】

血清中のママグロビンの検出

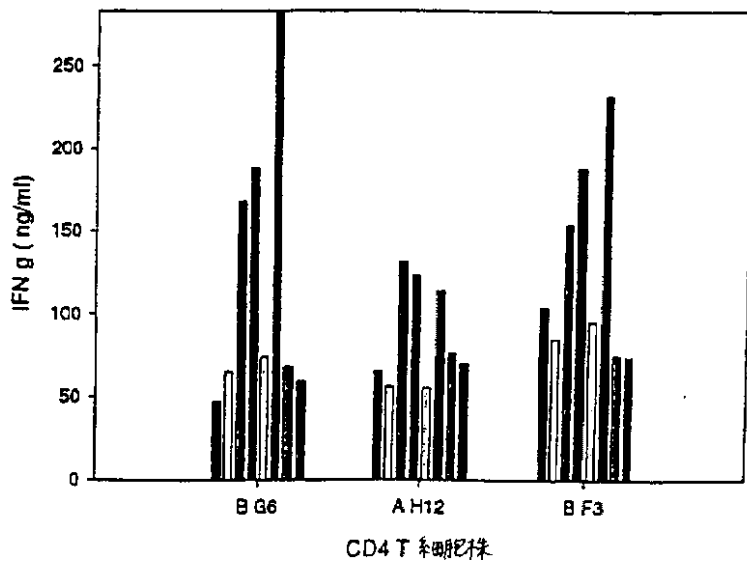
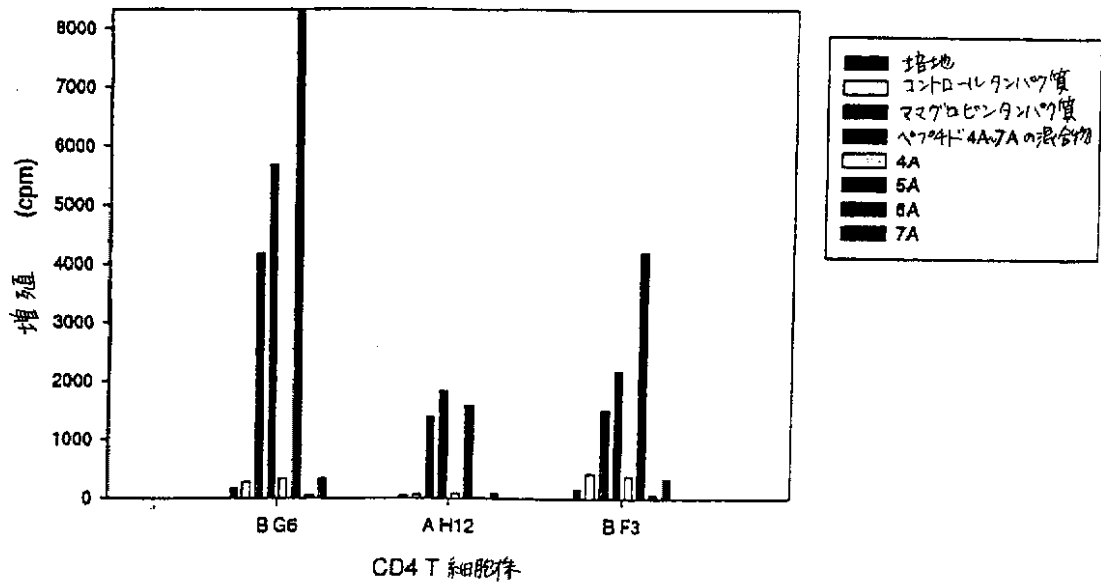
血清 #	状態	ウエスタン	サドイック ELISA ZD3 mAU 捕捉, 29C11 ニ次		サドイック ELISA 067 Ab 捕捉, 2D3 mAU ニ次		血中での mRNA*
			ママグロビン [ng/ml]	OD	ママグロビン [pg/ml]**	OD	
6 (約 3534)		+	4980-9600	3.8	8732	+	
3	BrCA	nd	580-1245	2.6	2392	+	
4	BrCA	nd	311-622	1.7	1443	+	
12	BrCA	nd	311-622	1.5	2288	弱く	
17	BrCA	nd	149-311	0.6	1498	+	
11	BrCA	nd	149-311	0.6	847	+	
10	BrCA	nd	74-149	0.38	356	+	
1	正常 F	nd	38-74	0.21	2333	nd	
18	正常 M	nd	38-74	0.2	636	弱く	
8	BrCA	nd	38-74	0.19	284	+	
9	BrCA	nd	38-74	0.18	188	+	
5	正常 F	nd	<33	0.16	43	弱く	
2	正常 F	nd	<33	0.14	149	弱く	
7	正常 F	nd	<33	0.13	96	弱く	
14	正常 F	nd	<17	0.05	18	弱く	
16	正常 F	nd	<17	0.01	363	弱く	
13	正常 F	nd	<17	0.01	443	弱く	
15	正常 F	nd	xxx	xxx	10.8	弱く	

1a MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSGCPLLENVISKTINPQVSKTEYKELLQEFIDDNATTNAIDELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF
 2a MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSGCPLLENVISKTINPQVSKTEYKELLQEFIDDNATTNAIDELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF
 3a MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSGCPLLENVISKTINPQVSKTEYKELLQEFIDDNATTNAIDELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF
 4a MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSGCPLLENVISKTINPQVSKTEYKELLQEFIDDNATTNAIDELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF
 5a MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSGCPLLENVISKTINPQVSKTEYKELLQEFIDDNATTNAIDELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF
 6a MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSGCPLLENVISKTINPQVSKTEYKELLQEFIDDNATTNAIDELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF
 7a MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSGCPLLENVISKTINPQVSKTEYKELLQEFIDDNATTNAIDELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF
 8a MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSGCPLLENVISKTINPQVSKTEYKELLQEFIDDNATTNAIDELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF

発明者 # アミノ酸配列 マクベ>内のアミノ酸位置

1a	MKLLMVLMLAALSQHCHYAGS	1-20
2a	ALSQHCHYAGSGCPLLENVIS	11-30
3a	GCPLLENVISKTI	21-40
4a	KTINPQVSKTEYKELLQEFI	31-50
5a	EYKELLQEFIDDNATTNAID	41-60
6a	DDNATTNAIDELKECFLNQT	51-70
7a	ELKECFLNQTDETL	61-80
8a	DETL	71-93

【図11】

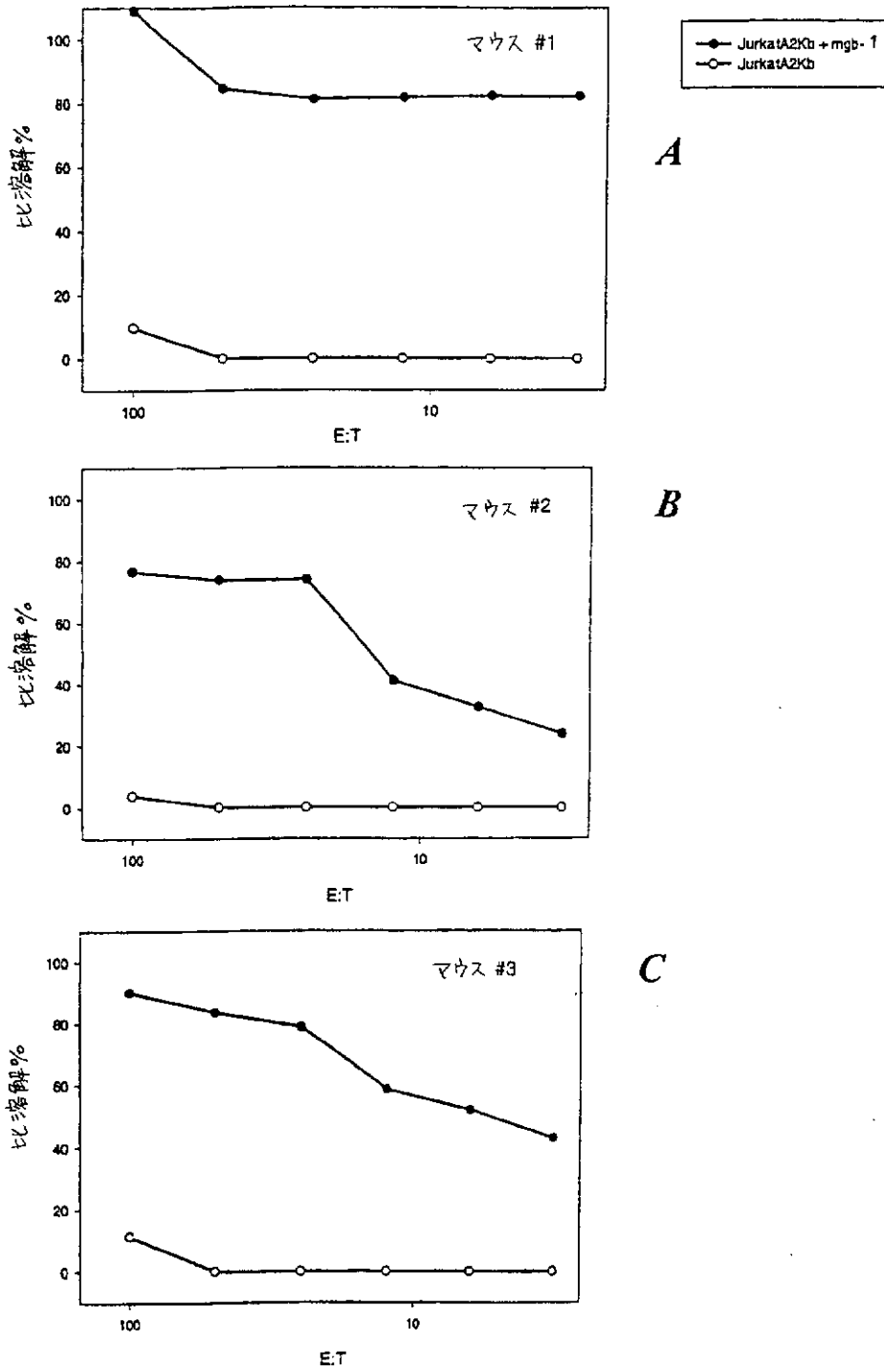


【図12】

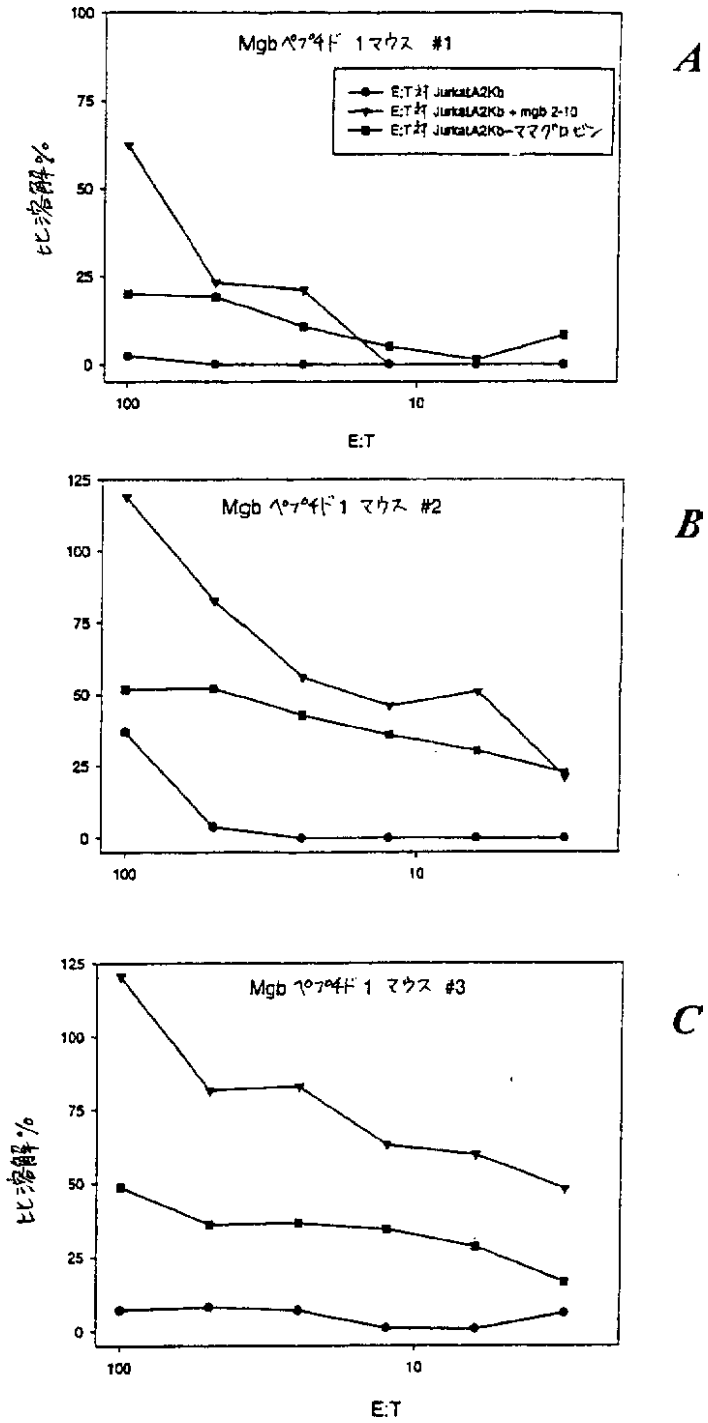
MKLLMVLMLAALSQHCYAGSGCPLENVISKTNPQVSKTEYKELLQEFDNAT
 TNAIDELKECFLNQTDETL SNVEVFMQLIYDSSLCDLF

#	開始位置	配列 (長さ)	アキ
1	2	KLLMVLMLA (9)	148
2	3	LLMVLMLAA (9)	72
3	4	LMVLMLAAL (9)	60
4	66	FLNQTDETL (9)	48
6	83	LIYDsSLCDL (10)	151
7	2	KLLMvLMLAA (10)	148
8	80	FMQLIYDSSL (10)	71
9	58	AIDEIKECFL (10)	26
10	45	LLQEFDNNA (10)	17

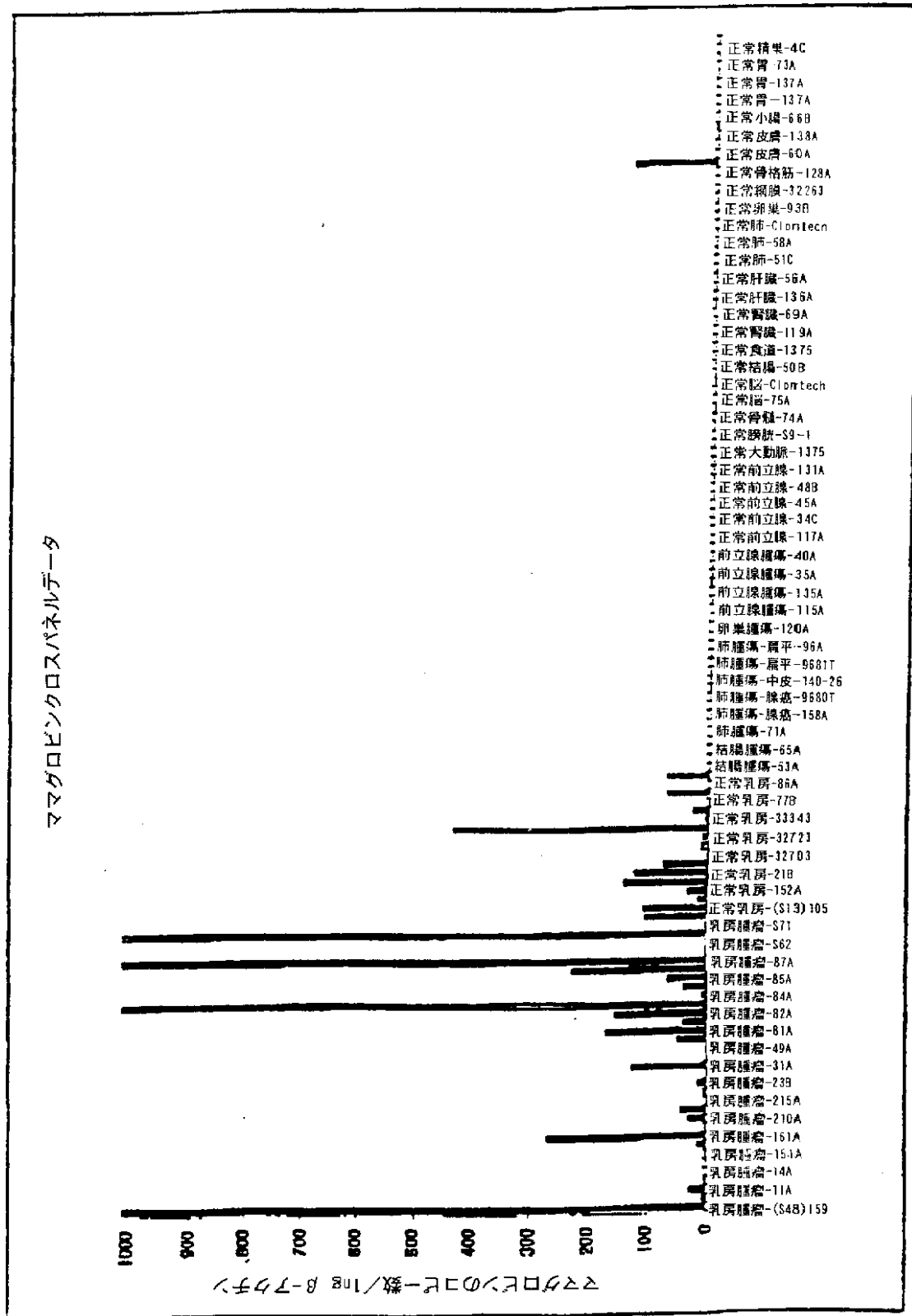
【図13】



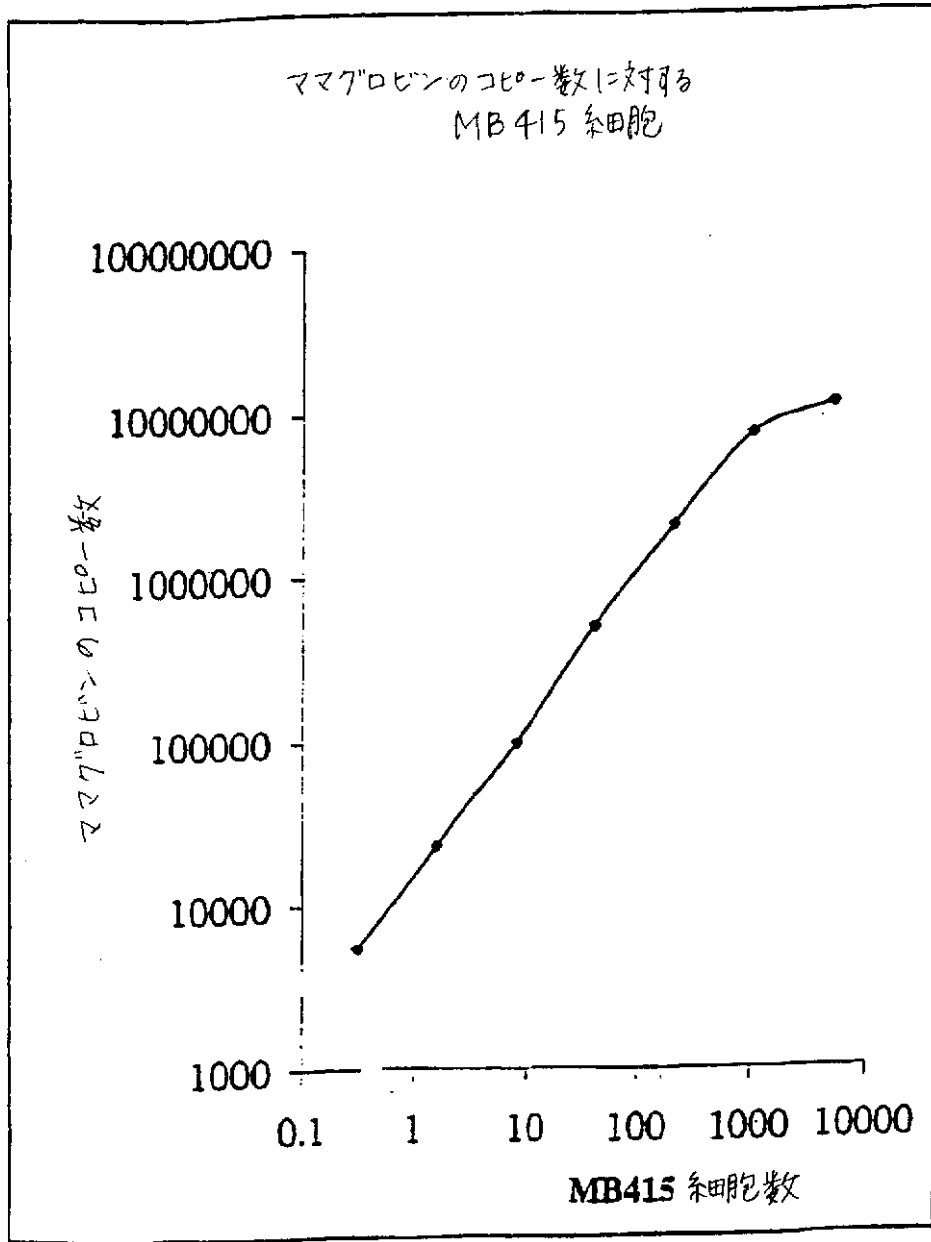
【図14】



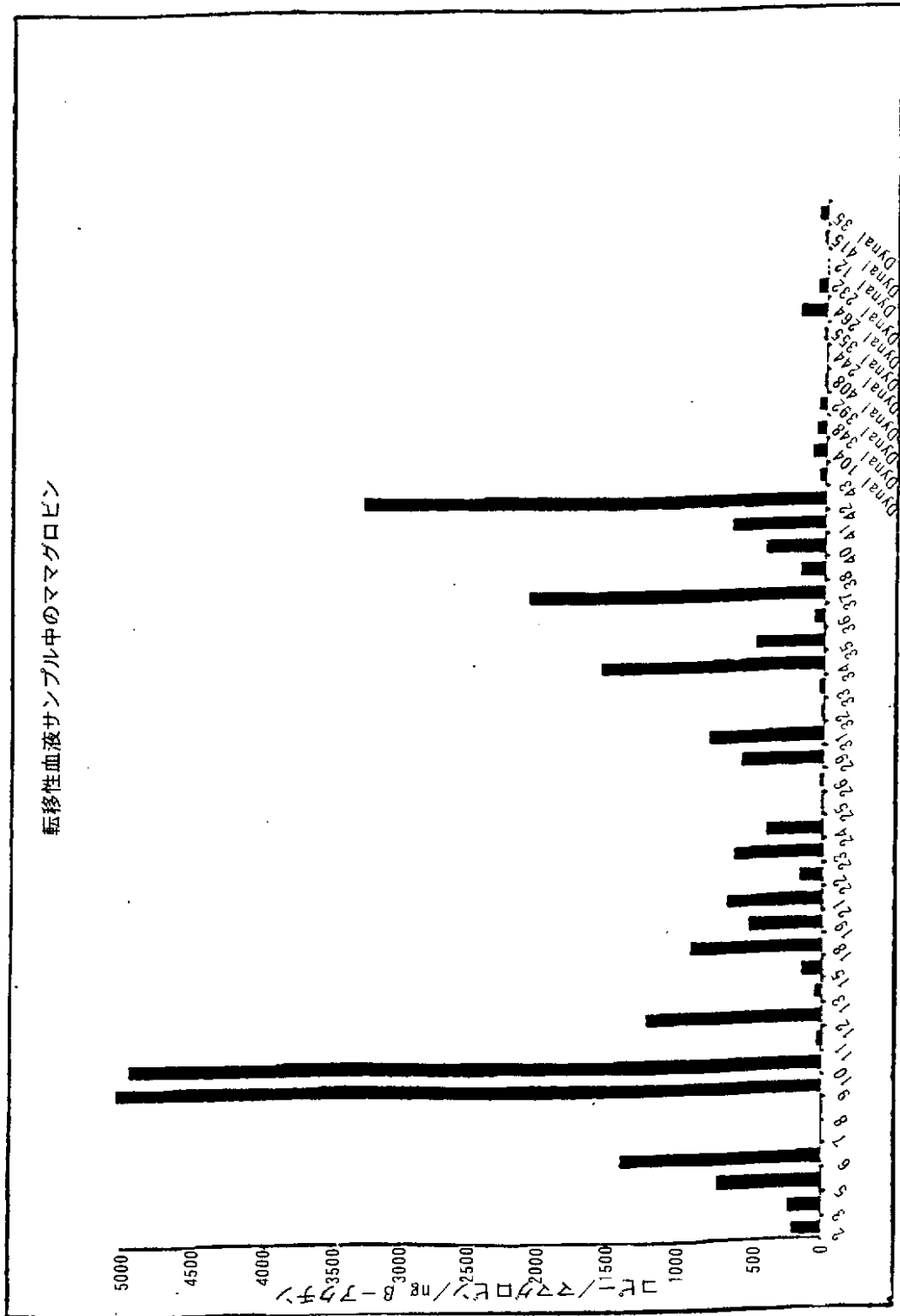
【図15】



【図16】



【図17】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/14845
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12Q1/68 G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 07753 A (ABBOTT LAB) 26 February 1998 (1998-02-26) the whole document Seq ID No 18-26	1-73
X	WO 99 14230 A (FLEMING TIMOTHY P ; WATSON MARK A (US); UNIV WASHINGTON (US)) 25 March 1999 (1999-03-25) abstract; claims	1-73
X	US 5 855 889 A (FLEMING TIMOTHY P ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) abstract; claims	1-73
X	WO 96 38463 A (UNIV WASHINGTON ; WATSON MARK A (US); FLEMING TIMOTHY P (US)) 5 December 1996 (1996-12-05) abstract; claims	1-73
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*†* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *§* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 September 2000		02/10/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cervigni, S

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/14845

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 19487 A (INCYTE PHARMA INC ;MURRY LYNN E (US); SHAH PURVI (US); HILLMAN JEN) 22 April 1999 (1999-04-22)	
A	WO 97 25426 A (CORIXA CORP) 17 July 1997 (1997-07-17)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/14845

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9807753 A	26-02-1998	CA 2232239 A	26-02-1998
		EP 0856010 A	05-08-1998
WO 9914230 A	25-03-1999	US 5922836 A	13-07-1999
		AU 9373798 A	05-04-1999
		NO 20001358 A	12-05-2000
US 5855889 A	05-01-1999	US 5668267 A	16-09-1997
		US 6004756 A	21-12-1999
		US 5968754 A	19-10-1999
		AT 190313 T	15-03-2000
		AU 698823 B	05-11-1998
		AU 5961696 A	18-12-1996
		BR 9609270 A	11-05-1999
		CA 2222747 A	05-12-1996
		CZ 9703783 A	17-06-1998
		DE 69607001 D	13-04-2000
		EP 0833834 A	08-04-1998
		ES 2145451 T	01-07-2000
		HU 9900873 A	28-07-1999
		JP 11507212 T	29-06-1999
		NO 975508 A	18-03-1998
		PL 323632 A	14-04-1998
		WO 9638463 A	05-12-1996
US 5922836 A	13-07-1999		
WO 9638463 A	05-12-1996	US 5668267 A	16-09-1997
		AT 190313 T	15-03-2000
		AU 698823 B	05-11-1998
		AU 5961696 A	18-12-1996
		BR 9609270 A	11-05-1999
		CA 2222747 A	05-12-1996
		CZ 9703783 A	17-06-1998
		DE 69607001 D	13-04-2000
		EP 0833834 A	08-04-1998
		ES 2145451 T	01-07-2000
		HU 9900873 A	28-07-1999
		JP 11507212 T	29-06-1999
		NO 975508 A	18-03-1998
		PL 323632 A	14-04-1998
		US 6004756 A	21-12-1999
		US 5968754 A	19-10-1999
		US 5855889 A	05-01-1999
US 5922836 A	13-07-1999		
WO 9919487 A	22-04-1999	AU 9804198 A	03-05-1999
		EP 1023443 A	02-08-2000
WO 9725426 A	17-07-1997	AU 1697497 A	01-08-1997
		BR 9707125 A	20-07-1999
		CA 2242340 A	17-07-1997
		CN 1211279 A	17-03-1999
		EP 0874902 A	04-11-1998
		NO 983183 A	10-09-1998

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 P	35/00	C 0 7 K	16/18	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/47	C 1 2 Q	1/68	A 4 C 0 8 7
	16/18	G 0 1 N	33/53	D 4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/06			M
C 1 2 Q	1/68		33/566	
G 0 1 N	33/53		33/574	A
	33/566	C 1 2 P	21/08	
	33/574	C 1 2 N	15/00	Z N A A
// C 1 2 P	21/08		5/00	E
		A 6 1 K	37/02	

(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, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, 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 ホウトン, レイモンド エル.
 アメリカ合衆国 ワシントン 98021,
 ボセル, 242エヌディー プレイス サ
 ウスイースト - 2636
- (72)発明者 リード, スティーブン ジー.
 アメリカ合衆国 ワシントン 98005,
 ベルビュー, 122エヌディー プレイス
 エヌイー - 2843

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 CA04 CA09 HA14
HA15
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ52 QR55
QR62 QS25 QS34
4B064 AG27 CA10 DA05 DA14
4B065 AA94 AC20 BD39 CA46
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA18
BA23 CA18 DA38 MA01 NA14
ZB261
4C085 AA03 AA14 BB01 CC03 DD62
EE06 FF24
4C087 BB43 CA04 CA12 DA20 DA31
MA01 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA76
EA28 EA31 EA51

专利名称(译)	用于治疗，诊断和监测乳腺癌的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2003502028A	公开(公告)日	2003-01-21
申请号	JP2001500662	申请日	2000-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	科里克萨有限公司		
申请(专利权)人(译)	Corixa公司公司		
[标]发明人	ファンガーギャリーリチャード ヘンドリクソンロナルドシー ホウトンレイモンドエル リードスティーブンジー		
发明人	ファンガー, ギャリー リチャード ヘンドリクソン, ロナルド シー. ホウトン, レイモンド エル. リード, スティーブン ジー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/26 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/06 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P35/00 C07K14/4721 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57415		
FI分类号	A61K35/26 A61K39/00.H A61K39/395.T A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA94 4B065/AC20 4B065/BD39 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DA38 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE06 4C085/FF24 4C087/BB43 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/DA20 4C087/DA31 4C087/MA01 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/EA51		
优先权	60/136528 1999-05-28 US 60/137048 1999-06-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于治疗，诊断和监测乳腺癌的组合物和方法。该组合物可以包含一种或多种mamaglobin表位，或其抗体或T细胞，并且可以用于例如预防和/或治疗乳腺癌。还提供了一种基于检测样品中是否存在磁珠蛋白表位或抗体或T细胞的诊断方法。还提供了一种用于检测患者血液或其部分中编码mamaglobin的RNA的方法。这些方法可用于检测和/或监测乳腺癌的进展。