(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2007-521791

(P2007-521791A)

(43)公表日　平成19年8月9日(2007.8.9)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | ZNAA | 2G045 |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N | 1/15 | | 4B024 |
| C12N 1/19 | (2006.01) | C12N | 1/19 | | 4B063 |
| C12N 1/21 | (2006.01) | C12N | 1/21 | | 4B064 |
| C12N 5/10 | (2006.01) | C12N | 5/00 | A | 4B065 |

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 107 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-571401 (P2004-571401)
(86)(22)出願日　平成15年4月1日 (2003.4.1)
(85)翻訳文提出日　平成17年12月5日 (2005.12.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/009992
(87)国際公開番号　WO2004/096124
(87)国際公開日　平成16年11月11日 (2004.11.11)
(81)指定国　AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71)出願人　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフオルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　ボールドウィン，　ダリル，　ティー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１２７，　サン　フランシスコ，　マンゲルス　ストリート　３１７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腫瘍の診断と治療のための組成物と方法

(57)【要約】
本発明は、哺乳動物の腫瘍の診断と治療のために有用な組成物と、同用途のために当該組成物を使用する方法に関するものである。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
図２（配列番号２）に示すＰＲＯ９２２４０をコードするヌクレオチド配列に対し、少なくとも８０％の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。
【請求項２】
図１（配列番号１）に示すヌクレオチド配列ＤＮＡ３４０５３５に対し、少なくとも８０％の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。
【請求項３】
図１（配列番号１）に示すヌクレオチド配列ＤＮＡ３４０５３５の完全長コード化配列に対し、少なくとも８０％の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。
【請求項５】
請求項１に記載の核酸を含むベクター。
【請求項６】
ベクターによって形質転換された宿主細胞により認識されるコントロール配列に対し、作用可能に結合する請求項５に記載のベクター。
【請求項７】
請求項５に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項８】
ＣＨＯ細胞、大腸菌細胞又は酵母細胞である、請求項７に記載の宿主細胞。
【請求項９】
請求項７に記載の宿主細胞を、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記ＰＲＯポリペプチドを回収することを含む、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド生成方法。
【請求項１０】
図２（配列番号２）に示すＰＲＯ９２２４０のアミノ酸配列に対し、少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含む単離されたポリペプチド。
【請求項１１】
残基６０－７２（配列番号２）、残基１４３－１５４（配列番号２）、残基２０１－２３３（配列番号２）、残基２９２－３０５（配列番号２）、残基３９０－３９７（配列番号２）、及び残基６１９－７１４（配列番号２）からなる群より選択された、請求項１０に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項１２】
異種アミノ酸配列に融合した請求項１０に記載のポリペプチドを含むキメラ分子。
【請求項１３】
前記異種アミノ酸配列が、免疫グロブリンのエピトープタグ配列又はＦｃ領域である、請求項１２に記載のキメラ分子。
【請求項１４】
請求項１０に記載のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに特異的に結合する抗体。
【請求項１５】
モノクローナル抗体、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である、請求項１４に記載の抗体。
【請求項１６】
（ａ）請求項１０に記載のポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアゴニスト、（ｃ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｄ）前記ポリペプチドに結合する抗体を、担体と組み合わせて含む物質からなる組成物。
【請求項１７】
担体が製薬的に許容可能な担体である、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）の治療的有効量を含む請求項１６に記載の組成物。
【請求項１９】

容器；
前記容器上のラベル；及び
前記容器内に収容された、（ａ）請求項１０に記載のＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアゴニスト、（ｃ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｄ）前記ポリペプチドに結合する抗体を含む物質からなる組成物
を備え、前記容器上のラベルに前記物質の組成物が免疫関連疾患の治療に使用可能であることを示す、製造品。
【請求項２０】
必要に応じて哺乳動物の細胞増殖性障害を軽減する方法であって、前記哺乳動物に対し、（ａ）請求項１０に記載のＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアゴニスト、（ｃ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｄ）前記ポリペプチドに結合する抗体、の治療的有効量を投与することを含む方法。
【請求項２１】
細胞増殖性障害が癌である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記癌が乳癌、肺癌又は卵巣癌である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを含むと思われる試料中において前記ポリペプチドの存在を決定する方法であって、前記試料を抗ＰＲＯ９２２４０抗体に曝し、前記試料の成分に対する前記抗体の結合を決定することを含む方法。
【請求項２４】
哺乳動物の癌の診断方法において、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料、及び（ｂ）同種の細胞の既知の正常組織細胞である対照試料において、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、対照試料よりも試験試料における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低い場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物に癌が存在することが示される方法。
【請求項２５】
哺乳動物の癌の診断方法において、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料に抗ＰＲＯ９２２４０抗体を接触させること、及び（ｂ）試験試料中における抗体とポリペプチドの複合体形成を検出することを含み、前記複合体が形成されている場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物に癌が存在することが示される方法。
【請求項２６】
必要に応じて哺乳動物の炎症性疾患を軽減する方法において、前記哺乳動物に対し、（ａ）請求項１０に記載のＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアゴニスト、（ｃ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｄ）前記ポリペプチドに結合する抗体の治療的有効量を投与することを含む方法。
【請求項２７】
前記炎症性疾患が、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、乾癬、骨関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節炎、全身性強皮症、特発性炎症性筋障害、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫媒介性腎疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄性疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害又はギランバレー症候群、及び慢性炎症性脱髄性多発神経障害、胆管疾患、例えば感染性、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性単肝炎、炎症性腸疾患、グルテン敏感性腸疾患、及びウィップル病、水泡性皮膚疾患、多形紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫性又は免疫媒介性皮膚病、アレルギー疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、移植片拒絶及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
哺乳動物の免疫反応の抑制方法であって、前記哺乳動物に対して有効量のＰＲＯ９２２

４０ポリペプチトアンタゴニストを投与することにより前記免疫反応を抑制する方法。
【請求項２９】
哺乳動物の炎症性免疫反応の診断方法において、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料、及び（ｂ）同種の細胞の既知の正常組織細胞である対照試料において、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、対照試料よりも試験試料における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低い場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物に炎症性免疫反応が存在することが示される方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の開示】
【０００１】
発明の分野
本発明は、哺乳動物における腫瘍の診断と治療に有用な物質の組成物と、同用途のために該物質の組成物を使用する方法に関する。
【０００２】
発明の背景
悪性腫瘍（癌）は、米国において心臓疾患に続き第２の主要な死亡原因である（Boring等，CA Cancel J. Clin. 43:7(1993)）。癌は、正常な組織から誘導されて腫瘍塊を形成する異常な又は腫瘍形成性の細胞の数の増加、これらの腫瘍形成性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、及び最終的に血液やリンパ系を介して局所のリンパ節や遠くの部位に転移と呼ばれる過程を介して広がる悪性細胞の生成を特徴とする。癌性状態においては、正常細胞が成長しない条件下で細胞が増殖する。癌自体は、異なる侵襲及び攻撃性の程度で特徴付けられる広範な種々の形態で顕現する。
癌の診断及び治療に効果的な細胞標的を発見する試みでは、研究者達は、一又は複数の正常な非癌性細胞と比較し、一又は複数の特定の型の癌細胞の表面に特に発現する膜貫通又はさもなければ膜結合型のポリペプチドの同定を探求してきた。しばしば、このような膜結合ポリペプチドは非癌性細胞の表面と比べて癌細胞の表面により豊富に発現される。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの治療を介する癌細胞を標的として特異的に破壊する能力を生み出す。この点、抗体ベースの治療が、ある種の癌の治療において非常に効果的であることが証明されていることが留意される。例えば、ハーセプチン（登録商標）及びリツキサン（登録商標）（双方共にジェネンテック社，サウス サンフランシスコ，カリフォルニア）は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫を治療するのに成功裏に用いられている抗体である。より具体的には、ハーセプチン（登録商標）は、ヒト上皮成長因子レセプター２（ＨＥＲ２）プロト-オンコジーンの細胞外ドメインに選択的に結合する組換えＤＮＡ誘導ヒト化モノクローナル抗体である。ＨＥＲ２タンパク質の過剰発現は、２５－３０％の原発性乳癌に観察される。リツキサン（登録商標）は、正常及び悪性Ｂリンパ球の表面に見出されるＣＤ２０抗原に対する遺伝子操作キメラマウス／ヒトモノクローナル抗体である。これら抗体の双方共、ＣＨＯ細胞中で組換え操作によって産生される。
【０００３】
癌の診断及び治療に効果的な細胞標的を発見する他の試みでは、研究者達は、（１）非癌性正常細胞の一又は複数の特定の型による場合と比較して癌細胞の一又は複数の特定の型によって特異的に産生される非膜結合ポリペプチド、（２）一又は複数の正常な非癌性細胞のものより有意に高い発現レベルで癌細胞により産生されるポリペプチド、又は（３）癌性及び非癌性状態の双方（例えば正常な前立腺及び前立腺腫瘍組織）においてその発現が一つの組織型（あるいは非常に制限された数の異なった細胞型）のみに特異的に限られているポリペプチドを探求してきた。このようなポリペプチドは癌細胞によって分泌されるか又は細胞内に残ったままでありうる。更に、このようなポリペプチドは、癌細胞自体ではなく、癌細胞に増強又は成長亢進効果を有するポリペプチドを産生及び／又は分泌する細胞によってむしろ発現されうる。そのような分泌ポリペプチドは、しばしば正常細胞を超える成長有利性を癌細胞に与えるタンパク質であり、例えば血管形成因子、細胞付

着因子、成長因子等の物を含む。このような非膜結合ポリペプチドのアンタゴニストの同定は、このような癌の治療のための効果的な治療剤となることが期待される。更に、このようなポリペプチドの発現パターンの同定は、哺乳動物における特定の癌の診断に役立つであろう。

哺乳動物の癌治療には上述のような進歩をみたものの、哺乳動物中の腫瘍の存在を検出することができる更なる診断薬及び腫瘍性細胞成長を効果的に阻害する治療薬はそれぞれ大いに必要とされている。従って、正常細胞上又は他の異なった癌細胞上と比較して癌細胞の一又は複数の型により豊富に発現される細胞膜結合ポリペプチド、又は癌性及び非癌性状態の双方（例えば正常な前立腺及び前立腺腫瘍組織）において一の（あるいは非常に制限された数の異なった）組織型のみに特異的に発現が限られているポリペプチドを同定し、これらのポリペプチド及びそれをコードする核酸を使用して、哺乳動物の癌の治療的処置及び診断的検出に有用な組成物を製造することが本発明の目的である。発現が単一又は非常に限られた数の組織に限られている細胞膜結合、ポリペプチドを同定し、そのポリペプチド及びそれをコードする核酸を使用して、哺乳動物の癌の治療的処置及び診断的検出に有用な組成物を製造することがまた本発明の目的である。

【０００４】

発明の概要

Ａ．実施態様

本明細書において、本出願人は、正常な非癌細胞の一又は複数の型の表面と比較して、癌細胞の一又は複数の型の表面でより多く発現されるポリペプチド（及びそのコード核酸又はその断片）の同定を最初に記載する。あるいは、そのようなポリペプチドは癌細胞に増強又は成長亢進効果を有するポリペプチドを産生及び／又は分泌する細胞によって発現される。あるいは、そのようなポリペプチドは、同じ組織型の正常な細胞と比較して腫瘍細胞によって過剰発現されることはないが、むしろ単一又は非常に限られた数の組織型（好ましくは生命に必須ではない組織、例えば前立腺等）の正常細胞と腫瘍細胞の双方によって特異的に発現されうる。ここで、本発明のポリペプチドは「ＰＲＯ９２２４０」ポリペプチドと呼ばれ、哺乳動物における癌治療及び診断の効果的な標的となることが予想される。

従って、本発明の一実施態様では、本発明は、腫瘍関連抗原性標的ポリペプチド又はその断片をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子を提供する。

【０００５】

ある側面では、単離された核酸分子は、（ａ）ここで開示されるアミノ酸配列を有する完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示される膜貫通ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞外ドメインで、シグナルペプチドを含む又は含まないもの、又はここに開示される完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするＤＮＡ分子、又は（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

他の側面では、単離された核酸分子は、（ａ）ここで開示される完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドｃＤＮＡのコード化配列、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのコード化配列、ここに開示される膜貫通ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞外ドメインのシグナルペプチドを含む又は含まないコード化配列、又はここに開示される完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片のコード化配列、又は（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の核酸配列同一性を有するヌ

クレオチド配列を含む。

【０００６】

更なる側面では、本発明は、（ａ）ここで開示されるＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの何れかの完全長コード化領域によってコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、又は（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

本発明の他の側面は、膜貫通ドメイン欠損又は膜貫通ドメイン不活性化のいずれかである、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列と相補的であるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここで開示されている。従って、ここに記載のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【０００７】

他の側面では、本発明は、（ａ）ここで開示される完全長アミノ酸配列を有するＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示される膜貫通ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞外ドメインで、シグナルペプチドを伴う又は伴わないもの、又はここで開示される完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするヌクレオチド配列、又は（ｂ）（ａ）のヌクレオチド配列の相補鎖とハイブリダイズする単離された核酸分子に関する。この点に関して、本発明の実施態様は、例えば、診断プローブ、アンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとして有用なハイブリダイゼーションプローブとしての用途を見出し得る、ここに開示される、完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化配列の断片、又はその相補鎖、又は抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに結合する他の小有機分子の結合部位を含むポリペプチドを任意にコードし得る完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのコード化断片に関する。このような核酸断片は、通常は少なくとも約５のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、又は１０００ヌクレオチド長であり、この文脈において「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の１０％を加えるか又は減じたものを意味する。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、よく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用してＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することによって、常套的に決定しうることが知られている。そのようなＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片の全てがここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコードされるＰＲＯ９２２４０

ポリペプチド断片、好ましくは抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに結合する他の小有機分子に対する結合部位を含んでなるＰＲＯ９２２４０ポリペプチド断片である。

【０００８】

他の実施態様では、本発明は上記において特定した単離された核酸配列の何れかによりコードされる単離されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを提供する。

ある側面では、本発明は、ここに開示される完全長アミノ酸配列を有するＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここに開示されるシグナルペプチドを欠くＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示されるシグナルペプチドを有するか又は有しない膜貫通ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドタンパク質の細胞外ドメイン、ここに開示される核酸配列の任意のもの、又はここに開示される完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアミノ酸配列でその他の具体的に定まった断片によってコードされているアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに関する。

【０００９】

更なる側面では、本発明は、ここに開示されてＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの何れかによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに関する。

特定の態様では、本発明は、Ｎ末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たない単離されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされている。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法には、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含有するベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを回収することを含む。

【００１０】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失したか又は膜貫通ドメインが不活性化している単離されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを提供する。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法には、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを回収することを含む。

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここで記載されているポリペプチドの何れかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに開示されているポリペプチドの何れかの製造方法がさらに提供され、所望するポリペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望するポリペプチドを回収することを含んでなる。

【００１１】

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチドに融合した、ここに開示のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの何れかを含む単離したキメラポリペプチドを提供する。そのようなキメラ分子の例は、例えば、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンのＦｃ領域等の異種ポリペプチドと融合したここに開示のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの何れかを含む。

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの何れかと、好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、その抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体又は抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド抗体がその各抗原性エピトープと結合するのを競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体

は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の抗体は、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞で産生され、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。診断の目的に対しては、本発明の抗体は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりする。

【００１２】

本発明の他の実施態様では、本発明はここで開示されている抗体の何れかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、この宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに記載されている抗体の製造方法が更に提供され、所望する抗体の発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望する抗体を回収することを含んでなる。

他の実施態様では、本発明は、上記の又は下記のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの何れかに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチド（「ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド」）を提供する。場合によっては、本発明のＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等とコンジュゲートされうる。本発明のＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。診断の目的に対しては、本発明のＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、検出可能に標識されたり、固体支持体等に付着させられたりする。

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここで記載されているＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドの何れかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに記載されているＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドの任意のものを製造する方法が更に提供され、所望するオリゴペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養からその所望するオリゴペプチドを回収することを含んでなる。

他の実施態様では、本発明は、上記の又は下記のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの何れかに、好ましくは特異的に、結合する小有機分子（「ＰＲＯ９２２４０結合有機分子」）を提供する。場合によっては、本発明のＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等とコンジュゲートし得る。本発明のＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。診断の目的に対しては、本発明のＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、検出可能に標識されたり、固体支持体等に付着させられたりしうる。

【００１３】

より更なる実施態様では、本発明は、担体と組み合わされて、ここに記載のＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここに記載のキメラＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここに記載の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ここに記載のＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド、又はここに記載のＰＲＯ９２２４０結合有機分子を含有する組成物に関する。場合によっては、この担体は薬学的に受容可能な担体である。

更に他の実施態様では、本発明は、容器及び容器内に収容された組成物を含む製造品に関し、その組成物には、ここに記載のＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここに記載のキメラＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここに記載の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ここに記載のＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド、又はここに記載のＰＲＯ９２２４０結合有機分子が含まれ得る。製造品は、更に場合によっては、腫瘍の治療的処置又は診断的検出のためのこの組成物の使用に言及する、容器に添付したラベル、又は容器内に含まれるパッケージ挿入物を含みうる。

本発明の他の実施態様は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、キメラＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチ

ド、又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子に反応する症状の治療に有用な医薬の調製のための、ここに記載のＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここに記載のキメラＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ここに記載の抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド抗体、ここに記載のＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド、又はここに記載のＰＲＯ９２２４０結合有機分子の使用に関する。

【００１４】

Ｂ．更なる実施態様

本発明の他の実施態様は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞の成長を阻害する方法に関し、該方法は、細胞を、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子と接触させることを含み、ここでＰＲＯ９２２４０ポリペプチドへの抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合がＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞の成長の阻害を引き起こす。好適な実施態様では、細胞は癌細胞であり、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドへの抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合がＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞の死を引き起こす。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド及びＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の方法に用いられる抗体及びＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

本発明の更に他の実施態様は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞を含む癌性細胞を持つ哺乳動物を治療的に処置する方法に関し、該方法は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子の治療的に有効な量を哺乳動物に投与することを含み、それによって腫瘍の効果的な治療的処置が達成される。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド及びＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされうる。本発明の方法に用いられる抗体及びオリゴペプチドは、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

本発明の更に他の実施態様は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを含むと思われる試料中のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの存在を決定する方法に関し、該方法は、試料をＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子に曝して、試料中のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドへの抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合を定量することを含み、そのような結合の存在が、試料中のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの存在を示す。場合によっては、試料は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現すると思われる細胞（癌細胞であり得る）を含み得る。この方法で用いる抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、場合によっては検出可能なように標識されたり、固体支持体に付着させられたりする。

【００１５】

本発明の更なる実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、（ａ）前記哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び（ｂ）同じ組織源又は型の既知の正常な非癌性細胞のコントロール試料中における、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較して、試験試料中のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのより高いレベルの発現が、試験試料が得られた哺乳動物での腫瘍の存在を示す。

本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、（ａ）哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料を、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子と接触させ、（ｂ）試験試料中での、抗体、オリゴペプチド又は小有機分子とＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの間で形成される複

合体を検出することを含んでなり、複合体の形成が、哺乳動物での腫瘍の存在を示す。場合によっては、用いられる抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりするか、及び／又は組織細胞の試験試料が癌性腫瘍を有すると思われる個体から得られる。

【００１６】

本発明の更に他の実施態様は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの改変、好ましくは増加された発現又は活性に関連した細胞増殖性疾患を治療又は防止する方法に関し、該方法はそのような治療を必要とする患者に、有効量のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのアンタゴニストを投与することを含んでなる。好ましくは、細胞増殖性疾患は癌であり、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのアンタゴニストは抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合有機分子又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。細胞増殖性疾患の効果的な治療又は防止はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞の直接の死滅化又は成長阻害の結果又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞成長増強活性のアンタゴナイズによるものでありうる。

本発明の更に他の実施態様はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞へ抗体、オリゴペプチド又は小有機分子を結合させる方法に関し、該方法は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞を、上記抗体、オリゴペプチド又は小有機分子に、抗体、オリゴペプチド又は小有機分子が上記ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに結合するのに適した条件下で接触させ、それらの結合を可能にすることを含んでなる。

【００１７】

本発明の他の実施態様は（ａ）ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする核酸又はその核酸を含むベクター又は宿主細胞、（ｃ）抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド抗体、（ｄ）ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド、又は（ｅ）ＰＲＯ９２２４０結合小有機分子の、（ｉ）癌又は腫瘍の治療的処置又は診断的検出、又は（ｉｉ）細胞増殖性疾患の治療的処置又は防止に有用な医薬の製造における使用に関する。

本発明の他の実施態様は、癌細胞の成長を阻害する方法に関し、ここで、上記癌細胞の成長はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの成長増強効果に少なくとも部分的に依存し（ここで、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは癌細胞自体又は癌細胞に成長増強効果を有するポリペプチドを産生する細胞の何れかによって発現されうる）、該方法は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子にＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを接触させることを含んでなり、それによってＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの成長増強活性をアンタゴナイズし、次には癌細胞の成長を阻害する。好ましくは癌細胞の成長は完全に阻害される。更により好ましくは、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドへの抗体、オリゴペプチド又は小有機分子の結合は癌細胞の死を誘導する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法において使用される抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド及びＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされうる。本発明の方法に用いられる抗体及びＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

【００１８】

本発明の更に他の実施態様は、哺乳動物において腫瘍を治療的に処置する方法に関し、ここで、上記腫瘍の成長はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの成長増強効果に少なくとも部分的に依存し、該方法は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子を哺乳動物に投与することを含んでなり、それによって上記ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの成長増強活性をアンタゴナイズし、腫瘍の効果的な治療的処置をもたらす。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法において使用される抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド及びＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、例えば、メイタンシノイド又は

カリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされうる。本発明の方法に用いられる抗体及びオリゴペプチドは、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

【００１９】

好ましい実施態様の詳細な説明

Ｉ．定義

ここで使用される「ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド」及び「ＰＲＯ９２２４０」という用語は、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペプチド変異体の断片（ここでさらに定義される）を包含する。ここに記載されているＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、あるいは組換え又は合成法によって調製してもよい。「ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド」を指すこの明細書の全ての開示は、各ポリペプチドを個々に指すと同時に集合的に指す。例えば、調製、精製、誘導、抗体の形成、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドの形成、ＰＲＯ９２２４０結合有機分子の形成、投与、含有する組成物、疾患の治療等の記載は、本発明の各ポリペプチドに関している。「ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド」という用語は、また、ここに記載のＰＲＯ９２２４０／数字ポリペプチドの変異体を含む。

【００２０】

「天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド」には、天然由来のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに対応する同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。このような天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもできる。「天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド」という用語には、特に、特定のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明のある実施態様では、ここに開示される天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、添付図に示される完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドン（示されているならば）は、図において太字及び下線で示した。添付図に「Ｎ」で示した核酸残基は、任意の核酸残基である。しかし、添付図に開示したＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、図面においてアミノ酸位置１としてここに表示されたメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置１の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし、可能でもある。

【００２１】

ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ＥＣＤ」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの形態を意味する。通常、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドＥＣＤは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを１％未満、好ましくはそのようなドメインを０．５％未満しか持たない。本発明のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインの何れかの末端から約５アミノ酸を越えない可能性が高い。場合によっては、従って、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞外ドメインは、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン／細胞外ドメインの境界の何れかの側から約５を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

【００２２】

ここに開示する種々のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、本明細書及び／又は添付図に示されうる。しかし、シグナルペプチドのＣ末

端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドＣ末端境界の何れかの側で約５アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのＣ末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうることに留意される（例えば、Nielsen等，Prot. Eng.10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等，Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986)）。更に、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全に均一ではなく、一つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのＣ末端境界の何れかの側の約５アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

【００２３】

「ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド変異体」とはＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、好ましくは、ここに開示するような完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列、ここで開示するようなシグナルペプチドを欠くＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列、ここに開示するようなシグナルペプチドを有する又は有しないＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示する完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを示す核酸によってコードされるもの）と少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを意味する。このようなＰＲＯ９２２４０ポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のＮ末端又はＣ末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドが含まれる。通常、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列の任意の具体的に定義した他の断片に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％のアミノ酸配列同一性を有している。通常、ＰＲＯ９２２４０変異体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸長、あるいは少なくとも約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、ＰＲＯ９２２４０変異体ポリペプチドは、天然ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列に比較して一つ以下の保存的アミノ酸置換、あるいは天然ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列に比較して２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０以下の同類アミノ酸置換を有するにすぎない。

【００２４】

ここで同定したＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列に関する「パーセント(％)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定

することができる。しかし、ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２プログラム用の完全なソースコードが下記の表１に提供されている配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表１に示したソースコードは米国著作権庁，ワシントンD.C.，20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ，カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表１に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標）Ｖ４．０Ｄでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ-２プログラムによって設定され変動しない。

【００２５】

アミノ酸配列比較にＡＬＩＧＮ-２が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Ａの、与えられたアミノ酸配列Ｂへの、それとの、又はそれに対する％アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Ｂへの、それとの、又はそれに対する或る程度の％アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Ａと言うこともできる)は次のように計算される：

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-２のＡ及びＢのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと異なる場合、ＡのＢに対する％アミノ酸配列同一性は、ＢのＡに対する％アミノ酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。％アミノ酸配列同一性の計算の例として、表２及び３は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「ＰＲＯ９２２４０」と称されるアミノ酸配列に対する％アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「ＰＲＯ９２２４０」は対象の仮想ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象の「ＰＲＯ９２２４０」ポリペプチドと比較したポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「Ｘ」、「Ｙ」及び「Ｚ」は、それぞれ異なる仮定アミノ酸残基を表す。特に断らない限りは、ここで使用される全ての％アミノ酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２コンピュータプログラムを用いて直ぐ上の段落に記載されるようにして得られる。

【００２６】

「ＰＲＯ９２２４０変異体ポリヌクレオチド」又は「ＰＲＯ９２２４０変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、好ましくは活性ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードし、ここに開示する完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列（完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの完全なコード化配列の一部分のみを表す核酸によってコードされた）と、少なくとも約８０％の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、ＰＲＯ９２２４０変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【００２７】

通常、ＰＲＯ９２２４０変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約５ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、又は１０００ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の１０％を加えるか又は減じたものを意味する。

【００２８】

ここで同定されるＰＲＯ９２２４０コード化核酸配列に対する「パーセント(％)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のＰＲＯ９２２４０核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、％核酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２プログラム用の完全なソースコードが下記の表１に提供されている配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表１に示したソースコードは米国著作権庁,ワシントン D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ，カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表１に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標）Ｖ４．０Ｄでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ-２プログラムによって設定され変動しない。

【００２９】

核酸配列比較にＡＬＩＧＮ-２が用いられる状況では、与えられた核酸配列Ｃの、与えられた核酸配列Ｄとの、又はそれに対する％核酸配列同一性（あるいは、与えられた核酸配列Ｄと、又はそれに対して或る程度の％核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Ｃと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｗ／Ｚの１００倍

ここで、Ｗは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-２のＣ及びＤのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ＺはＤの全ヌクレオチドである。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと異なる場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。％核酸配列同一性の計算の例として、「ＰＲＯ９２２４０-ＤＮＡ」が対象となる仮説的ＰＲＯ９２２４０コード化核酸配列を表し、「比較ＤＮＡ」が対象となる「ＰＲＯ９２２４０-ＤＮＡ」核酸分子と比較している核酸分子のヌクレオチド配列を表し、そして「Ｎ」、「Ｌ」及び「Ｖ」の各々が異なった仮想ヌクレオチドを表していて、表４及び５に「比較ＤＮＡ」と称される核酸配列の「ＰＲＯ９２２４０-ＤＮＡ」と称される核酸配列に対

する％核酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここでの全ての％核酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにＡＬＩＧＮ-２コンピュータプログラムを用いて得られる。

【００３０】

他の実施態様では、ＰＲＯ９２２４０変異体ポリヌクレオチドとは、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに記載の完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションすることができる。ＰＲＯ９２２４０変異体ポリペプチドは、ＰＲＯ９２２４０変異体ポリヌクレオチドによってコードされているものであり得る。

ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」という用語は、（添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される）本発明の完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を意味する。ＡＴＣＣ寄託核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」という用語は、（添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される）ＡＴＣＣに寄託されたベクター中に挿入されているｃＤＮＡのＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード部分を意味する。

【００３１】

ここに開示される種々のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを記載するために使用される「単離」とは、自然環境の成分から同定され及び分離及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、ポリペプチドは、(１)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５残基のＮ末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、(２)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でＳＤＳ-ＰＡＧＥにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

【００３２】

「単離された」ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞中に存在する特異的なポリペプチドをコードする核酸分子とは区別される。しかし、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常は発現する細胞に含まれるポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なＤＮＡ配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列と、リボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

【００３３】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのＤＮＡは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのＤＮＡに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作

用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したＤＮＡ配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【００３４】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングに必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、変性ＤＮＡの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション配列の間で所望される相同性の程度が高くなればなるほど、用いることができる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにすることになり、低い温度はストリンジェントを低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明については、Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology（Wiley Interscience Publishers，1995）を参照のこと。

【００３５】

ここで定義される「ストリンジェント条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、（１）洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、５０℃において０．０１５Ｍの塩化ナトリウム／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；（２）ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、４２℃において５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミドと０．１％ウシ血清アルブミン／０．１％フィコール／０．１％のポリビニルピロリドン／５０ｍＭのｐＨ６．５のリン酸ナトリウムバッファー、及び７５０ｍＭの塩化ナトリウム、７５ｍＭクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は（３）４２℃における５０％ホルムアミド、５ｘＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５ｘデンハード液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳ、及び４２℃での１０％の硫酸デキストランと、４２℃における０．２ｘＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）の１０分間の洗浄、ついで５５℃におけるＥＤＴＡを含む０．１ｘＳＳＣからなる高ストリンジェンシー洗浄を用いるものによって同定される。

【００３６】

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual（New York: Cold Spring Harbor Press，1989）に記載されているように同定され、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及び％ＳＤＳ）の使用を含む。中程度のストリンジェント条件は、２０％ホルムアミド、５ｘSSC（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５ｘデンハード液、１０％硫酸デキストラン、及び２０ｍｇ／ｍｌの変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中の３７℃での終夜インキュベーション、次いで１ｘＳＳＣ中３７－５０℃でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

【００３７】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合したＰＲＯ９２２４０ポリペプチド又は抗ＰＲＯ９２２４０抗体を含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう充

分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも６のアミノ酸残基、通常は約８～５０のアミノ酸残基(好ましくは、約１０～２０の残基)を有する。

ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるＰＲＯ９２２４０の生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの形態を意味し、その中で、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生ＰＲＯ９２２４０が保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘発する能力以外の、天然又は天然発生ＰＲＯ９２２４０によって引き起こされる生物機能（阻害又は刺激）を意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生ＰＲＯ９２２４０が保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘発する能力を意味する。

【００３８】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、そしてここに開示した天然ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全にブロック、阻害、又は中和する任意の分子が含まれる。同じように、「アゴニスト」という用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子が含まれる。適切なアゴニスト又はアンタゴニスト分子には、特にアゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、又は天然ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小有機分子等が含まれる。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと候補アゴニスト又はアンタゴニスト分子を接触させ、そして通常はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに関連している一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することが含まれ得る。

【００３９】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は衰え（小さく）させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患に既に罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。本発明の方法に従って抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子の治療量を投与された後に、患者が次の一又は複数のものについて観察可能な及び／又は測定可能な減少又は消失を示したならば、被検体又は哺乳動物は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド発現癌に関して成功裏に「治療された」ことになる：癌細胞の数の減少、又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟部組織及び骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍成長のある程度の阻害；及び／又は特定の癌に関連している一又は複数の症状のある程度の緩和；疾病率及び死亡率の減少、及び生命問題の質の改善。ある程度、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、生存癌細胞の成長を防ぐ及び／又は死滅させることができ、それは、細胞増殖抑制及び／又は細胞障害性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は、また、患者が感じることができる。

【００４０】

疾患における成功裏の治療及び改善を評価することに関する上記のパラメーターは、医師にとってよく知られている日常的手法によって容易に測定が可能である。癌治療では、有効性は、例えば、病気の進行までの時間（ＴＴＰ）の算定及び／又は反応速度（ＲＲ）を確かめることによって測定できる。転移は、ステージング試験によって、骨のスキャン及び骨への広がりを確かめるためのカルシウムレベル及び他の酵素に関する試験によって確かめることができる。ＣＴスキャンは、また、領域の骨盤及びリンパ節への広がりを探索することで行うことができる。胸のＸ線、及び既知の方法による肝臓の酵素レベルの測定を、それぞれ肺及び肝臓への転移を探索するために用いる。疾患をモニタリングする他の常套的方法には、経直腸的超音波断層法（ＴＲＵＳ）及び経直腸的針生検（ＴＲＮＢ）

が含まれる。

【００４１】

より局所的な癌である膀胱癌に関しては、疾患の進行を確かめる方法には、膀胱鏡検査による尿細胞評価、尿中に存在する血液のモニタリング、超音波断層撮影又は静脈性腎盂像、コンピュータ断層撮影法（ＣＴ）及び磁気共鳴映像法（ＭＲＩ）による尿路上皮性路の視覚化が含まれる。遠隔転移の存在は、腹部のＣＴ、胸Ｘ線、又は骨格の放射性核種イメージングによって評価することができる。

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするために、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

癌の治療、症状の緩和又は診断のための「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数の更なる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

【００４２】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる服用量及び濃度でそれらに曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性ｐＨ緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えば、ＴＷＥＥＮ（登録商標）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、及びＰＬＵＲＯＮＩＣＳ(登録商標)を含む。

【００４３】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコーンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第４２７５１４９号に記載されたような別々の粒子の不連続な固相も含む。

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、それらに対する抗体又はＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド）輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した２層構造に配列される。

【００４４】

ここで定義されている「小」分子又は「小」有機分子とは、約５００ダルトン未満の分子量である。

ここに開示するポリペプチド、抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合有機分子、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」とは、特に述べた目的を実施するために十分な量のことである。「有効量」は、述べられた目的に関連して、経験的及び常套的な形で決定することができる。

「治療的有効量」という用語は、患者又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するのに

効果的な抗体、ポリペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合有機分子又は他の薬剤の量を指す。癌の場合、治療的に有効量の薬は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害（すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止）し；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度まで減速及び好ましくは停止）し；腫瘍成長をある程度まで阻害し；及び／又は癌に関連する一又は複数の症状をある程度まで緩和する。「治療する」のここでの定義を参照せよ。薬が存在する癌細胞の成長を妨げ及び／又は死滅させる程度まで、それは、細胞分裂停止及び／又は細胞障害性であり得る。

【００４５】

抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子の「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子の「成長阻害量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子の「細胞障害性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子の「細胞障害性量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗ＰＲＯ９２２４０モノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ(polyepitopic)特異性を持つ抗ＰＲＯ９２２４０抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗ＰＲＯ９２２４０抗体、及び所望する生物学的又は免疫学的活性を示す限りは抗ＰＲＯ９２２４０抗体の断片（下記を参照）を包含する。「免疫グロブリン」（Ｉｇ）という用語は、ここでの抗体と相互に置き換え可能に用いられる。

【００４６】

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、抗体は、(１)ローリー(Lowry)法によって定量して９５重量％以上の、最も好ましくは９９重量％以上の抗体まで、（２）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５のＮ末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分な程度まで、あるいは(３)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【００４７】

基本的な４-鎖抗体ユニットは２つの同一の軽(Ｌ)鎖と２つの同一の重(Ｈ)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(ＩｇＭ抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するＪ鎖と称される付加的なポリペプチドの５つからなり、よって１０の抗原結合部位を有するが、分泌されたＩｇＡ抗体は重合して、基本的４-鎖ユニットとそれ付随するＪ鎖のうち２-５つを含む多価集合を形成可能である)。ＩｇＧの場合、４-鎖ユニットは一般的に約１５００００ダルトンである。それぞれのＬ鎖は１つの共有ジスルフィド結合によってＨ鎖に結合するが、２つのＨ鎖はＨ鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのＨ及びＬ鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのＨ鎖は、α及びγ鎖の各々に対しては３つの定常ドメイン($C_H$)が、μ及びεアイソタイプに対しては４つの$C_H$ドメイン

が続く可変ドメイン($V_H$)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン($C_L$)が続く可変ドメイン($V_L$)をN末端に有する。$V_L$は$V_H$と整列し、$C_L$は重鎖の第一定常ドメイン($C_H1$)と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。$V_L$と$V_H$は共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

【0048】

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン($C_H$)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれα、δ、ε、γ及びμと呼ばれる重鎖を有する。さらにγ及びαのクラスは、$C_H$配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2が発現する。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。Vドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110-アミノ酸スパンを通して均等には分布されていない。代わりに、V領域は、それぞれ9－12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分離された15－30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不変の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きなβ-シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、β-シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している（Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害(ADCC)における抗体の寄与を示す。

【0049】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(すなわち、$V_L$においては、およそ残基24－34(L1)、50－56(L2)及び89－97(L3)、及び$V_H$においては、およそ1－35(H1)、50－65(H2)及び95－102(H3)；Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest,5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))及び／又は「高度可変ループ」からの残基(例えば、$V_L$においては、およそ残基26－32(L1)、50－52(L2)及び91－96(L3)、及び$V_H$においては、およそ26－32(H1)、53－55(H2)及び96－101(H3);Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。

【0050】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば

、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えＤＮＡ法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第４８１６５６７号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及びMarks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

【００５１】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第４８１６５６７号;及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

「無傷」の抗体は、抗原-結合部位、並びに$C_L$及び少なくとも重鎖定常ドメイン、$C_H1$、$C_H2$及び$C_H3$を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

【００５２】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、及びＦｖ断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体（米国特許第５６４１８７０号、実施例２；Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]）；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Ｆｃ」断片を産生する。Ｆａｂ断片は全長Ｌ鎖とＨ鎖の可変領域ドメイン($V_H$)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン($C_H1$)からなる。各Ｆａｂ断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな$F(ab')_2$断片が生じ、これは２価の抗原結合部位を持つ２つのジスルフィド結合されたＦａｂ断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Ｆａｂ'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む$C_H1$ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりＦａｂ断片と相違する。Ｆａｂ'-ＳＨは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つＦａｂ'を表す。$F(ab')_2$抗体断片は、通常はＦａｂ'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【００５３】

Ｆｃ断片はジスルフィドにより一緒に保持されている双方のＨ鎖のカルボキシ末端部位を含む。抗体のエフェクター機能は、Ｆｃ領域の配列により決定され、その領域は、所定の型の細胞に見出されるＦｃレセプター(ＦｃＲ)によって認識される部位である。

「Ｆｖ」は、完全な抗原-認識及び-結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した１本の重鎖と１本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。これら２つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する６つの高頻度可変ループ(Ｈ及びＬ鎖から、それぞれ３つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な３つのＣＤＲのみを含んでなるＦｖの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【００５４】

「ｓＦｖ」又は「ｓｃＦｖ」とも略称される「単鎖Ｆｖ」は、単一のポリペプチド鎖内に結合した$V_H$及び$V_L$抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、ｓＦｖポリペプチドは$V_H$及び$V_L$ドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それはｓＦＶが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。ｓＦｖの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)；Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でＶドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち２つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、$V_H$と$V_L$ドメインとの間に、短いリンカー(約５-１０残基)を持つｓＦｖ断片（前の段落を参照）を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは２つの「交差」ｓＦｖ断片のヘテロダイマーであり、そこでは２つの抗体の$V_H$及び$V_L$ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第４０４０９７号；国際公開９３／１１１６１号；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【００５５】

非ヒト(例えば齧歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(ＦＲ)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのＦＲがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Ｆｃ)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986)；Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。

【００５６】

「種依存性抗体」、例えば哺乳動物抗-ヒトＩｇＥ抗体は、二番目の哺乳動物種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも、一番目の哺乳動物種からの抗原に対してより強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原（すなわち、約$1 \times 10^{-7}$Ｍ以下、好ましくは約$1 \times 10^{-8}$以下、最も好ましくは約$1 \times 10^{-9}$Ｍ以下の結合親和性（Ｋｄ）値を有する）と「特異的に結合」するが、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約５０倍、又は少なくとも約５００倍、又は少なくとも約１０００倍弱い、二番目の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上にて定義した種々の型の抗体のいずれでもあることが可能だが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

【００５７】

「ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド」はここで記載される様なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組み換え技術を用いて調製及び精製することができる。ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約５のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６

１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第５５５６７６２号、同第５７５０３７３号、同第４７０８８７１号、同第４８３３０９２号、同第５２２３４０９号、同第５４０３４８４号、同第５５７１６８９号、同第５６６３１４３号；ＰＣＴ公開第ＷＯ８４／０３５０６号、及びＷＯ８４／０３５６４号；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla,S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman,H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson,T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks,J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。

【００５８】

「ＰＲＯ９２２４０結合有機分子」とは、ここに記載されるようなＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。ＰＲＯ９２２４０結合有機分子は既知の方法（例えばＰＣＴ公開第ＷＯ００／００８２３号及びＷＯ００／３９５８５号参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。ＰＲＯ９２２４０結合有機分子は通常、約２０００ダルトン未満の大きさであり、あるいは約１５００、７５０、５００、２５０又は２００ダルトン未満の大きさであり、ここに記載される様なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えばＰＣＴ公開第ＷＯ００／００８２３号及びＷＯ００／３９５８５号参照）。

【００５９】

対象の抗原、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的と「結合する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、その抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子がその抗原を発現している細胞又は組織を標的とする診断及び／又は治療剤として有用であり、他のタンパク質と有意には交差反応しないように十分な親和性でその抗原と結合するものである。そのような実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標示式細胞分取器（ＦＡＣＳ）分析又は放射免疫沈降（ＲＩＡ）によって定量して、その特定の標的タンパク質との抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合の約１０％よりも低い。標的分子への抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に結合活性を持たない類似した構造の分子であるコントロール分子の結合性と比較して、分子の結合性を定量することによって測定することができる。例えば、特異的な結合性は、標的、例えば過剰の非標識標的に類似したコントロール分子とも競合にとって定量することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されるならば、特異的結合が表示される。ここで使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、例えば標的に対して少なくと

も約$10^{-4}$M、あるいは少なくとも約$10^{-5}$M、あるいは少なくとも約$10^{-6}$M、あるいは少なくとも約$10^{-7}$M、あるいは少なくとも約$10^{-8}$M、あるいは少なくとも約$10^{-9}$M、あるいは少なくとも約$10^{-10}$M、あるいは少なくとも約$10^{-11}$M、あるいは少なくとも約$10^{-12}$M、あるいはそれ以上のＫｄを持つ分子によって示されうる。一実施態様では、「特異的に結合する」という用語は、如何なる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへ実質的に結合することなく分子が特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合する結合を意味する。

【００６０】

「ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する腫瘍細胞の成長を阻害する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子、又は「成長阻害」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、適切なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、癌細胞の表面上に発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞によって産生され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましい成長阻害抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、一般的には、試験された抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、２０％より多く、好ましくは約２０％から約５０％、そしてさらに好ましくは５０％よりも多く（例えば、約５０％から約１００％）でＰＲＯ９２２４０発現腫瘍細胞の成長を阻害する。一実施態様では、成長阻害は、細胞培養で約０．１から３０μｇ／ｍｌ又は約０．５ｎＭから２００ｎＭの抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、成長阻害を１－１０日で確かめる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、下記の実験実施例に記載しているような種々の方法で確かめることができる。約１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇ体重の抗ＰＲＯ９２２４０抗体の投与が、最初の抗体の投与から約５日から３ヶ月内、好ましくは約５から３０日内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はインビボで成長阻害性である。

【００６１】

「アポトーシスを誘発する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、アネキシンＶの結合、ＤＮＡの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び／又は膜小胞の形成(アポトーシス体と呼ばれる)等により決定されるようなプログラム細胞死を誘発するものである。細胞は、通常、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを過剰発現しているものである。好ましくは、細胞は腫瘍細胞、例えば前立腺、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、肺、腎臓、結腸、膀胱細胞である。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン(ＰＳ)転位置をアネキシン結合により測定することができ；ＤＮＡ断片化はＤＮＡラダーリングにより評価することができ；ＤＮＡ断片化に伴う細胞核／クロマチン凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、アネキシン結合アッセイにおいて、アポトーシスを誘発する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、未処理細胞の約２～５０倍、好ましくは約５～５０倍、最も好ましくは約１０～５０倍のアネキシン結合を誘発するという結果を生じるものである。

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域（天然配列Ｆｃ領域又はアミノ酸配列変異体Ｆｃ領域）に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞障害；Ｆｃレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ＡＤＣＣ)；貪食作用；細胞表面レセプター（例えば、Ｂ細胞レセプター）のダウンレギュレーション；及びＢ細胞活性化が含まれる。

【００６２】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ＡＤＣＣ」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球及びマクロファージ）上に存在するＦｃレセプター(ＦｃＲｓ)と結合した分泌Ｉｇにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。抗体は細胞障害細胞を「備えて」おり、これはこ

のような死滅には絶対に必要なものである。ＡＤＣＣを媒介する主要な細胞ＮＫ細胞はＦｃγＲＩＩＩのみを発現するのに対し、単球はＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ及びＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞でのＦｃＲの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991) の４６４頁の表３に要約されている。対象の分子のＡＤＣＣ活性をアッセイするために、米国特許第５５００３６２号又は同第５８２１３３７号に記載されているようなインビトロＡＤＣＣアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のＡＤＣＣ活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

「Ｆｃレセプター」又は「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なＦｃＲは天然配列ヒトＦｃＲである。さらに好適なＦｃＲは、ＩｇＧ抗体（ガンマレセプター）と結合するもので、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ及びＦｃγＲＩＩＩサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。ＦｃγＲＩＩレセプターには、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性型レセプター」）及びＦｃγＲＩＩＢ（「阻害型レセプター」）が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターＦｃγＲＩＩＡは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif ；ＩＴＡＭ）を含んでいる。阻害型レセプターＦｃγＲＩＩＢは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ；ＩＴＩＭ）を含んでいる（Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照）。ＦｃＲsに関しては、 Ravetch and Kinet, Annu.Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J.Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のＦｃＲsはここでの「ＦｃＲ」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性ＩｇＧｓが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターＦｃＲｎ（Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol.24:249 (1994))も含まれる。

【００６３】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のＦｃＲｓを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくともＦｃγＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を実行することが望ましい。ＡＤＣＣを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞（ＰＢＭＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、細胞障害性Ｔ細胞及び好中球が含まれるが、ＰＢＭＣとＮＫ細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

「補体依存性細胞障害」もしくは「ＣＤＣ」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(Ｃｌｑ)の第１補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

【００６４】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ様悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌(squamous cell cancer)(例えば扁平上皮細胞癌)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫(squamous carcinoma)を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃(gastric)又は腹部(stomach)癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓(kidney)又は腎(renal)癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、多発性骨髄

腫及びＢ細胞リンパ腫、脳、並びに頭部及び頸部の癌、及び関連した転移が含まれる。

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖を伴う疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

【００６５】

「細胞死を誘導する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、生細胞を生育不能にするものである。細胞は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現するもの、好ましくは、同じ組織型の正常細胞と比較してＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを過剰発現する細胞である。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、癌細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞により生成され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましくは、その細胞は癌細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害（ＡＤＣＣ）又は補体依存性障害（ＣＤＣ）によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清（すなわち、補体の無い）を用いて、免疫エフェクター細胞が無い状態でおこなってもよい。抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が細胞死を誘導するか否かを確かめるために、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルー（Moore等 Cytotechnology 17: 1-11(1995)）又は７ＡＡＤの取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と関連して評価することができる。好ましい細胞死を誘導する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、ＢＴ４７４細胞でのＰＩ取り込みアッセイで、ＰＩ取り込みを誘導するものである。

【００６６】

「ＰＲＯ９２２４０発現細胞」は、細胞の表面上に又は分泌形態で内因性又は形質移入されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する。「ＰＲＯ９２２４０発現癌」は、細胞表面上に存在するＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを有する、又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを生成し分泌する細胞を含む癌である。任意には、「ＰＲＯ９２２４０発現癌」は、その細胞の表面上に十分なレベルのＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを生成し、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子はそれへ結合することができ、癌に関して治療的効果を有する。他の実施態様では、任意には「ＰＲＯ９２２４０発現癌」は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子アンタゴニストが結合することができ、癌に対して治療的有効量を有するように十分なレベルのＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを産生及び分泌する。後者に関して、アンタゴニストは腫瘍細胞による分泌ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの産生及び分泌を減少、抑制又は阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面に顕著により高いレベルのＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを有する、或いは産生及び分泌するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅又は増大した転写又は翻訳によって生じ得る。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド過剰発現は、診断又は予後アッセイにおいて、細胞の表面上に存在する、あるいは細胞により分泌されるＰＲＯ９２２４０タンパク質の増大したレベルを評価することによって定量されうる（例えば、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする単離された核酸から、組み換えＤＮＡ技術を用いて調製することができる単離されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに対して調製した抗ＰＲＯ９２２４０抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して；ＦＡＣＳ分析など）。あるいは、又は付加的に、例えば、ＰＲＯ９２２４０コード化核酸又はその相補鎖と一致する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイツハイブリダイゼーション；（ＦＩＳＨ；１９９８年１０月公開の国際公開９８／４５４７９を参照せよ）、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術、例えばリアルタイム定量ＰＣＲ（ＲＴ-ＰＣＲ）を介して、細胞のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化核酸又はｍＲＮＡのレベルを測定してもよい。また、例えば、抗体ベースアッセイを用いて、血清のような生物学的体液中に流れている抗原を測定する

ことによって、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド過剰発現を研究してもよい（同じく、例えば、１９９０年６月１２日に発行の米国特許第４９３３２９４号；１９９１年４月１８日に公開の国際公開９１／０５２６４；１９９５年３月２８日に発行の米国特許第５４０１６３８号；Sias等，J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990)を参照せよ）。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイは、熟練技術者に入手可能である。例えば、患者の体の中にある細胞を、例えば、放射活性アイソトープのような検出可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば、放射活性の外部スキャンニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって評価することができる。

【００６７】

ここで用いられているように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、ＩｇＧ-１、ＩｇＧ-２、ＩｇＧ-３、又はＩｇＧ-４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ-１及びＩｇＡ-２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はＩｇＭなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識化」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子を作製するために、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子に直接的又は間接的に結合させる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。

【００６８】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、$At^{211}$、$I^{131}$、$I^{125}$、$Y^{90}$、$Re^{186}$、$Re^{188}$、$Sm^{153}$、$Bi^{212}$、$P^{32}$及びＬｕの放射性同位体）、化学治療薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド類（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【００６９】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にＰＲＯ９２２４０発現癌細胞の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、成長阻害剤は、Ｓ期でＰＲＯ９２２４０発現細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を（Ｓ期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばＧ１停止又はＭ期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なＭ期ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン類、及びトポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またＧ１停止させるこれらの薬剤は、Ｓ期停止にも波及し、例えば、ＤＮＡアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５-フルオロウラシル、及びアラ-Ｃである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に１３頁に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来する

ドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、ローン・プーラン ローラー）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、ブリストル-マイヤー スクウィブ）の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

「ドキソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビシンの完全な化学名は、(８Ｓ-シス)-１０-[(３-アミノ-２，３，６-トリデオキシ-α-Ｌ-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-７，８，９，１０-テトラヒドロ-６，８，１１-トリヒドロキシ-８-(ヒドロキシアセチル)-１-メトキシ-５，１２-ナフタセンジオンである。

【００７０】

「サイトカイン」なる用語は、一つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエータとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、Ｎ-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、及び黄体化ホルモン（ＬＨ）；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-α及び-β；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（ＴＰＯ）；ＮＧＦ-β等の神経成長因子；血小板成長因子；ＴＧＦ-α及びＴＧＦ-β等のトランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）；インシュリン様成長因子-Ｉ及びＩＩ；エリスロポエチン（ＥＰＯ）；骨誘発因子；インターフェロン-α、-β、及び-γ等のインターフェロン；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、例えばマクロファージ-ＣＳＦ（Ｍ-ＣＳＦ）；顆粒球-マクロファージ-ＣＳＦ（ＧＭ-ＣＳＦ）；及び顆粒球-ＣＳＦ（Ｇ-ＣＳＦ）；インターロイキン（ＩＬ）、例えばＩＬ-１、ＩＬ-１ａ、ＩＬ-２、ＩＬ-３、ＩＬ-４、ＩＬ-５、ＩＬ-６、ＩＬ-７、ＩＬ-８、ＩＬ-９、ＩＬ-１１、ＩＬ-１２；腫瘍壊死因子、例えばＴＮＦ-α及びＴＮＦ-β；及びＬＩＦ及びキットリガンド（ＫＬ）を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる際、用語サイトカインには、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌及び／又はその治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指す。

【００７１】

表1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define  _M      -8      /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26] = {
/*    A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */   { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */   { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */   {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */   { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */   { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */   {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */   { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */   {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */   {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */   {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */   {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */   {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */   { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */   {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M, 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */   { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */   { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */   {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */   { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */   { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */   { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */   {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */   {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */   { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

表1(続き)

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define  MAXJMP          16      /* max jumps in a diag */
#define  MAXGAP          24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define  JMPS            1024    /* max jmps in an path */
#define  MX              4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define  DMAT            3       /* value of matching bases */
#define  DMIS            0       /* penalty for mismatched bases */
#define  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  PINS1           4       /* penalty per residue */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short  x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                      /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int             score;          /* score at last jmp */
        long            offset;         /* offset of prev block */
        short           ijmp;           /* current jmp index */
        struct jmp      jp;             /* list of jmps */
};

struct path {
        int     spc;            /* number of leading spaces */
        short   n[JMPS];/* size of jmp (gap) */
        int     x[JMPS];/* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;                 /* output file name */
char            *namex[2];              /* seq names: getseqs() */
char            *prog;                  /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];               /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                   /* best diag: nw() */
int             dmax0;                  /* final diag */
int             dna;                    /* set if dna: main() */
int             endgaps;                /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;             /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;             /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;           /* total size of gaps */
int             smax;                   /* max score: nw() */
int             *xbm;                   /* bitmap for matching */
long            offset;                 /* current offset in jmp file */
struct  diag    *dx;                    /* holds diagonals */
struct  path    pp[2];                  /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

表1(続き)

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static    _dbval[26] = {
          1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static    _pbval[26] = {
          1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
          128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
          1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
          1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                                          main
          int       ac;
          char      *av[];
{
          prog = av[0];
          if (ac != 3) {
                    fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                    fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                    fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                    fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                    fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                    exit(1);
          }
          namex[0] = av[1];
          namex[1] = av[2];
          seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
          seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
          xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

          endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
          ofile = "align.out";        /* output file */

          nw();               /* fill in the matrix, get the possible jmps */
          readjmps();         /* get the actual jmps */
          print();            /* print stats, alignment */

          cleanup(0);         /* unlink any tmp files */}
```

表1(続き)

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;
        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

表1(続き)

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
```

...nw

```
        id = xx - yy + len1 - 1;
        if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                col1[yy] = mis;
```

表1(続き)

```
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;                }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);                        }
```

表1(続き)

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC     3
#define P_LINE  256     /* maximum output line */
#define P_SPC   3       /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()                                                          print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();             }
```

表1(続き)

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                    getmat
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;
        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

表1(続き)

...getmat

```
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
 static          nm;             /* matches in core -- for checking */
 static          lmax;           /* lengths of stripped file names */
 static          ij[2];          /* jmp index for a path */
 static          nc[2];          /* number at start of current line */
 static          ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
 static          siz[2];
 static char     *ps[2];         /* ptr to current element */
 static char     *po[2];         /* ptr to next output char slot */
 static char     out[2][P_LINE]; /* output line */
 static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
```

pr_align

```
pr_align()
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;
                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                po[i] = out[i];                 }
```

表1(続き)

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {                                   ...pr_align
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;
                        more++;
                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;
                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                                                     dumpblock
{
        register  i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

表1(続き)

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')){
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
```

nums

```
nums(ix)
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;
        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
```

putline

```
putline(ix)
        int     ix;                     {
```

表1(続き)

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[] is current element (from 1)
         * nc[] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}


/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
           !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

stars

表1（続き）

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                                    stripname
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

表1(続き)

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;
int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                   getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;
        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

表1(続き)

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++){
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
char    *
g_calloc(msg, nx, sz)                                                    g_calloc
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                                               readjmps
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register  i, j, xx;
        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                                ;
```

表1(続き)

...readjmps

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;                                    }
                else
                        break;                  }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;
                        /* id = xx - yy + len1 - 1                                   */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
}
/* reverse the order of jmps    */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
}                                       }
```

表1(続き)

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                                    writejmps
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

【００７２】

表2

| | | |
|---|---|---|
| PRO92240 | XXXXXXXXXXXXXXX | (長さ = 15 アミノ酸) |
| 比較タンパク質 | XXXXXYYYYYYY | (長さ = 12 アミノ酸) |

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)
÷ (PRO92240 ポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =

5 ÷ 15 = 33.3%

表3

| | | |
|---|---|---|
| PRO92240 | XXXXXXXXXX | (長さ = 10 アミノ酸) |
| 比較タンパク質 | XXXXXYYYYYYZZYZ | (長さ = 15 アミノ酸) |

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)
÷ (PRO92240 ポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =

5 ÷ 10 = 50%

**表４**

| | | |
|---|---|---|
| **PRO92240-DNA** | **NNNNNNNNNNNNN** | **(長さ = 14 ヌクレオチド)** |
| **比較 DNA** | **NNNNNNLLLLLLLLL** | **(長さ = 16 ヌクレオチド)** |

**% 核酸配列同一性 =**

**（ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数）**
**÷（PRO92240-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数）＝**
**6 ÷ 14 = 42.9%**

**表５**

| | | |
|---|---|---|
| **PRO92240-DNA** | **NNNNNNNNNNN** | **(長さ = 12 ヌクレオチド)** |
| **比較 DNA** | **NNNNLLLVV** | **(長さ = 9 ヌクレオチド)** |

**%核酸配列同一性 =**

**（ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数）**
**÷（PRO92240-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数）＝**
**4 ÷ 12 = 33.3%**

【００７３】
ＩＩ．本発明の組成物及び方法
Ａ．抗ＰＲＯ９２２４０抗体
一実施態様では、本発明は、ここで治療及び／又は診断薬としての用途が見出され得る抗ＰＲＯ９２２４０抗体を提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。
【００７４】
１．ポリクローナル抗体
ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原（特に、合成ペプチドが用いられる場合）を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、ＳＯＣｌ$_2$、又はＲ及びＲ$^1$が異なるアルキル基であるＲ$^1$ Ｎ＝Ｃ＝ＮＲを用いて結合させることができる。
動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート１００μｇ又は５μｇ（それぞれウサギ又はマウスの場合）を完全フロイントアジュバント３容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。１ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の１／５ないし１／１０のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加

免疫する。７ないし１４日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【００７５】

２．モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler等, Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えＤＮＡ法(米国特許第４８１６５６７号)によって作成することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。免疫化の後、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞（融合のパートナーとも呼ばれる）の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(ＨＧＰＲＴ又はＨＰＲＴ)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、ＨＧＰＲＴ－欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含有するであろう(ＨＡＴ培地)。

【００７６】

好ましい融合のパートナーである骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞は、マウス骨髄腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、ＵＳＡより入手し得るＭＯＰＣ-２１およびＭＰＣ-１１マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニア、ＵＳＡより入手し得るＳＰ-２又はＸ６３-Ａｇ８-６５３細胞から誘導されるものである。ヒト骨髄腫及びマウス－ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている（Kozbor, J.Immunol., 133:3001 (1984)；Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,51-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)）。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)又は酵素結合免疫吸着検定(ＥＬＩＳＡ)によって測定する。

【００７７】

例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson等, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキャッチャード分析によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び／又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、Ｄ-ＭＥＭ又はＲＰＭＩ-１６４０培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、例えばマウスへの細胞の腹腔内注射によって、インビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマト

グラフィー（例えばプロテインＡ又はプロテインＧ-セファロースを用いる）又はイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析等のような常套的な抗体精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。

モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、常法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、ＤＮＡを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするＤＮＡの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。

【００７８】

更なる実施態様では、抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから分離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及び Marks等, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(ｎＭ範囲)のヒト抗体の生成(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

抗体をコードするＤＮＡは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン（$C_H$及び$C_L$）の配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第４，８１６，５６７号；Morrison等, Proc.Nat.Acad.Sci.,USA,81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド（異種ポリペプチド）のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する１つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【００７９】

３．ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-ＰＲＯ９２２４０抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(例えばＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(ＣＤＲ)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のＣＤＲの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのＦＲ領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列である、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Ｆｃ)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む［Jone

s等，Nature，321:522-525 (1986)；Riechmann等，Nature，332:323-329 (1988)；及びPresta，Curr. Op Struct. Biol.，2:593-596 (1992)］。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター(Winter)及び共同研究者［Jones等，Nature，321:522-525 (1986)；Riechmann等，Nature，332:323-327 (1988)；Verhoeyen等，Science，239:1534-1536 (1988)］の方法に従って、齧歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第４，８１６，５６７号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのＣＤＲ残基及び場合によっては幾つかのＦＲ残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【００８０】

抗体がヒトの治療用途を意図している場合、抗原性及びＨＡＭＡ反応(ヒト抗-マウス抗体)を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒトＶドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク（ＦＲ）をヒト化抗体のために受け入れる(Sims等，J. Immunol.，151:2296 (1993)；Chothia等，J. Mol. Biol.，196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，89:4285 (1992)；Presta等，J. Immunol.，151:2623(1993))。

更に、抗体を、抗原に対する高結合親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グログリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、ＦＲ残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【００８１】

ヒト化抗ＰＲＯ９２２４０抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を生成するために、状況に応じて一又は複数の細胞傷害剤(類)と結合していてもよい抗体断片、例えばＦａｂであってもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷ＩｇＧ１抗体であってもよい。

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域($J_H$)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，90:2551 (1993)；Jakobovits等，Nature 362:255-258 (1993)；Bruggeman等，Year in Immuno.，7:33 (1993)；米国特許第５５４５８０６号、同５５６９

８２５号、同５５９１６６９号（全てジェンファーム(GenPharm)）；同５５４５８０７号；及び国際公開第９７／１７８５２号を参照されたい。

【００８２】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等，Nature 348：552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(Ｖ)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばＭ１３又はｆｄの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはＢ細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる；例えばJohnson，Kevin S. 及びChiswell，David J.，Current Opinion in Structural Biology 3：564-571(1993)を参照せよ。Ｖ-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等，Nature，352：624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のＶ遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのＶ遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等，Ｊ．Mol．Biol．222：581-597(1991)、又はGriffith等，EMBO Ｊ．12：725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第５５６５３３２号及び同５５７３９０５号を参照のこと。

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したＢ細胞により産生することができる(米国特許第５５６７６１０号及び同５２２９２７５号)。

【００８３】

４．抗体断片

ある状況下では、抗体全体よりも、抗体断片を用いることに利点がある。より小さな大きさの断片によって迅速なクリアランスが可能となり、固形腫瘍への接近の改良につながり得る。

抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等，Science，229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接産生することができる。Ｆａｂ、Ｆｖ及びＳｃＦｖ抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の産生が容易となった。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリから単離することができる。別法として、Ｆａｂ'-ＳＨ断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてＦ(ａｂ')$_2$断片を形成することができる(Carter等，Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、Ｆ(ａｂ')$_2$断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。インビボ半減期が増した、サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含むＦａｂ及びＦ（ａｂ’）$_2$が、米国特許第５８６９０４６号に記載されている。抗体断片を生成するのための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖Ｆｖ断片(ｓｃＦｖ)である。国際公開９３／１６１８５号；米国特許第５５７１８９４号；及び米国特許第５５８７４５８号を参照のこと。Ｆｖ及びｓＦｖは、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である；従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。ｓＦｖ融合タンパク質は、ｓＦｖのアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering，Borrebaeck編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第５６４１８７０号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

【００８４】

５．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、ＰＲＯ９２２４０タンパク質の２つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のタンパク質に対する結合部位とＰＲＯ９２２４０結合部位とが結合しうる。あるいは、抗ＰＲＯ９２２４０アームは、ＰＲＯ９２２４０-発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、ＦｃγＲＩ(ＣＤ６４)、ＦｃγＲＩＩ(ＣＤ３２)及びＦｃγＲＩＩＩ(ＣＤ１６)等のＩｇＧ(ＦｃγＲ)に対するＦｃレセプター、又はＴ細胞レセプター分子(例えばＣＤ３)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はＰＲＯ９２２４０を発現する細胞に細胞障害性剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はＰＲＯ９２２４０結合アーム及び細胞障害性剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン-α、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばＦ(ａｂ')２二重特異性抗体)として調製することができる。

国際公開第９６／１６６７３号には、二重特異性抗-ＥｒｂＢ２／抗-ＦｃγＲＩＩＩ抗体が記載されており、米国特許第５８３７２３４号には、二重特異性抗-ＥｒｂＢ２／抗-ＦｃγＲＩ抗体が開示されている。二重特異性抗-ＥｒｂＢ２／Ｆｃα抗体は国際公開第９８／０２４６３号に示されている。米国特許第５８２１３３７号は、二重特異性抗-ＥｒｂＢ２／抗-ＣＤ３抗体を教示するものである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は１０個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第９３／０８８２９号及びTraunecker等、EMBO Ｊ. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【００８５】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、$C_H$２及び$C_H$３領域を含むＩｇ重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域($C_H$１)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているＤＮＡを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、２または３個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

この手法の好ましい実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第９４／０４６９０号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

【００８６】

米国特許第５７３１１６８号に記載された他の手法によれば、一対の抗体分子間の界面

を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は$C_H$３ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第２の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第４６７６９８０号）、及びＨＩＶ感染の治療のために提案された（国際公開第９１／００３６０号、同９２／２００３７３号、及び欧州特許第０３０８９号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、あらゆる簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第４６７６９８０号に開示されている。

【００８７】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, Science, 229:81 (1985) は無傷の抗体をタンパク分解性に切断して$F(ab')_2$断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜砒酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたＦａｂ'断片はついでチオニトロベンゾアート(ＴＮＢ)誘導体に変換される。Ｆａｂ'-ＴＮＢ誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりＦａｂ'-チオールに再変換し、他のＦａｂ'-ＴＮＢ誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

最近の進歩により、大腸菌からのＦａｂ'-ＳＨ断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等,J.Exp.Med., 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体$F(ab')_2$分子の製造を記述している。各Ｆａｂ'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトＴ細胞、及びＥｒｂＢ２レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【００８８】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。Kostelny等, J.Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。Ｆｏｓ及びＪｕｎタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のＦａｂ'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger等, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の２つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより$V_L$に$V_H$を結合してなる。従って、一つの断片の$V_H$及び$V_L$ドメインは他の断片の相補的$V_L$及び$V_H$ドメインと強制的に対形成させられ、よって２つの抗原結合部位を形成する。単鎖Ｆｖ(ｓＦｖ)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J.Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J.Immunol. 147:60(1991)。

【００８９】

６．ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、２つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため［米国特許第４６７６９８０号］及びＨＩＶ感染の治療のために［国際公開第９１／００３６０；国際公開第９２／２００３７３；欧州特許第０３０８９号］提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-４-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第４６７６９８０号に開示されたものが含まれる。

【００９０】

７．多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び／又は異化)されうる。本発明の抗体は、３又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(ＩｇＭクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと３又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはＦｃ領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はＦｃ領域と、Ｆｃ領域のアミノ末端に３又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は３ないし８、好ましくは４の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも１つのポリペプチド鎖(好ましくは２つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は２又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)は$VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$を有し、ここでＶＤ１は第１の可変ドメインであり、ＶＤ２は第２の可変ドメインであり、ＦｃはＦｃ領域のポリペプチド鎖の一つであり、Ｘ１及びＸ２はアミノ酸又はポリペプチドを表し、ｎは０又は１である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：ＶＨ-ＣＨ１-柔軟なリンカー-ＶＨ-ＣＨ１-Ｆｃ領域鎖；又はＶＨ-ＣＨ１-ＶＨ-ＣＨ１-Ｆｃ領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも２つ(好ましくは４つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約２～約８の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはＣＬドメインを更に有する。

【００９１】

８．エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞障害性（ＡＤＣＣ）及び／又は補体依存細胞障害性（ＣＤＣ）を向上させることは望ましい。これは、抗体のＦｃ領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされうる。あるいは又はさらに、システイン残基をＦｃ領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体－依存細胞性細胞障害性（ＡＤＣＣ）を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、２つのＦｃ領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びＡＤＣＣ能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第５７３９２７７号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、ＩｇＧ分子

のインビボ血清半減期を増加させる原因であるＩｇＧ分子(例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$又はＩｇＧ$_4$)のＦｃ領域のエピトープを意味する。

【００９２】

９．免疫複合体

また、本発明は、化学治療薬、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、$^{212}$Ｂｉ、$^{131}$Ｉ、$^{131}$Ｉｎ、$^{90}$Ｙ及び$^{186}$Ｒｅが含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、Ｎ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオール)プロピオナート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートＨＣＬ等）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレート等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン２，６-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン等）を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-１４-標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ-ＤＴＰＡ）は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開９４／１１０２６参照。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコセン(trichothene)及びＣＣ１０６５、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【００９３】

メイタンシン及びメイタンシノイド

好ましい一実施態様では、本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している。

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第３８９６１１１号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びＣ-３メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第４１５１０４２号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第４１３７２３０号；同４２４８８７０号；同４２５６７４６号；同４２６０６０８号；同４２６５８１４号；同４２９４７５７号；同４３０７０１６号；同４３０８２６８号；同４３０８２６９号；同４３０９４２８号；同４３１３９４６号；同４３１５９２９号；同４３１７８２１号；同４３２２３４８号；同４３３１５９８号；同４３６１６５０号；同４３６４８６６号；同４４２４２１９号；同４４５０２５４号；同４３６２６６３号；及び同４３７１５３３号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。

【００９４】
メイタンシノイド-抗体コンジュゲート
治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第５，２０８，０２０号、同５，４１６，０６４号、欧州特許第０４２５２３５Ｂ１号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93：8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体Ｃ２４２に結合するＤＭ１と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等，Cancer Research，52：127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体Ａ７、又はＨＥＲ-２／ｎｅｕオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体ＴＡ.１に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。ＴＡ.１-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞ＳＫ-ＢＲ-３におけるインビトロで試験され、細胞当たり３ｘ１０$^{5}$ ＨＥＲ-２表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。Ａ７-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。
【００９５】
抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド抗体-メイタンシノイドコンジュゲート(免疫コンジュゲート)
抗ＰＲＯ９２２４０抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗ＰＲＯ９２２４０抗体を化学的に結合させることにより調製される。１分子の毒素／抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均３-４のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第５２０８０２０号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。
例えば、米国特許第５２０８０２０号又は欧州特許第０４２５２３５Ｂ１号、及びChari等，Cancer Research，52：127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。
【００９６】
抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、スクシンイミジル-４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１-カルボキシラート、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-２，６-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン)を使用し

て作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供されるＮ-スクシンイミジル-４-(２-ピリジルチオ)ペンタノアート(ＳＰＰ)及びＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)(Carlsson等, Biochem. J. 173：723-737[1978])が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するＣ-３位、ヒドロキシメチルで修飾されたＣ-１４位、ヒドロキシル基で修飾されたＣ-１５位、及びヒドロキシル基を有するＣ-２０位で生じる。好ましい実施態様において、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のＣ-３位で形成される。

【００９７】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗ＰＲＯ９２２４０抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖ＤＮＡ破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第５７１２３７４号、同５７１４５８６号、同５７３９１１６号、同５７６７２８５号、同５７７０７０１号、同５７７０７１０号、同５７７３００１号、同５８７７２９６号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、$\gamma_1^I$、$\alpha_2^I$、$\alpha_3^I$、Ｎ-アセチル-$\gamma_1^I$、ＰＳＡＧ及び$\theta^I_1$(Hinman等, Cancer Research, 53：3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58：2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるＱＦＡである。カリケアマイシン及びＱＦＡは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【００９８】

他の細胞障害性剤

本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、ＢＣＮＵ、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び５-フルオロウラシル、米国特許第５０５３３９４号、同５７７０７１０号に記載されており、集合的にＬＬ-Ｅ３３２８８複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第５８７７２９６号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素Ａ鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)プロテイン(ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ及びＰＡＰ-Ｓ)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、１９９３年１０月２８日公開の国際公開第９３／２１２３２号を参照のこと。

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はＤＮＡエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ；ＤＮアーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

【００９９】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗ＰＲＯ９２２４０抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、$At^{211}$、$I^{131}$、$I^{125}$、$Y^{90}$、$Re^{186}$、$Re^{188}$、$Sm^{153}$、$Bi^{212}$、$P^{32}$、$Pb^{212}$及びＬｕの放射性同位体が含まれる。コ

ンジュゲートが診断用に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えばｔｃ$^{99m}$又はＩ$^{123}$、又は核磁気共鳴(ＮＭＲ)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-１２３、ヨウ素-１３１、インジウム-１１１、フッ素-１９、炭素-１３、窒素-１５、酸素-１７、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-１９を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えばｔｃ$^{99m}$又はＩ$^{123}$、Ｒｅ$^{186}$、Ｒｅ$^{188}$及びＩｎ$^{111}$は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-９０はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80：49-57)は、ヨウ素-１２３の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【０１００】

抗体と細胞障害性剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、スクシンイミジル-４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１-カルボキシラート、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-２,６-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、１,５-ジフルオロ-２,４-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-１４標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(ＭＸ-ＤＴＰＡ)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第９４／１１０２６号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害性剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52：127-131(1992)；米国特許第５２０８０２０号)。

別法として、抗ＰＲＯ９２２４０抗体及び細胞障害性剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。ＤＮＡの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの２つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

他の実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【０１０１】

１０．免疫リポソーム

ここで開示されている抗ＰＲＯ９２２４０抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した２層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985)；Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980)；及び米国特許第４４８５０４５号及び同４５４４５４５号；及び１９９７年１０月２３日に公開の国際公開９７／３８７３１に記載されているように、当該分

野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第５０１３５５６号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びＰＥＧ-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(ＰＥＧ-ＰＥ)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のＦａｂ'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤はリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照されたい。

【０１０２】

Ｂ．ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド

本発明のＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドはここで記載される様なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチドである。ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製及び生成することができる。ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約５のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第５５５６７６２号、同第５７５０３７３号、同第４７０８８７１号、同第４８３３０９２号、同第５２２３４０９号、同第５４０３４８４号、同第５５７１６８９号、同第５６６３１４３号；ＰＣＴ公開第ＷＯ８４／０３５０６号、及びＷＯ８４／０３５６４号；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002(1984)；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla,S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman,H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson,T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks,J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。

【０１０３】

この点において、バクテリオファージ（ファージ）ディスプレイは、大きなオリゴペプチドライブラリを検索して、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるこれらライブラリのメンバーを同定することを可能にするよく知られた技術の一つである。ファージディスプレイは、様々なポリペプチドがバクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質に融合タンパク質として表示されることによる技術である（Scott,J.K.及びSmith G. P. (1990) Science 249:386)。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異体（又はランダムクローンｃＤＮＡ）の大きなライブラリを標的分子に高い親和性で結合するこれらの配列について素早く効果的に分類することができる点にある。ファージでのペプチド（Cwirla,S.E.等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8

7:6378）又はタンパク質（Lowman,H.B.ら (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson,T.ら (1991) Nature, 352: 624; Marks,J.D.等 (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363）ライブラリのディスプレイは、特異的に結合する特性を有するものについて無数のポリペプチド又はオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている（Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668）。ランダム突然変異体のファージライブラリの分類は、多数の変異体を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強の結果を評価する手段を必要とする。米国特許第５２２３４０９号、同第５４０３４８４号、同第５５７１６８９号、及び同第５６６３１４３号。

【０１０４】

ほとんどのファージディスプレイ法は繊維状ファージを使用していたが、λファージディスプレイシステム（ＷＯ９５／３４６８３；米国特許第５６２７０２４号）、Ｔ４ファージディスプレイシステム（Ren等, Gene, 215:439 (1998); Zhu等、Cancer Research, 58(15):3209-3214 (1998); Jiang等, Infection & Immunity, 65(11):4770-4777 (1997); Ren等、Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci. 5:1833 (1996); Efimov等、Virus Genes, 10:173 (1995)）及びＴ７ファージディスプレイシステム（Smith及びScott, Methods in Enzymology, 217:228-257 (1993); 米国特許第５７６６９０５号）も知られている。

【０１０５】

現在、基礎的なファージディスプレイ構想の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラリをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のための組み換え反応手段について記載があり（ＷＯ９８／１４２７７）及びファージディスプレイライブラリは二分子相互作用（ＷＯ９８／２０１６９；ＷＯ９８／２０１５９）及び拘束性ヘリックスペプチドの特性（ＷＯ９８／２００３６）を分析及び制御するために使用されている。ＷＯ９７／３５１９６は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリを接触させて結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドの単離方法を記載する。ＷＯ９７／４６２５１は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリをバイオパニングし、次いで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌（Staphlylococcus aureus）タンパク質Ａの親和性タグとしての使用も報告されている（Li等, (1998) Mol Biotech., 9:187）。ＷＯ９７／４７３１４は、ファージディスプレイライブラリでもよいコンビナトリアルライブラリを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法はＷＯ９７／０９４４６に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第５４９８５３８号、同第５４３２０１８号、及びＷＯ９８／１５８３３に記載されている。

ペプチドライブラリの作製及びこれらのライブラリのスクリーニングの方法は、米国特許第５７２３２８６号、同第５４３２０１８号、同第５５８０７１７号、同第５４２７９０８号、同第５４９８５３０号、同第５７７０４３４号、同第５７３４０１８号、同第５６９８４２６号、同第５７６３１９２号、及び同第５７２３３２３号に記載される。

【０１０６】

Ｃ．ＰＲＯ９２２４０結合有機分子

ＰＲＯ９２２４０結合有機分子とは、ここに記載されるようなＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。ＰＲＯ９２２４０結合有機分子は既知の方法（例えばＰＣＴ公開第ＷＯ００／００８２３及びＷＯ００／３９５８５号参照）を用いて同定され、化学的

に合成されうる。ＰＲＯ９２２４０結合有機分子は通常、約２０００ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約１５００、７５０、５００、２５０又は２００ダルトンの大きさであり、ここに記載される様なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えばＰＣＴ公開第ＷＯ００／００８２３及びＷＯ００／３９５８５号参照）。ＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、Ｎ置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

【０１０７】

Ｄ．所望する特性を有する抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド及びＰＲＯ９２２４０結合有機分子のスクリーニング

ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド及び有機分子を生成する技術を、上記にて記載した。所望するような、所定の生物学的特性を有する抗体、オリゴペプチド又は有機分子をさらに選択することができる。

本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の成長阻害効果を、例えば、内因的又はＰＲＯ９２２４０遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及びＰＲＯ９２２４０形質移入細胞は、数日間（例えば、２－７）、種々の濃度の本発明の抗ＰＲＯ９２２４０モノクローナル抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理し、クリスタル・バイオレット又はＭＴＴで染色、又は幾つかの他の比色アッセイによって分析し得る。増殖を測定するその他の方法は、本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子の存在又は非存在下で処理した細胞の$^{3}$Ｈ-チミジン取り込みを比較することによる。処理の後、細胞を収集し、ＤＮＡへ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの成長阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。好ましくは、腫瘍細胞は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを過剰発現するものである。好ましくは、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、ある実施態様では約０．５から３０μｇ／ｍｌの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約２５－１００％、より好ましくは約３０－１００％、そしてさらにより好ましくは約５０－１００％又は７０－１００％のＰＲＯ９２２４０発現腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害する。成長阻害は、細胞培養で、約０．５から３０μｇ／ｍｌ又は０．５ｎＭから２００ｎＭの抗体濃度で測定することができ、その成長阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後１-１０日で確かめられる。約１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇ体重での抗ＰＲＯ９２２４０抗体の投与が、抗体の最初の投与から約５日から３ヶ月、好ましくは約５から３０日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで成長阻害作用がある。

【０１０８】

細胞死を誘発する抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルー又は７ＡＡＤの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対

照と比較して求める。ＰＩ取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切な抗ＰＲＯ９２２４０抗体（例えば約１０μｇ／ｍｌ）、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子を含有する培地でインキュベートする。細胞を３日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために３５ｍｍのストレーナキャップ付き１２ｘ７５チューブ(チューブ当たり１ｍｌ、処理グループ当り３チューブ)に等分する。次いで、チューブへＰＩ（１０μｇ／ｍｌ）を与える。サンプルをＦＡＣＳＣＡＮ(登録商標）フローサイトメータとＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ(登録商標）セルクエスト(CellQuest)ソフトウエア(Becton Dickinson)を使用して分析してもよい。ＰＩ取込みによって測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子は、細胞死誘発抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子として選択することができる。

関心のある抗体が結合したＰＲＯ９２２４０ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。既知の抗ＰＲＯ９２２４０抗体のように、試験抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が同じ部位又はエピトープと結合するならば、このアッセイを確定するために用いることができる。あるいは、又は付加的に、エピトープマッピングを、当該分野で周知の方法によって行うことができる。例えば、接触残基を同定するために、例えばアラニンスキャンニングによって抗体配列を変異させることができる。この変異体抗体は、適切なフォールディングを確かめるために、最初にポリクローナル抗体との結合について試験される。異なる方法では、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの異なる領域と一致するペプチドを、試験抗体群又は試験抗体及び特徴付けられた又は既知のエピトープを有する抗体による競合アッセイで用いることができる。

【０１０９】

Ｅ．抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ＡＤＥＰＴ)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開８１／０１１４５を参照)を活性な抗癌剤へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュゲートすることによって、ＡＤＥＰＴにおいて使用することができる。例えば国際公開８８／０７３７８及び米国特許第４９７５２７８号を参照されたい。

ＡＤＥＰＴに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞毒形態に変換するようにプロドラッグへ作用し得る任意の酵素が含まれる。

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアリールスルファターゼ；非毒性５-フルオロシトシンを抗癌剤５-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンＢ及びＬ)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なもの；Ｄ-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの変換に有用なＤ-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なノイラミニダーゼ及びβガラクトシダーゼ；βラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換させるのに有用なβラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換するのに有用なペニシリンＶアミダーゼ又はペニシリンＧアミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを変換させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されている

ようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗ＰＲＯ９２２４０抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えＤＮＡ技術を使用して作成することができる(Neuberger等, Nature 312:604-608[1984])。

【０１１０】

Ｆ．完全長ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド

本発明は、本出願でＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、種々のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするｃＤＮＡ（部分及び完全長）が同定され単離された。

【０１１１】

Ｇ．抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチド変異体

ここに記載した抗ＰＲＯ９２２４０抗体及び完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに加えて、抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチド変異体も調製できると考えられる。抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチド変異体は、コード化ＤＮＡに適当なヌクレオチド変化を導入することによって、及び／又は所望の抗体又はポリペプチドを合成することによって調製できる。当業者は、アミノ酸変化がグリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などの抗ＰＲＯ９２２４０抗体の翻訳後プロセス又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの翻訳後プロセスを変え得るのを理解するであろう。

ここに記載した抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第５３６４９３４号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる、抗体又はポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であるとすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては１から５のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

【０１１２】

抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチド断片がここで提供されている。そのような断片は、例えば完全長天然抗体又はタンパク質と比較した時に、Ｎ末端又はＣ末端で切断しているか、又は内部残基を欠いている可能性がある。ある断片は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの所望される生物学的活性にとって必修ではないアミノ酸残基を欠く。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチド断片は、多くの従来技術のいずれかによって調製してもよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法には、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基で確定した部位でタンパク質を切断することが知られた酵素によってタンパク質を処理することで、又は適当な制限酵素でＤＮＡを消化して所望の断片を単離することによって抗体又はポリペプチド断片を生成すること

が含まれる。さらにその他の好適な技術には、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって、所望の抗体又はポリペプチド断片をコードするＤＮＡ断片を単離し増幅することが含まれる。ＤＮＡ断片の所望の末端を確定するオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲの５’及び３’プライマーで用いられる。好ましくは、抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチド断片は、ここに開示した天然抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと少なくとも１つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

【０１１３】

特定の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目で表６に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表６に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【０１１４】

**表６**

| 元の残基 | 例示的置換 | 好ましい置換 |
|---|---|---|
| Ala (A) | val; leu; ile | val |
| Arg (R) | lys; gln; asn | lys |
| Asn (N) | gln; his; lys; arg | gln |
| Asp (D) | glu | glu |
| Cys (C) | ser | ser |
| Gln (Q) | asn | asn |
| Glu (E) | asp | asp |
| Gly (G) | pro; ala | ala |
| His (H) | asn; gln; lys; arg | arg |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン | leu |
| Leu (L) | ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe | ile |
| Lys (K) | arg; gln; asn | arg |
| Met (M) | leu; phe; ile | leu |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr | leu |
| Pro (P) | ala | ala |
| Ser (S) | thr | thr |
| Thr (T) | ser | ser |
| Trp (W) | tyr; phe | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser | phe |
| Val (V) | ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン | leu |

【０１１５】

抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、（ａ）置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、（ｂ）標的部位の電荷又は分子疎水性、又は（ｃ）側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

（１）疎水性：ノルロイシン，met，ala，val，leu，ile;

（２）中性の親水性：cys，ser，thr;

（３）酸性：asp，glu;

（４）塩基性：asn，gln，his，lys，arg;

（５）鎖配向に影響する残基：gly，pro；及び

（６）芳香族：trp，tyr，phe。

非保存的置換は、これらの分類の１つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、又はより好ましくは、残された（非保存）部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニン

グ、及びＰＣＲ突然変異誘発等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発［Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)］、カセット突然変異誘発［Wells等, Gene, 34: 315 (1985)］、制限的選択突然変異誘発［Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)］又は他の知られた技術をクローニングしたＤＮＡに実施して、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド変異体ＤＮＡを作成することもできる。

【０１１６】

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である［Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)］。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い［Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)］。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの適切なコンフォメーションを維持することに関与していない任意のシステイン残基も、分子の酸化的安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐために、概してセリンと置換され得る。逆に、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの安定性（特に、抗体がＦｖ断片のような抗体断片）を向上させるために、それにシステイン結合（複数でも）を加えてもよい。

【０１１７】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、更なる開発のために得られた変異体は、それらが生成された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法には、ファージディスプレイを使用する親和性成熟がふくまれる。簡潔に言えば、高頻度可変領域部位（例えば、６－７部位）を変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物への融合物として一価形態で表示される。ファージ表示変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。改変の候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトＰＲＯ９２２４０ポリペプチドとの接点を同定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここで詳しく記述した技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができる。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野で周知の種々の方法によって調製される。これらの方法には、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、ＰＣＲ突然変異誘発、そして抗-ＰＲＯ９２２４０抗体の早期に調製した変異体又は非変異体形のカセット突然変異誘発による、天然ソースからの単離（天然発生アミノ酸配列変異体の場合）又は調製が含まれる。

【０１１８】

Ｈ．抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの修飾

抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの共有結合的修飾は本発明

の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型には、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの選択された側鎖又はＮ又はＣ末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えば抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを、抗ＰＲＯ９２２４０抗体の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用であり、その逆も同じである。通常用いられる架橋剤には、例えば、１,１-ビス（ジアゾアセチル）-２-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば４-アジドサリチル酸を有するエステル、３,３'-ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-Ｎ-マレイミド-１,８-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-３-[(ｐ-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

他の修飾には、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、Ｎ末端アミンのアセチル化、及び任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【０１１９】

本発明の範囲内に含まれる抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。ここで意図される「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分を欠失させること（内在するグリコシル化部位を取り除くことによって、又は化学及び／又は酵素的手法でグリコシル化を欠失させることのいずれか）、及び／又は天然配列抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。更には、この語句には、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的な変化が含まれる。

抗体及び他のポリペプチドのグリコシル化とは、典型的にはＮ-結合又はＯ-結合のいずれかである。Ｎ-結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付与を指す。トリペプチドは、Ｘがプロリンを除く任意のアミノ酸である、アスパラギン-Ｘ-セリン及びアスパラギン-Ｘ-スレオニンの配列であり、アスパラギン側鎖への炭水化物部分が酵素的に付与される認識部位である。従って、ポリペプチドのこれらトリペプチド配列のいずれかの存在によって、潜在的なグリコシル化部位が作り出される。Ｏ-結合グリコシル化とは、５-ヒドロキシプロリン又は５-ヒドロキシリジンも用いられるが、殆どの場合にはセリン又はスレオニンへＮ-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの一つの糖をヒドロキシアミノ酸へ付与することを指す。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変して、それが上記に記載のトリペプチド配列（Ｎ-結合グリコシル化部位について）の一つ又は複数を含むようにすることによって簡便に完遂できる。この改変は、また、最初の抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの配列へ一つ又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される（Ｏ-結合グリコシル化部位について）。抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアミノ酸配列は、ＤＮＡレベルでの変化を通して、特に、コドンが所望するアミノ酸へ翻訳される、あらかじめ選択した塩基での抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするＤＮＡを変異させることによって、場合によっては改変され得る。

【０１２０】

抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増

加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。そのような方法は、この技術分野において、例えば、１９８７年９月１１日に発行された国際公開８７／０５３３０、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)によって、そしてEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの１つ、例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第４６４０８３５号；第４４９６６８９号；第４３０１１４４号；第４６７０４１７号；第４７９１１９２号又は第４１７９３３７号に記載された方法で結合させることをを含む。また、抗体又はポリペプチドは、例えばコアセルベーション法によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル）に、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルションで捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, １６版, A. Oslo編(1980)に開示されている。

また、本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、その他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合した抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを含むキメラ分子が形成される方法で修飾されてもよい。

【０１２１】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このような抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によって抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ－ヒスチジン（ポリ-His）又はポリ－ヒスチジン－グリシン（poly-his-gly）タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５［Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)］；c-mycタグ及びそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７及び９Ｅ１０抗体［Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)］；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（gD）タグ及びその抗体［Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)］を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド［Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)］；ＫＴ３エピトープペプチド［Martin等, Science, 255:192-194 (1992)］；α-チューブリンエピトープペプチド［Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)］；及びＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)］を含む。

それに換わる実施態様では、キメラ分子は抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよ

い。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はＩｇＧ分子のＦｃ領域であり得る。Ｉｇ融合体は、好ましくはＩｇ分子内の少なくとも１つの可変領域に換えて抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、ＩｇＧ分子のヒンジ、$CH_2$及び$CH_3$、又はヒンジ、$CH_1$、$CH_2$及び$CH_3$領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、１９９５年６月２７日発行の米国特許第５４２８１３０号を参照のこと。

【０１２２】

Ｉ．抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することにより抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを産生させる方法に関する。勿論、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを調製することができると考えられている。例えば、適切なアミノ酸配列、又はその一部分を、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生成してもよい［例えば、Stewart等，Solid-Phase Peptide Synthesis，W.H. Freeman Co.，サンフランシスコ，カリフォルニア(1969)；Merrifield，J. Am. Chem. Soc.，85:2149-2154(1963)参照］。手動技術又は自動を使用することによってインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機（フォスター　シティー，カリフォルニア）を用いて、製造者の指示によって実施してもよい。抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて所望する抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを生成させてもよい。

【０１２３】

１．抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするＤＮＡの単離

抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするＤＮＡは、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドｍＲＮＡを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから得ることができる。従って、ヒト抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドＤＮＡは、ヒトの組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから簡便に得ることができる。また抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又は公知の合成方法（例えば、自動核酸合成）により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(少なくとも約２０-８０塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるｃＤＮＡ又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えばSambrook等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法は、ＰＣＲ法を使用するものである［Sambrook等，上掲；Dieffenbach等，PCR Primer：A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press，1995)］。

【０１２４】

ｃＤＮＡライブラリをスクリーニングするための技術は、当該分野で良く知られている。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、疑陽性が最小化されるよう十分な長さであり、十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内のＤＮＡとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、$^{32}$Ｐ標識ＡＴＰのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のス

トリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrookら，に示されている。

このようなライブラリスクリーニング法において同定された配列は、GenBankらの公共データベース又は他の個人の配列データベースに寄託され利用可能となっている他の周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内の又は完全長配列に渡っての（アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの）配列同一性は、当該分野で知られた、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、ｃＤＮＡに逆転写されていないｍＲＮＡの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用して、選択されたｃＤＮＡ又はゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得られる。

【０１２５】

２．宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載した抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド生成のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、ｐＨ等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M.Butler編 (IRL Press, 1991)及び上掲のSambrook等に見出すことができる。

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等，Gene，23:315(1983)及び１９８９年６月２９日公開の国際公開８９／０５８５９に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb，Virology，52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第４，３９９，２１６号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等，J. Bact.，130:946 (1977)及びHsiao等，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)，76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、ＤＮＡを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等，Methods in Enzymology，185:527-537 (1990)及び Mansour等，Nature，336:348-352 (1988)を参照のこと。

【０１２６】

ここに記載のベクターにＤＮＡをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌Ｋ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ３１４４６）；大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ３１５３７）；大腸菌株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ２７３２５）及びＫ５７７２（ＡＴＣＣ５３６３５）である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌（E. coli）、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌(Salmonella Typhimurium)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スブ

チルス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(B. licheniformis)（例えば、１９８９年４月１２日発行のＤＤ２６６７１０に記載されたバチルス・リチェニフォルミス４１Ｐ）、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株Ｗ３１１０は、組換えＤＮＡ生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株Ｗ３１１０を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型ｔｏｎＡを有する大腸菌Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３を有する大腸菌Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３　ｐｈｏＡ　Ｅ１５　（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９　ｄｅｇＰ　ｏｍｐＴ　ｋａｎ[r]を有する大腸菌Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ　５５，２４４）；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３　ｐｈｏＡ　Ｅ１５　（ａｒｇＦ-ｌａｃ)１６９　ｄｅｇＰ　ｏｍｐＴ　ｒｂｓ７　ｉｌｖＧ　ｋａｎ[r]を有する大腸菌Ｗ３１１０株３７Ｄ６；非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を持つ３７Ｄ６株である大腸菌Ｗ３１１０株４０Ｂ４；及び１９９０年８月７日発行の米国特許第４９４６７８３号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばＰＣＲ又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【０１２７】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、治療用の抗体が細胞傷害剤（例えば、毒素）と結合し、その免疫コンジュゲートそのものが腫瘍細胞の破壊において有効性を示す場合など、特にグリコシル化及びＦｃエフェクター機能が必要ない場合に、細菌で産生させることができる。完全長抗体は、血液循環でより長い半減期を有する。大腸菌での産生が、より迅速でより費用効率的である。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第５６４８２３７号（Carter等）、米国特許第５７８９１９９号（Joly等）、及び翻訳開始部位（ＴＩＲ）及び発現と分泌を最適化するシグナル配列を記載している米国特許第５８４０５２３号（Simmons等）を参照のこと。これら特許は、ここに参考文献として取り入れられている。発現の後、抗体は、大腸菌細胞ペーストから可溶性分画へ分離し、例えば、アイソタイプによってプロテインＡ又はＧカラムを介して精製することができる。最終精製は、例えば、ＣＨＯ細胞で発現させた抗体を精製するための工程と同じようにして行うことができる。

【０１２８】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)（Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; １９８５年５月２日公開の欧州特許第１３９３８３号）；クリュイベロミセス宿主(Kluyveromyces hosts)（米国特許第４９４３５２９号; Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)）、例えばクリュイベロミセスラクチス(K. lactis)（MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol., 154(2): 737-742 [1983]）、クリュイベロミセス・フラギリス(K. fragilis)（ＡＴＣＣ１２４２４）、クリュイベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus)（ＡＴＣＣ１６０４５）、クリュイベロミセス・ウィケラミイ(K. wickeramii)（ＡＴＣＣ２４１７８）、クリュイベロミセス・ワルチイ(K. waltii)（ＡＴＣＣ５６５００）、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilarum)（ＡＴＣＣ３６９０６； Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990)）、クリュイベロミセス・テモトレランス(K. thermotolerans)及びクリュイベロミセス・マルキシアナス(K. marxianus)；ヤロウィア(yarrowia)（欧州特許第４０２２２６号）；ピシア・パストリス(Pichia pastoris)（欧州特許第１８３０７０号； Sreekrishna等, J. Basic Microbiol, 28: 265-278 [1988]）；カンジダ；トリコデルマ・レーシア(Trichoderma reesia)（欧州特許第２４４２３４号）；アカパンカビ（Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]）；シュワニオマイセス(Schwanniomyce

s)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(Schwanniomyces occidentalis)（１９９０年１０月３１日公開の欧州特許第３９４５３８号）；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(Tolypocladium)（１９９１年１月１０日公開の国際公開９１／００３５７）；及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス（Ballance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]）及びアスペルギルス・ニガー（Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]）が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(Ｃ１化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピシア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

【０１２９】

グリコシル化抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から由来のものである。非脊椎動物細胞の例には、植物細胞、例えば綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト及びタバコの細胞培養と同様に、ショウジョウバエＳ２及びヨトウ(spodoptera)Ｓｆ９等の昆虫細胞が含まれる。多くのバキュロウイルス株及び変異体、及びヨトウガ(Spodoptera frugiperda)(幼虫(caterpillar))、ネッタイシマカ(蚊)、ヒトスジシマカ(蚊)、キイロショウジョウバエ(ショウジョウバエ)、及びカイコ等の宿主に対応する許容性昆虫宿主細胞が同定されている。種々のトランスフェクション用のウィルス株、例えばオートグラファ・カルフォルニカ(Autographa californica)ＮＰＶのＬ－１変異株、カイコＮＰＶのＢｍ-５株が公に入手でき、このようなウィルスは、本発明に係るウィルスとして、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用してもよい。

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養(組織培養)した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、ＳＶ４０(ＣＯＳ－７，ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５１)で形質転換させたサル腎ＣＶ１細胞株；ヒト胚芽腎細胞株(２９３又は懸濁培養で成長するようにサブクローン化された２９３細胞, Graham等,J.Gen Virol.,36:59 (1977))；ベビーハムスター腎細胞(ＢＨＫ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ１０)；チヤイニーズハムスター卵巣細胞／-ＤＨＦＲ(ＣＨＯ，Urlaub等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77: 4216 (1980));マウスセルトリ細胞(ＴＭ４，Mather,Biol.Reprod.,23：243-251 (1980))；サル腎細胞(ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ７０)；アフリカミドリザル腎細胞(ＶＥＲＯ－７６，ＡＴＣＣ ＣＲＬ-１５８７)；ヒト頚管腫瘍細胞(ＨＥＬＡ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ２)；イヌ腎細胞(ＭＤＣＫ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ３４)；バッファローラット肝細胞(ＢＲＬ ３Ａ，ＡＴＣＣ ＣＲＬ１４４２)；ヒト肺細胞(Ｗ１３８，ＡＴＣＣ ＣＣＬ７５)；ヒト肝細胞(Ｈｅｐ Ｇ２，ＨＢ ８０６５)；マウス乳房腫瘍細胞(ＭＭＴ ０６０５６２，ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１)；ＴＲＩ細胞(Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68 (1982))；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；及びヒト肝臓癌細胞（ＨｅｐＧ２）である。

宿主細胞は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド生成のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘発し、形質転換体を選出し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修正した通常の栄養培地で培養される。

【０１３０】

３．複製可能なベクターの選択及び使用

抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする核酸(例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ)は、クローニング(ＤＮＡの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、ＤＮＡはこの分

野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

ＰＲＯ９２２４０は直接的に組換え手法によって生成されるだけではなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのＮ-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入される抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド-コード化ＤＮＡの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクリュイベロミセス(Kluyveromyces)α因子リーダーを含み、後者は米国特許第５，０１０，１８２号に記載されている)、又は酸ホスフォターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(１９９０年４月４日発行の欧州特許第３６２１７９号)、又は１９９０年１１月１５日に公開された国際公開９０／１３６４６に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【０１３１】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスについてよく知られている。プラスミドｐＢＲ３２２に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、２μプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶ又はＢＰＶ)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしており、例えばバシリのＤ-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、ＤＨＦＲあるいはチミジンキナーゼのように、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型ＤＨＦＲを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたＤＨＦＲ活性に欠陥のあるＣＨＯ株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドＹＲｐ７に存在するｔｒｐ１遺伝子である［Stinchcomb等，Nature，282：39(1979)；Kingsman等，Gene，7：141(1979)；Tschemper等，Gene，10：157(1980)］。ｔｒｐ１遺伝子は、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６あるいはＰＥＰ４-１のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する［Jones，Genetics，85:12 (1977)］。

【０１３２】

発現及びクローニングベクターは、通常、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド-コード化核酸配列に作用可能に結合し、ｍＲＮＡ合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の有能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主との使用に適したプロモーターはβ-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系［Chang等，Nature，275:615 (1978)； Goeddel等，Nature，281:544 (1979)］、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系［Goeddel，Nucleic Ac

ids Res., 8:4057 (1980); 欧州特許第３６，７７６号］、及びハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃプロモーター［deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)］を含む。細菌系で使用するプロモーターもまた抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするＤＮＡと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

酵母宿主との使用に適したプロモーター配列の例としては、３-ホスホグリセラートキナーゼ［Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)］又は他の糖分解酵素［Hess等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)；Holland, Biochemistry, 17：4900(1978)］、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-６-リン酸イソメラーゼ、３-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソチトクロムＣ、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第７３６５７号に更に記載されている。

【０１３３】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(１９８９年７月５日公開の英国特許第２２１１５０４号)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス２)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、Ｂ型肝炎ウィルス及びサルウィルス４０(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約１０から３００塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するＤＮＡのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のＳＶ４０エンハンサー(１００－２７０塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドコード化配列の５’又は３’位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから５’位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのＤＮＡ又はｃＤＮＡの通常は５’、時には３’の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養での抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第１１７０６０号；及び欧州特許第１１７０５８号に記載されている。

【０１３４】

４．宿主細胞の培養

本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のＦ１０(シグマ)、最小必須培地((MEM),シグマ)、ＲＰＭＩ-１６４０(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM),シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第４７６７７０４号；同４６５７８６６号；同４９２７７６２号；同４５６０６５５号；又は同５１２２４６９号；国際公開第９０／０３４３０号；国際公開第８７／００１９５号；又は米国特許再発行第３０９８５号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培養培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び／又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばＨＥＰＥＳ)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン（商品名）薬)、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、ｐＨ等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【０１３５】

５．遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量化するノーザンブロット法［Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77:5201-5205 (1980)］、ドットブロット法(ＤＮＡ分析)、又はインサイツハイブリダイゼーションによって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖、及びＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド二本鎖又はＤＮＡ-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。ついで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果、表面での二本鎖の形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量化する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに対して、又はここで提供されるＤＮＡ配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はＰＲＯ９２２４０ ＤＮＡに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【０１３６】

６．抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの精製

抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-Ｘ１００)を用いて又は酵素的切断により膜から引き離すことができる。抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばＤＥＡＥによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ-ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスＧ-７５を用いるゲル濾過；ＩｇＧのような汚染物を除くプロテインＡセファロースカラム；及び抗Ｐ

ＲＯ９２２４０抗体及びＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定の抗ＰＲＯ９２２４０抗体又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの性質に依存する。

【０１３７】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第１工程として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(ｐＨ３．５)、ＥＤＴＡ、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(ＰＭＳＦ)の存在下で、３０分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。ＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインＡの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンＦｃ領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２、又はγ４重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる（Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 [1983]）。プロテインＧは、全てのマウスアイソタイプ及びヒトγ３に推奨されている（Guss等, EMBO J. 5: 15671575 [1986]）。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体が$C_H$３ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂（J.T. Baker, Phillipsburg, NJ）が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラム）上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

任意の予備精製工程に続いて、対象とする抗体と汚染物とを含む混合物に、約２．５－４．５のｐＨでの溶離バッファーを用いて、低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、好ましくは低い塩濃度（例えば、約０-０．２５Ｍ塩）で実施される。

【０１３８】

Ｊ．製薬製剤

本発明に係る抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド、ＰＲＯ９２２４０結合有機分子及び／又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの治療的製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体、ポリペプチド、オリゴペプチド又は有機分子を凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th 版, Osol, A. 編. [1980]）。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、酢酸、Ｔｒｉｓ、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シク

ロヘキサノール；３-ペンタノール；及びｍ-クレゾールなど）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；トレハロース及び塩化ナトリウムなどのトニシファイヤー；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ポリソルベート等の界面活性剤；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ-タンパク質錯体）；及び／又はトゥイーン(TWEEN)（登録商標）、プルロニクス(PLURONICS)（登録商標）、又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは５－２００ｍｇ／ｍｌの間、好ましくは１０－１００ｍｇ／ｍｌの間の濃度の抗体で構成される。

【０１３９】

ここでの製剤は、また、治療すべき特定の徴候の必要に応じて一以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。例えば、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子に加えて、１つの製剤に、例えば、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド上の異なるエピトープと結合する第二抗ＰＲＯ９２２４０抗体、又は特定の癌の成長に影響を与える成長因子のような何らかの他の標的に対する抗体を含めることは望ましい。あるいは、又はさらに、この組成物は、更に化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗-ホルモン剤、及び／又は心臓保護剤を含んでもよい。このような分子は、意図する目的にとって有効な量の組み合わせで適切に存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(２-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリアクチド（米国特許第３７７３９１９号）、Ｌ-グルタミン酸及びγエチル-Ｌ-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(登録商標)（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(Ｄ)-（-）-３-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【０１４０】

Ｋ．抗ＰＲＯ９２２４０抗体、ＰＲＯ９２２４０結合オリゴペプチド又はＰＲＯ９２２４０結合有機分子を用いる診断及び治療

癌におけるＰＲＯ９２２４０発現を定量するために、種々の診断アッセイが利用可能である。一実施態様では、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド過剰発現は、免疫組織化学（ＩＨＣ）によって分析される。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をＩＨＣアッセイへ供してもよいし、次のようなＰＲＯ９２２４０タンパク質染色強度基準と合致させてもよい：

スコア０ - 染色が観察されないか、又は膜染色が腫瘍細胞の１０％未満で観察される。

スコア１＋ - わずかに／弱く認知できる程度の膜染色が腫瘍細胞の１０％を越えて検出される。細胞はそれらの膜の一部のみが染色される。

スコア２＋ - 弱いないしは中程度の完全な膜染色が腫瘍細胞の１０％を越えて観察される。

スコア３＋ - 中程度から強い完全な膜染色が腫瘍細胞の１０％を越えて観察される。

ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド発現に関して０又は１＋スコアの腫瘍は、ＰＲＯ９２２４０が過剰発現していないことを特徴としうるものであるのに対し、２＋又は３＋スコアの腫瘍はＰＲＯ９２２４０が過剰発現していることを特徴としうる。

【０１４１】

別に、又は付加的に、ＦＩＳＨアッセイ、例えばＩＮＦＯＲＭ（登録商標）(Ventana, Arizonaから販売)又はＰＡＴＨＶＩＳＩＯＮ（登録商標）(Vysis, Illinois)を、ホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織で実施して、腫瘍におけるＰＲＯ９２２４０過剰発現の程度(生じているならば)を測定してもよい。

ＰＲＯ９２２４０過剰発現又は増幅は、インビボ診断アッセイを使用して評価することができ、例えば検出される分子に結合し、検出可能な標識(例えば、放射性同位体又は蛍光標識)が付けられた分子(例えば抗体、オリゴペプチド又は有機分子)を投与し、標識の局在化について患者を外部スキャニングする。

上に記載したように、本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現している癌の診断及び染色にとって有用である（例えば、ラジオイメージングで）。他の細胞の精製の工程として、混合細胞の集団からＰＲＯ９２２４０発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、また、例えば、ＥＬＩＳＡ又はウェスタンブロットにおいて、インビトロでＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【０１４２】

現在、癌の段階に応じて、癌の治療には、次の治療：外科手術による癌組織の除去、放射線治療、及び化学治療の一つ、又はそれらを組合せたものが含まれる。抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用性に限界がある転移性疾患において所望されている。本発明の腫瘍標的化抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、疾患の初期診断時及び再発中におけるＰＲＯ９２２４０-発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、又は放射標識された化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び／又は放射線治療と組み合わせてもよく、使用してもよい。抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、従来的治療の前又は後のいすれかに連続させて、他の形態の従来的治療と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ(登録商標)(ドセタキセル)、タキソール(登録商標)(パクリタキセル)、エストラムスチン及びミトキサントロンは、癌、特に危険性の少ない患者の癌治療に使用される。癌を治療又は緩和するための本発明の方法において、上述した一又は複数の化学療法剤による治療と組合せて、癌患者に抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子を投与することができる。特に、パクリタキセル及び改変誘導体との組合せ治療が考えられる(例えば、欧州特許第０６００５１７号を参照のこと)。抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施態様では、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子は化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書(ＰＤＲ)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

【０１４３】

特定の一実施態様では、細胞障害性剤に結合した抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプ

チド又は有機分子を含有する毒素コンジュゲートを患者に投与する。好ましくは、ＰＲＯ９２２４０タンパク質に結合した免疫コンジュゲートは細胞によりインターナリゼーションし、結果として、それが結合した癌細胞の殺傷性における免疫コンジュゲートの治療的効果が向上する。好ましい実施態様では、細胞障害性剤は、癌細胞内の核酸を標的とするか、又はこれに干渉する。このような細胞障害性剤の例は、上述されており、メイタンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼ及びＤＮＡエンドヌクレアーゼを含む。

抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子又はその免疫コンジュゲートは、公知の方法、例えばボーラス、もしくは一定時間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、くも膜下腔内、経口、局所的、又は吸入経路により、ヒトの患者に投与される。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の静脈内又は皮下投与が好ましい。

他の治療計画を抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子の投与と組合せてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の医薬製剤を使用する同時投与、及び好ましくは両方(又は全ての)活性剤が同時にその生物学的活性を働かせる時間があるいずれかの順での連続投与が含まれる。このような組合せ治療により、結果として相乗的治療効果が生じることが好ましい。

【０１４４】

また、特定の癌に関連した他の腫瘍抗原に対する抗体の投与と共に、抗ＰＲＯ９２２４０抗体又は抗体類、オリゴペプチド又は有機分子の投与を組合せることが望ましい。

他の実施態様では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗ＰＲＯ９２２４０抗体(又は抗体類)、オリゴペプチド又は有機分子と一又は複数の化学療法剤又は成長阻害剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、プレドニムスチン、シスプラチン、５-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素及びヒドロキシ尿素タキサン類(hydroxyureataxanes)(例えばパクリタキセル及びドキセタキセル)及び／又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)にも記載されている。

抗体、オリゴペプチド有機分子は、抗ホルモン化合物；例えばタモキシフェン等の抗-エストロゲン化合物；抗-プロゲステロン、例えばオナプリストン(onapristone)(欧州特許第６１６８１２号を参照)；又は抗アンドロゲン、例えばフルタミドを、このような分子に対して既知の用量で組合せてもよい。治療される癌がアンドロゲン非依存性癌である場合、患者は予め抗アンドロゲン治療を受け、癌がアンドロゲン非依存性になった後、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子(及び場合によってはここに記載した他の薬剤)を患者に投与してもよい。

【０１４５】

しばしば、心臓保護剤(治療に関連する心筋の機能不全を防止又は低減するため)又は一又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも有益なことである。上述した治療摂生に加えて、抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療の前、同時又は治療後に、外科的に癌細胞を取り除くか、及び／又は放射線治療を施してもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な用量は現在使用されている量であり、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子と薬剤の組合せ作用(相乗作用)に応じてより少なくしてもよい。

疾患の予防又は治療のための投与量及び方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の適切な用量は、上記のような治療される疾患の種類、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は有機分子を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体、オリゴペプチド又は有機分子の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。好ましくは、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は静脈注入又は皮下注射により投与される

。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、体重１ｋｇ当たり約１μｇないし５０ｍｇ(例えば０．１－１５ｍｇ／ｋｇ／用量)の抗体を患者への最初の投与量の候補とすることができる。投薬計画は、約４ｍｇ／ｋｇの初期負荷量、続いて１週間に約２ｍｇ／ｋｇの維持用量の抗ＰＲＯ９２２４０抗体を投与することからなってよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。この治療の進行状態は、医師又は他の当業者に公知の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

【０１４６】

抗体タンパク質の患者への投与の他に、本出願は遺伝子治療による抗体の投与を考察する。抗体をコードする核酸の投与は「抗体を治療的有効量で投与する」という表現に含まれる。例えば、遺伝子治療を用いた細胞内抗体の産生に関する、１９９６年3月１４日に公開された国際公開第９６／０７３２１号を参照のこと。

核酸（場合によってはベクター内に含まれたもの）を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという２つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常は抗体が必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する（米国特許第４８９２５３８号及び第５２８３１８７号参照）。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかによって異なる。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、ＤＥＡＥ-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

【０１４７】

現在好まれているインビボ核酸移入技術は、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスＩウイルス、又はアデノ関連ウイルス）、及び脂質ベースの系（例えば、遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、及びＤＣ-Ｃｈｏｌである）での形質移入を含む。現在知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコールの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、国際公開第９３／２５６７３号及びそこに引用された参考文献も参照。

本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体は、ここでの「抗体」の定義により包含される様々な形態であってよい。よって、抗体には、完全長又は無傷抗体、抗体断片、天然配列抗体又はアミノ酸変異体、ヒト化、キメラ又は融合抗体、免疫コンジュゲート、及びそれらの機能的断片が含まれる。融合抗体において、抗体配列は異種ポリペプチド配列に融合している。抗体はＦｃ領域が修飾されて、所望のエフェクター機能を提供することができる。以下の段落に詳細に記載されるように、適切なＦｃ領域と共に、細胞表面に結合したそのままの抗体は、例えば抗体-依存性細胞障害(ＡＤＣＣ)を介して又は補体依存性細胞障害において補体を補充することにより、又は他のいくつかのメカニズムにより、細胞障害性を誘発し得る。また、副作用及び治療による合併症を最小にするようにエフェクター機能を除去又は低減することが望ましい場合には、所定の他のＦｃ領域が使用される。

一実施態様では、抗体は、本発明の抗体と同じエピトープとの結合に関して競合するか、又はこれに実質的に結合する。また、本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体の生物学的特徴を有する抗体、特にインビボ腫瘍ターゲティング及び任意の細胞増殖阻害又は細胞障害特性を含むものが考察される。

上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。

【０１４８】

本抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物におけるＰＲＯ

９２２４０-発現癌の治療又は一又は複数の癌の徴候の緩和に有用である。このような癌は、前立腺癌、尿道癌、肺癌、乳癌、結腸癌及び卵巣癌、特に前立腺癌腫(prosＰＲＯ９２２４０e adenocarcinoma)、腎細胞癌腫、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺細胞の扁平癌腫、及び胸膜中皮腫を含むが、これらに限定されない。癌には、上述した任意の転移性癌が含まれる。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物においてＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。好ましい実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、インビボ又はインビトロで細胞のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに結合して、ＰＲＯ９２２４０-発現腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の成長を阻害するのに効果的である。このような抗体には、裸の抗ＰＲＯ９２２４０抗体(いかなる薬剤にも結合していない)が含まれる。細胞傷害性又は細胞成長阻害特性を有する裸の抗体は、細胞障害性剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞障害性剤と抗体とを結合させ、以下に記載するような免疫コンジュゲートを形成させることによって、細胞障害特性を抗ＰＲＯ９２２４０抗体に付与することができる。この細胞障害性剤又は成長阻害剤は、好ましくは小分子である。毒素、例えばカリケアマイシン又はメイタンシノイド、及びそれらの類似物又は誘導体が好ましい。

【０１４９】

本発明は、本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子と担体を含有する組成物を提供する。癌の治療のために、組成物はその治療の必要性に応じて患者に投与することができ、ここで組成物は免疫コンジュゲート又は裸の抗体として存在する一又は複数の抗ＰＲＯ９２２４０抗体を含有し得る。さらなる実施態様においては、組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を含む成長阻害剤又は細胞障害性剤とこれらの抗体、オリゴペプチド又は有機分子を組合せて含有することもできる。また本発明は、本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子と担体を含有する製剤も提供する。一実施態様では、製剤は製薬的に許容可能な担体を含有する治療用製剤である。

本発明の他の態様は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体をコードする単離された核酸分子である。Ｈ及びＬ鎖、特に高頻度可変領域残基をコードする核酸、天然配列抗体及び変異体をコードする鎖、該抗体の修飾体及びヒト化形態を含む。

本発明は、抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子を治療的有効量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるＰＲＯ９２２４０ポリペプチド-発現癌の治療又は癌の一又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間(急性)又は慢性的に、又は間欠的に投与することができる。また、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド-発現細胞の成長を阻害し、該細胞を殺傷する方法も提供される。

本発明は少なくとも一つの抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキット又は製造品も提供する。抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットは、例えばＰＲＯ９２２４０細胞殺傷アッセイ、細胞からのＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、ＰＲＯ９２２４０の単離及び精製のためには、キットはビーズ(例えばセファロースビース)に結合した抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有することができる。インビトロにおけるＰＲＯ９２２４０の検出及び定量化、例えばＥＬＩＳＡ又はウエスタンブロットにおける抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットを提供することもできる。検出に有用なこのような抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、蛍光又は放射標識などの標識が付されて提供され得る。

【０１５０】

Ｌ．製造品及びキット

本発明の他の実施態様は、抗ＰＲＯ９２２４０発現癌の治療に有用な物質を含有する製造品である。この製造品は容器と容器に付与又は添付されるラベル又はパッケージ挿入物を含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの多様な材料から形成されてよい。容器は、癌の状態の治療に

有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌の治療のために使用されることを示す。ラベル又はパッケージ挿入物は、癌患者に抗体、オリゴペプチド又は有機分子組成物を投与する際の注意書きをさらに含む。製造品はさらに、製薬的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水(ＢＷＦＩ)、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第２の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【０１５１】

種々の目的、例えばＰＲＯ９２２４０発現細胞殺傷アッセイ、細胞からのＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの精製又は免疫沈降に有用なキットも提供される。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの単離及び精製において、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むことが可能である。インビトロにおけるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの検出及び定量化、例えばＥＬＩＳＡ又はウエスタンブロットのための抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むキットを提供することもできる。製造品と同様、キットも容器と容器に付与又は添付されるラベル又は能書を含んでなる。容器には少なくとも１つの本発明の抗ＰＲＯ９２２４０抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有する組成物が収容されている。希釈液及びバッファー、コントロール抗体等を収容する付加的な容器を具備していてもよい。ラベル又は能書は、組成物についての記載、並びに意図するインビトロ又は診断での使用に関する注意書きを提供するものである。

【０１５２】

Ｍ．ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド及びＰＲＯ９２２４０-ポリペプチドコード核酸の用途

ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする核酸配列（又はそれらの相補鎖）は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスＲＮＡ及びＤＮＡプローブの生成において種々の用途を有している。また、ＰＲＯ９２２４０コード化核酸は、ここに記載される組換え技術によるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの調製に有用であり、これらＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、例えば、ここで記載の抗ＰＲＯ９２２４０抗体の調製において用途を見出し得る。

完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０遺伝子又はその一部は、完全長ＰＲＯ９２２４０ｃＤＮＡの単離又はここに開示した天然ＰＲＯ９２２４０配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他のｃＤＮＡ（例えば、ＰＲＯ９２２４０の天然発生変異体又は他の種からのＰＲＯ９２２４０をコードするもの）の単離のために、ｃＤＮＡライブラリ用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約２０～約５０塩基である。このハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に完全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列ＰＲＯ９２２４０のプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から判定され得る。例えば、スクリーニング法は、ＰＲＯ９２２４０遺伝子のコード化領域を周知のＤＮＡ配列を用いて単離して約４０塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、$^{32}$Ｐ又は$^{35}$Ｓ等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン／ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識され得る。本発明のＰＲＯ９２２４０遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒトｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ又はｍＲＮＡのライブラリをスクリーニングし、そのライブラリの何れのメンバーにプローブがハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術を、以下の実施例において更に詳細に記載する。本出願に開示されている任意のＥＳ

Ｔ配列は、ここに開示している方法を利用して、同じようにプローブとして用い得る。

【０１５３】

ＰＲＯ９２２４０コード核酸の他の有用な断片には、標的ＰＲＯ９２２４０ ｍＲＮＡ（センス）又はＰＲＯ９２２４０ ＤＮＡ（アンチセンス）配列と結合できる一本鎖核酸配列（ＲＮＡ又はＤＮＡのいずれか）を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明によると、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、ＰＲＯ９２２４０ ＤＮＡのコード化領域の断片を含む。そのような断片は、一般的には少なくとも約１４ヌクレオチド、好ましくは約１４から３０ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするｃＤＮＡ配列に基づいて、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein及びCohen（Cancer Res. 48:2659, 1988）及び van der Krol等（BioTechniques 6:958, 1988）に記載されている。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらし、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本発明に含まれている。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＰＲＯ９２２４０タンパク質の発現を阻止するのに用いられ、それらＰＲＯ９２２４０タンパク質は、哺乳動物での癌の誘導を担い得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖－ホスホジエステル骨格（又は他の糖結合、国際公開９１／０６６２９に記載のもの等）を有するオリゴヌクレオチドを更に含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが（つまり、酵素分解に耐えうるが）、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

【０１５４】

アンチセンス結合の好適な遺伝子内部位には、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の翻訳開始／開始コドン（５'-ＡＵＧ／５'-ＡＴＧ）又は終結／停止コドン（５'-ＵＡＡ、５'-ＵＡＧ及び５-ＵＧＡ／５'-ＴＡＡ、５'-ＴＡＧ及び５'-ＴＧＡ）を含む領域が含まれる。これらの領域は翻訳開始又は終結コドンから何れかの方向（つまり５'又は３'）に約２５から約５０の近接ヌクレオチドを包含するｍＲＮＡ又は遺伝子の一部を意味する。アンチセンス結合のための他の好適な領域には、イントロン；エキソン；イントロン-エキソン接合部；翻訳開始コドンと翻訳終結コドンの間の領域であるオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）又は「コード領域」；５'-５'トリホスフェート結合を介してｍＲＮＡの５'－最末端残基に結合したＮ７-メチル化グアノシン残基を含み、５'キャップ構造自体と同様にキャップに隣接する最初の５０ヌクレオチドを含むｍＲＮＡの５'キャップ；翻訳開始コドンから５'方向のｍＲＮＡの部分で、ｍＲＮＡ又は遺伝子上の対応するヌクレオチドの翻訳開始コドンと５'キャップ部位の間のヌクレオチドを含む５'の未翻訳領域（５'ＵＴＲ）；及び翻訳終結コドンから３'方向のｍＲＮＡの部分で、ｍＲＮＡ又は遺伝子上の対応するヌクレオチドの３'末端と翻訳停止コドンの間のヌクレオチドを含む、３'未翻訳領域（３'ＵＴＲ）が含まれる。

ＰＲＯ９２２４０タンパク質の発現を阻害するのに有用な好適なアンチセンス化合物の特定の例には、修飾骨格又は非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドには骨格にリン原子を保持しているものと骨格にリン原子を有していないものが含まれる。この明細書の目的のために、また当該分野でしばしば引用されるように、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を持たない修飾オリゴヌクレオチドはまたオリゴヌクレオシドであると考えることができる。好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格には、例えばホスホロチオネート、キラルホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネートで、３'-アルキレンホスホネート、５'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むもの、ホスフィネート、ホスホルアミデートで、３'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むもの、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステ

ル、セレノホスフェート及びボラノ-ホスフェートで通常の３'-５'結合を持つもの、これらの２'-５'結合類似体、及び一又は複数のヌクレオチド間結合が３'から３'、５'から５'又は２'から２'結合である逆転された極性を持つものが含まれる。逆転した極性を持つ好適なオリゴヌクレオチドは単一の３'から３'結合を最も３'側のヌクレオチド間結合、つまり、非塩基性(abasic)でありうる単一の逆転ヌクレオシド残基（核酸塩基がないか、又はその代わりにヒドロキシル基を有する）を含む。様々な塩、混合された塩及び遊離の酸形態がまた含まれる。リン含有結合の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許３６８７８０８；４４６９８６３；４４７６３０１；５０２３２４３；５１７７１９６；５１８８８９７；５２６４４２３；５２７６０１９；５２７８３０２；５２８６７１７；５３２１１３１；５３９９６７６；５４０５９３９；５４５３４９６；５４５５２３３；５４６６６７７；５４７６９２５；５５１９１２６；５５３６８２１；５５４１３０６；５５５０１１１；５５６３２５３；５５７１７９９；５５８７３６１；５１９４５９９；５５６５５５５；５５２７８９９；５７２１２１８；５６７２６９７及び５６２５０５０が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【０１５５】

リン原子をそこに含まない好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格は短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、又は一又は複数の短鎖ヘテロ原子又は複素環ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）を有するもの；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート及びスルホンアミド骨格；アミド骨格；及び混合Ｎ、Ｏ、Ｓ及び$CH_2$成分部分を有する他のものが含まれる。このようなオリゴヌクレオチドの調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許５０３４５０６；５１６６３１５；５１８５４４４；５２１４１３４；５２１６１４１；５２３５０３３；５２６４５６２；５２６４５６４；５４０５９３８；５４３４２５７；５４６６６７７；５４７０９６７；５４８９６７７；５５４１３０７；５５６１２２５；５５９６０８６；５６０２２４０；５６１０２８９；５６０２２４０；５６０８０４６；５６１０２８９；５６１８７０４；５６２３０７０；５６６３３１２；５６３３３６０；５６７７４３７；５７９２６０８；５６４６２６９及び５６７７４３９が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、糖とヌクレオシド間結合の双方、つまりヌクレオチド単位の骨格が新規な基と置換される。ベース単位は適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。一つのそのようなオリゴマー化合物である、優れたハイブリダイゼーション特性を持つことが示されているオリゴヌクレオチド擬態体はペプチド核酸（ＰＮＡ）と呼ばれる。ＰＮＡ化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格はアミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格と置き換えられている。核酸塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接に結合している。ＰＮＡ化合物の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許５５３９０８２；５７１４３３１；及び５７１９２６２が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。ＰＮＡ化合物の更なる教示はNielsen等, Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホロチオネート骨格及び／又はヘテロ原子骨格、特に-$CH_2$-NH-O-$CH_2$-、-$CH_2$-N($CH_3$)-O-$CH_2$-［メチレン(メチルイミノ)又はＭＭＩ骨格として知られる］、-$CH_2$-O-N($CH_3$)-$CH_2$-、-$CH_2$-N($CH_3$)-N($CH_3$)-$CH_2$-、及び上で参照した米国特許第５４８９６７７号に記載された-O-N($CH_3$)-$CH_2$-$CH_2$-［ここで天然ホスホジエステル骨格は-O-P-O-$CH_2$-と表される］及び上で参照された米国特許第５６０２２４０号のアミド骨格を含む。また好ましいものは上で参照した米国特許第５０３４５０６号のモルホリノ骨格構造

を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【０１５６】

修飾オリゴヌクレオチドはまた一又は複数の置換糖鎖を含みうる。好適なオリゴヌクレオチドは２'位に次のものの一つを含む：ＯＨ；Ｆ；Ｏ-アルキル、Ｓ-アルキル、又はＮ-アルキル；Ｏ-アルケニル、Ｓ-アルケニル又はＮ-アルケニル；Ｏ-アルキニル、Ｓ-アルキニル又はＮ-アルキニル；又はＯ-アルキル-Ｏ-アルキルを含み、ここでアルキル、アルケニル及びアルキニルは置換又は非置換$C_1$～$C_{10}$アルキル又は$C_2$～$C_{10}$アルケニル及びアルキニルでありうる。特に好ましいものは$O[(CH_2)_nO]_mCH_3$、$O(CH_2)_nOCH_3$、$O(CH_2)_nNH_2$、$O(CH_2)_nCH_3$、$O(CH_2)_nONH_2$、及び$O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$であり、ここでｎ及びｍは１から約１０である。他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは２'位に次のものの一つを含む：$C_1$～$C_{10}$低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、Ｏ-アルカリル又はＯ-アラルキル、ＳＨ、$SCH_3$、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、$CF_3$、$OCF_3$、$SOCH_3$、$SO_2CH_3$、$ONO_2$、$NO_2$、$N_3$、$NH_2$、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を改善する基、オリゴヌクレオチドの薬理的性質を改善する基、及び同様な性質を持つ他の置換基。好適な修飾は２'-メトキシエトキシ(２'-Ｏ-(２-メトキシエチル)又は２'-ＭＯＥとしても知られている２'-Ｏ-$CH_2CH_2OCH_3$）（Martin等，Helv. Chim. Acta., 1995, 78, 486-504）、つまりアルコキシアルコキシ基を含む。更に好適な修飾は、以下の実施例に記載されているように２'-ジメチルアミノオキシエトキシ、つまり２'-ＤＭＡＯＥとしても知られている$O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$基、及び２'-ジメチルアミノエトキシエトキシ（２'-Ｏ-ジメチルアミノエトキシエチル又は２'-ＤＭＡＥＯＥとしても知られている）、つまり２'-Ｏ-$CH_2$-Ｏ-$CH_2$-Ｎ($CH_2$)を含む。

更に好適な修飾は、２'-ヒドロキシル基が糖環の３'又は４'炭素原子に結合され二環糖部分を形成する固定核酸(Locked Nucleic Acids: ＬＮＡｓ)を含む。結合は好ましくはｎが１又は２である２'酸素原子と４'炭素原子を架橋するメチレン（$-CH_2-$）$_n$基である。ＬＮＡｓ及びその製造方法は国際公開９８／３９３５２及び国際公開９９／１４２２６に記載されている。

他の好適な修飾は２'-メトキシ(２'-Ｏ-$CH_3$)、２'-アミノプロポキシ(２'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、２'-アリル(２'-$CH_2$-ＣＨ=$CH_2$)、２'-Ｏ-アリル(２'-Ｏ-$CH_2$-ＣＨ=$CH_2$)及び２'-フルオロ(２'-Ｆ)を含む。２'-修飾はアラビノ（上）位置又はリボ（下）位置においてでありうる。好適な２'-アラビノ修飾は２'-Ｆである。同様の修飾はまたオリゴヌクレオチドの他の位置、特に３'末端ヌクレオチドの糖の３'位又は２'－５'結合オリゴヌクレオチド及び５'末端ヌクレオチドの５'位になすことができる。オリゴヌクレオチドはまたペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖擬態体を有しうる。そのような修飾糖構造の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許４９８１９５７；５１１８８００；５３１９０８０；５３５９０４４；５３９３８７８；５４４６１３７；５４６６７８６；５５１４７８５；５５１９１３４；５５６７８１１；５５７６４２７；５５９１７２２；５５９７９０９；５６１０３００；５６２７０５３；５６３９８７３；５６４６２６５；５６５８８７３；５６７０６３３；５７９２７４７；及び５７００９２０が含まれ、その各々は出典明示により全体がここに取り込まれる。

【０１５７】

オリゴヌクレオチドにはまた核酸塩基（当該分野ではしばしば単に「塩基」と称される）の修飾又は置換が含まれうる。ここで使用される場合、「未修飾の」又は「天然の」核酸塩基にはプリン塩基アデニン（Ａ）及びグアニン（Ｇ）及びピリミジン塩基チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）及びウラシル（Ｕ）が含まれる。修飾核酸塩基には、他の合成及び天然核酸塩基、例えば５-メチルシトシン（５-me-Ｃ）、５-ヒドロキシメチルシトシン、キ

サンチン、ヒポキサンチン、２-アミノアデニン、６-メチル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、２-プロピル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、２-チオウラシル、２-チオチミン及び２-チオシトシン、５-ハロウラシル及びシトシン、５-プロポニル（-Ｃ≡Ｃ-ＣＨ$_3$ 又はＣＨ$_2$ -Ｃ≡ＣＨ）ウラシル及びシトシン及び他のピリミジン塩基のアルキル誘導体、６-アゾウラシル、シトシン及びチミン、５-ウラシル（プソイドウラシル）、４-チオウラシル、８-ハロ、８-アミノ、８-チオール、８-チオアルキル、８-ヒドロキシル及び他の８-置換アデニン類及びグアニン類、５-ハロ、特に５-ブロモ、５-トリフルオロメチル及び他の５-置換ウラシル類及びシトシン類、７-メチルグアニン及び７-メチルアデニン、２-Ｆ-アデニン、２-アミノ-アデニン、８-アザグアニン及び８-アザアデニン、７-デアザグアニン及び７-デアザアデニン及び３-デアザグアニン及び３-デアザアデニンが含まれる。更なる修飾核酸塩基には、三環系ピリミジン類、例えばフェノキサジンシチジン(１Ｈ-ピリミド[５,４-ｂ][１,４]ベンゾキサジン-２(３Ｈ)-オン)、フェノチアジンシチジン(１Ｈ-ピリミド[５,４-ｂ][１,４]ベンゾチアジン-２(３Ｈ)-オン)、Ｇ-クランプ、例えば置換フェノキサジンシチジン（例えば９-(２-アミノエトキシ)-Ｈ-ピリミド[５,４-ｂ][１,４]ベンゾキサジン-２(３Ｈ)-オン）、カルバゾールシチジン(２Ｈ-ピリミド[４,５-ｂ]インドール-２-オン)、ピリドインドールシチジン(Ｈ-ピリド[３',２'：４,５]ピロロ[２,３-ｄ]ピリミジン-２-オン)が含まれる。修飾核酸塩基にはまたプリン又はピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、例えば７-デアザ-アデニン、７-デアザグアノシン、２-アミノピリジン及び２-ピリドンが含まれうる。更なる核酸塩基には米国特許第３６８７８０８号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, ８５８-８５９頁, Kroschwitz, J.I.編 John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、及びEnglisch等, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30,613に開示されているものが含まれる。これらの核酸塩基のある種のものは本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのに特に有用である。これらには、５-置換ピリミジン、６-アザピリミジン及びＮ-２、Ｎ-６及びＯ-６置換プリンで、２-アミノプロピルアデニン、５-プロピニルウラシル及び５-プロピニルシトシンを含むものが含まれる。５-メチルシトシン置換は０．６－１．２℃だけ核酸二重安定性を増大させることが知られており（Sanghvi等, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp.276-278）、より詳細には２'-Ｏ-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合には、好適な塩基置換である。修飾核酸塩基の製造を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許３６８７８０８；並びに米国特許４８４５２０５；５１３０３０２；５１３４０６６；５１７５２７３；５３６７０６６；５４３２２７２；５４５７１８７；５４５９２５５；５４８４９０８；５５０２１７７；５５２５７１１；５５５２５４０；５５８７４６９；５５９４１２１；５５９６０９１；５６１４６１７；５６４５９８５；５８３０６５３；５７６３５８８；６００５０９６；５６８１９４１及び５７５０６９２が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【０１５８】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの他の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布又は細胞取り込みを亢進する一又は複数の部分又はコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に結合させる。本発明の化合物は第１級又は第２級ヒドロキシル基のような官能基に共有結合したコンジュゲート基を含みうる。本発明のコンジュゲート基には、介入物（インターカレーター）、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬理的性質を増強する基、及びオリゴマーの薬物動態学的性質を増強する基が含まれる。典型的なコンジュゲート基には、コレステロール、脂質、カチオン脂質、リン脂質、カチオン性リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び染料が含まれる。この発明の文脈における薬理学的性質を増強する基には、オリゴマー取り込みを改善し、分解に対するオリゴマーの耐性を亢進し、及び／又はＲＮＡとの配列特異的ハイブリダイゼーションを補強する基が含まれる。この発明の文脈における

薬物動態学的性質を増強する基には、オリゴマー取り込み、分散、代謝又は排出を改善する基が含まれる。コンジュゲート部分には限定されるものではないが、脂質分子、例えばコレステロール部分（Letsinger等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1989，86，6553-6556)、コール酸（Manoharan等，Bioorg. Med. Chem. Let.，1994，4，1053-1063）、チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール（Manoharan等，Ann. N.Y. Acad. Sci.，1992，660-306-309; Manoharan等，Bioorg. Med. Chem. Let.，1993，3，2765-2770）、チオコレステロール（Oberhauser等，Nucl. Acids Res.，1992，20，533-538）、脂肪族鎖、例えばドデカンジオール又はウンデシル残基（Saison-Behmoaras等，EMBOJ.，1991，10，1111-1118; Kabanov等，FEBS Lett.，1990，259，327-330; Svinarchuk等，Biochimie，1993，75，49-54）、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチル-アンモニウム１，２-ジ-Ｏ-ヘキサデシル-rac-グリセロ-３-H-ホスホナート（Manoharan等，Tetrahedron Lett.，1995，36，3651-3654; Shea等，Nucl. Acids Res.，1990，18，3777-3783)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖（Manoharan等，Nucleosides & Nucleotides，1995，14，969-973）、又はアダマンタン酢酸（Manoharan等、Tetrahedron Lett.，1995，36，3651-3654）、パルミチル部分（Mishra等，Biochim. Biophys. Acta，1995，1264，229-237）、又はオクタデシルアミン又はヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分が含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドはまた活性な薬物物質、例えばアスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(Ｓ)-(＋)-プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、２，３，５-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビツレート、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病剤、抗菌剤又は抗生物質にコンジュゲートすることができる。オリゴヌクレオチド-薬剤コンジュゲート及びその製造方法は米国特許出願第０９／３３４１３０号（１９９９年６月１５日出願）及び米国特許４８２８９７９；４９４８８８２；５２１８１０５；５５２５４６５；５５４１３１３；５５４５７３０；５５５２５３８；５５７８７１７；５５８０７３１；５５８０７３１；５５９１５８４；５１０９１２４；５１１８８０２；５１３８０４５；５４１４０７７；５４８６６０３；５５１２４３９；５５７８７１８；５６０８０４６；４５８７０４４；４６０５７３５；４６６７０２５；４７６２７７９；４７８９７３７；４８２４９４１；４８３５２６３；４８７６３３５；４９０４５８２；４９５８０１３；５０８２８３０；５１１２９６３；５２４１１３６；５０８２８３０；５１１２９６３；５２１４１３６；５２４５０２２；５２５４４６９；５２５８５０６；５２６２５３６；５２７２２５０；５２９２８７３；５３１７０９８；５３７１２４１；５３９１７２３；５４１６２０３；５４５１４６３；５５１０４７５；５５１２６６７；５５１４７８５；５５６５５５２；５５６７８１０；５５７４１４２；５５８５４８１；５５８７３７１；５５９５７２６；５５９７６９６；５５９９９２３；５５９９９２８及び５６８８９４１に記載され、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【０１５９】

与えられた化合物の全ての位置を一様に修飾する必要はなく、実際、一を超える上述の修飾を単一化合物中に又はオリゴヌクレオチド内の単一ヌクレオシドにさえ導入することができる。本発明はまたキメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明の文脈における「キメラ」アンチセンス化合物又は「キメラ」は、それぞれが少なくとも一のモノマー単位、つまりオリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドからなる２以上の化学的に区別される領域を含むアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは典型的にはオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ分解に対する増大した耐性、増大した細胞性取り込み、及び／又は標的核酸に対する増大した結合親和性を付与するようにオリゴヌクレオチドが修飾されている少なくとも一の領域を含む。オリゴヌクレオチドの更なる領域はＲＮＡ：ＤＮＡ又はＲＮＡ：ＲＮＡハイブロッドを切断可能な酵素の基質となりうる。例を挙げると、ＲＮアーゼＨはＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖のＲＮＡ鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。故に、ＲＮアーゼＨの活性化はＲＮＡ

標的の開裂を生じ、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効果を大きく向上させる。従って、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオネートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、より短いオリゴヌクレオチドで同等の結果をしばしば得ることができる。本発明のキメラアンチセンス化合物は上述の二以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド及び／又はオリゴヌクレオチド擬態体の複合構造体として形成されてもよい。好適なキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ耐性を付与するために３'末端に少なくとも一の２'修飾糖（好ましくは２'-Ｏ-(ＣＨ$_2$)$_2$-Ｏ-ＣＨ$_3$）とＲＮアーゼＨ活性を付与するために少なくとも４の隣接した２'-Ｈ糖を持つ領域を含む。このような化合物はまた当該分野においてハイブリッド又はギャプマー(gapmers)とも呼ばれている。好適なギャプマーは少なくとも４の隣接した２'-Ｈ糖を持つ少なくとも一の領域で分離した３'末端と５'末端２'修飾糖（好ましくは２'-Ｏ-(ＣＨ$_2$)$_2$-Ｏ-ＣＨ$_3$）の領域を持ち、好ましくはホスホロチオネート骨格結合を含む。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第５０１３８３０；５１４９７９７；５２２０００７；５２５６７７５；５３６６８７８；５４０３７１１；５４９１１３３；５５６５３５０；５６２３０６５；５６５２３５５；５６５２３５６；及び５７００９２２が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

本発明において使用されるアンチセンス化合物は固相合成のよく知られた技術によって簡便かつ常套的に製造することができる。そのような合成のための装置は、例えばApplied Biosystems (Foster City, Calif.)を含む幾つかのメーカーによって販売されている。当該分野で知られているそのような合成のための任意の他の手段を付加的に又は別に使用してもよい。オリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオネート及びアルキル化誘導体を調製するために類似の技術を使用することはよく知られている。本発明の化合物は、また、取り込み、分散及び／又は吸収を補助するための他の分子、分子構造又は化合物混合物、例えばリポソーム、レセプター標的分子、経口、直腸、局所適用又は他の製剤と、混合、カプセル化、コンジュゲート又はその他、組み合わされてもよい。そのような取り込み、分散及び／又は吸収を補助する製剤の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第５１０８９２１；５３５４８４４；５４１６０１６；５４５９１２７；５５２１２９１；５５４３１５８；５５４７９３２；５５８３０２０；５５９１７２１；４４２６３３０；４５３４８９９；５０１３５５６；５１０８９２１；５２１３８０４；５２２７１７０；５２６４２２１；５３５６６３３；５３９５６１９；５４１６０１６；５４１７９７８；５４６２８５４；５４６９８５４；５５１２２９５；５５２７５２８；５５３４２５９；５５４３１５２；５５５６９４８；５５８０５７５；及び５５９５７５６が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

【０１６０】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開９０／１００４８に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(Ｌ-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、ＣａＰＯ$_4$-媒介ＤＮＡトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスＭ-ＭｕＬＶから誘導されるもの、Ｎ２（Ｍ-ＭｕＬＶから誘導されたレトロウイルス）、又はＤＣＴ５Ａ、ＤＣＴ５Ｂ及びＤＣＴ５Ｃと命名されたダブルコピーベクター（国際公開９０／１３６４１参照）

を含む。

【０１６１】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開９１／０４７５３に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開９０／１０４４８に記載されたように、オリゴヌクレオチド－脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド－脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

【０１６２】

アンチセンス又はセンスＲＮＡ又はＤＮＡ分子は、通常は少なくとも約５ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、又は１０００ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の１０％を加えるか又は減じたものを意味する。

また、プローブをＰＣＲ技術に用いて、密接に関連したＰＲＯ９２２４０コード化配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

また、ＰＲＯ９２２４０をコードするヌクレオチド配列は、そのＰＲＯ９２２４０をコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブの作成にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサイツハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖分析、及びライブラリでのハイブリダイゼーションスクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

【０１６３】

ＰＲＯ９２２４０のコード化配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合（例えば、ＰＲＯ９２２４０がレセプターである場合）、ＰＲＯ９２２４０は、結合相互作用に関わっている他のタンパク質又は分子を同定するためのアッセイに使用することができる。このような方法により、レセプター／リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。また、このような結合性相互作用に含まれるタンパク質は、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプターＰＲＯ９２２４０は関連するリガンドの単離に使用できる。スクリーニングアッセイは、天然ＰＲＯ９２２４０又はＰＲＯ９２２４０のレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために設計してよい。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイを含み、それらアッセイを特に小分子薬剤候補を同定することに適したものにする

。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

また、ＰＲＯ９２２４０又はその修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを産生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたＤＮＡである。一実施形態では、ＰＲＯ９２２４０をコードするｃＤＮＡは、ＰＲＯ９２２４０をコードするＤＮＡを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、ＰＲＯ９２２４０をコードするゲノムＤＮＡをクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第４７３６８６６号や第４８７０００９号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのＰＲＯ９２２４０導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたＰＲＯ９２２４０をコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はＰＲＯ９２２４０をコードするＤＮＡの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【０１６４】

あるいは、ＰＲＯ９２２４０の非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたＰＲＯ９２２４０をコードする変更ゲノムＤＮＡと、ＰＲＯ９２２４０をコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ＰＲＯ９２２４０をコードする欠陥又は変更遺伝子を有するＰＲＯ９２２４０「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、ＰＲＯ９２２４０をコードするｃＤＮＡは、確立された技術に従い、ＰＲＯ９２２４０をコードするゲノムＤＮＡのクローニングに使用できる。ＰＲＯ９２２４０をコードするゲノムＤＮＡの一部を欠失させたり、組み込みをモニターするために使用する選択性マーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングＤＮＡ(５’と３’末端の両方)を数キロベース含む［例えば、相同組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと］。ベクターを胚幹細胞株に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたＤＮＡが内在性ＤＮＡと相同的に組換えられた細胞を選択する［例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照］。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する［例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編 (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと］。その後、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌性乳母動物に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたＤＮＡを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたＤＮＡを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの欠乏によるある種の病理的状態及びその病理的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

また、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が細胞内に導入される。「遺伝子治療」とは、１回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なＤＮＡ又はｍＲＮＡの１回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスＲＮＡ及びＤＮＡは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いるこ

とができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている（Zamecnik等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]）。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

【０１６５】

生細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、ＤＥＡＥ-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス（典型的にはレトロウイルス）ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介トランスフェクションである（Dzau等，Trends in Biotechnology 11，205-210(1993)）。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び／又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wu等，J. Biol. Chem. 262，4429-4432 (1987)；及びWagner等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87，3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Anderson等，Science 256，808-813 (1992)を参照のこと。

ここに記載したＰＲＯ９２２４０ポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。この点において、実際の配列データに基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、目下のところ新規な染色体マーカーの同定の必要である。本発明の各ＰＲＯ９２２４０核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

また、本発明のＰＲＯ９２２４０ポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングの診断に使用でき、本発明のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、その他の組織と比較して１つの組織において、好ましくは同じ組織型の正常組織に比較して疾患性組織において特異的に発現する。ＰＲＯ９２２４０核酸分子には、ＰＣＲ、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【０１６６】

この発明は、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド（アゴニスト）を模倣、又はＰＲＯ９２２４０ポリペプチド（アンタゴニスト）の効果を防ぐものを同定するための化合物をスクリーニングする方法を含む。アンタゴニスト薬候補に関するスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと結合又は複合化する、さもなければコードされているポリペプチドと他の細胞タンパク質の相互作用を妨害する化合物、例えば、細胞からのＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの発現を阻害するものを含む化合物を同定するように設計されている。そのようなスクリーニングアッセイには、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイが含まれ、それらアッセイを特に小分子薬剤候補の同定に適したものにする。

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、そして細胞ベースアッセイを含む、当該分野で良く特徴付けられている種々の形式で行うことができる。

アンタゴニストに関する全てのアッセイは、薬候補をここで同定された核酸によってコードされているＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと、これら両成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間にわたって接触させることを必要とする点で共通である。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又

は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるＰＲＯ９２２４０ポリペプチド又は薬候補が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体の使用によって検出できる。

【０１６７】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子によってコードされる特定のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドと結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質－タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィーのカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans Proc.Natl. Acad. Sci. USA,89:5789-5793 (1991)に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等［Fiels及びSong, Nature(London),340, :245-246(1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)］に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌ＧＡＬ４などの多くの転写活性化剤は、２つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はＤＮＡ結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「２-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、２つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。ＧＡＬ１-ｌａｃＺリポーター遺伝子のＧＡＬ４活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したＧＡＬ４活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、β-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。２-ハイブリッド技術を用いた２つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(商品名)）は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【０１６８】

ここで同定されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードする遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞内又は細胞外成分を、それら２つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で調製される。候補化合物の結合阻害能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第３の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合（複合体形成）は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなくコントロール反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

アンタゴニストを検定するために、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともに細胞に添加してもよく、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合ＰＲＯ９２２４０

ポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したＰＲＯ９２２４０ポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパニング及びＦＡＣＳソーティングにより同定できる。Coligan等, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クローニングが用いられ、そこではポリアデニル化ＲＮＡがＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このＲＮＡから生成されたｃＤＮＡライブラリがプールに分配され、ＣＯＳ細胞又は他のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したＰＲＯ９２２４０ポリペプチドへ曝露する。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、対話型サブプール化及び再スクリーニング法を用いてサブプールを調製して再形質移入し、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【０１６９】

レセプター同定の代替的方法として、標識したＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をＰＡＧＥで分離し、Ｘ線フィルムに曝す。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロシークエンシングを施してよい。マイクロシークエンシングから得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するｃＤＮＡライブラリをスクリーニングするディジェネレートオリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとＰＲＯ９２２４０ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの作用を競合的に阻害するＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの変異形態であってもよい。

他の潜在的なＰＲＯ９２２４０ポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡ作成物であり、例えば、アンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡ分子は、標的ｍＲＮＡにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を妨害することによりｍＲＮＡの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、三重螺旋形成又はアンチセンスＤＮＡ又はＲＮＡを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのＤＮＡ又はＲＮＡへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の５'コード化部分は、約１０から４０塩基対長のアンチセンスＲＮＡオリゴヌクレオチドの設計に使用される。ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され（三重螺旋－Lee等, Nucl, Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooney等, Science, 241: 456 (1988); Dervan等, Science, 251: 1360 (1991)参照）、それによりＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスＲＮＡオリゴヌクレオチドはインビボでｍＲＮＡにハイブリダイゼーションしてｍＲＮＡ分子のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドへの翻訳を阻止する（アンチセンス－Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)）。また上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡをインビボで発現させて、ＰＲＯ９２２４０ポリペプ

チドの産生を阻害することもできる。アンチセンスＤＮＡが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の－１０から＋１０位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【０１７０】

潜在的アンタゴニストは、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、ＲＮＡの特異的切断を触媒できる酵素的ＲＮＡ分子である。リボザイムは、相補的標的ＲＮＡへの配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断的開裂により作用する。潜在的ＲＮＡ標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びＰＣＴ公報、国際公開 ９７／３３５５１（１９９７年９月１８日公開）を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスティン(Hoogsteen)塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのかなり大きな伸張を必要とする。さらなる詳細は、例えば、上掲のＰＣＴ公報、国際公開９７／３３５５１を参照。

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び／又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【０１７１】

単離されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチド-コード化核酸は、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、組み換え的にＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを生成するために、ここで用いることが可能である。次に、生成されたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、抗ＰＲＯ９２２４０抗体を生成するために用いることが可能である。

ここで同定されるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、取り込める抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に搬送するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び／又は組換えＤＮＡ技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に１つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞障害性薬、サイトカイン、化学療法剤、又は成長阻害剤のようなその機能を高める薬剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【実施例】

【０１７２】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用

した。ＡＴＣＣ受託番号により以下の実施例及び明細書全体の中で特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【０１７３】

実施例１：ヒトＰＲＯ９２２４０をコードするｃＤＮＡクローンの単離

Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ公開データベースから得られる約９５０の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）配列（存在する場合は分泌シグナル配列も含む）を使用して配列データベースを検索した。データベースは、公開データベース（例えばＧｅｎＢａｎｋ）を含んだ。本実施例では、スタンフォード大学からライセンスを受けた遺伝子予想プログラムＧＥＮＳＣＡＮを用いてＧｅｎＢａｎｋのゲノムＤＮＡ配列を分析した。ＧＥＮＳＣＡＮ分析は遺伝子コード化領域を予想し、ＥＣＤ検索の条件に合う配列を作成する。検索は、コンピュータプログラムＢＬＡＳＴ又はＢＬＡＳＴ２を用いて、ＥＣＤタンパク質配列と６フレーム翻訳配列とを比較する形式で実施した[Altschul等、Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)]。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（場合によっては９０）以上の結果を出した比較物を、必要に応じてプログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, WA）で集団化し、コンセンサスＤＮＡ配列を構築した。

一つのコンセンサス配列をＤＮＡ３３２４４３と命名した。

ＤＮＡ３３２４４３コンセンサス配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、１）ＰＣＲによる対象となる配列を含むｃＤＮＡライブラリの同定、及び２）ＰＲＯ９２２４０の完全長コード化配列のクローンを単離するプローブとしての使用に用いた。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を提供するために設計される。プローブ配列は、一般的に４０－５５ｂｐ長である。場合によっては、コンセンサス配列が約１－１．５ｋｂｐより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするため、ライブラリからのＤＮＡを、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology（上掲）に記載のように、ＰＣＲプライマー対を用いたＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンを単離するのにポジティブライブラリを使用した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー　５’－ＣＧＣＴＡＴＣＡＧＧＡＡＧＴＣＡＴＡＧＣＧＡＡＧＧＧＣ－３’（配列番号３）

逆方向ＰＣＲプライマー　５’－ＧＡＡＡＡＧＧＴＡＴＣＣＣＴＣＡＴＧＧＧＣＴＴＣＣＴＧ－３’（配列番号４）

加えて、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスＤＮＡ３３２４４３配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを構築した。

ハイブリダイゼーションプローブ　５’－ＣＴＣＴＣＧＡＧＴＧＣＡＧＡＴＧＧＣＧＣＣＣＡＧＧＡＧＧＡＡＧＡＣ－３’（配列番号５）

【０１７４】

様々な組織から得られた５０の異なるヒトｃＤＮＡライブラリのプールをクローニングに使用した。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（カリフォルニア州サンディエゴ）の製品等、市販の試薬を用いた標準的な方法によりｃＤＮＡクローンを単離するために使用するｃＤＮＡライブラリを構築した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、平滑末端でＳａｌＩヘミキナーゼアダプターに結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５ＢはＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照）に、独特のＸｈｏＩ及びＮｏｔＩ部位において、所定の方向でクローニングした。

上述のようにして単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、完全長ＰＲＯ９２２４０

ポリペプチド（本明細書でＤＮＡ３４０５３５（図１、配列番号１）と命名した）の完全長ＤＮＡ配列、及びそれに由来するＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのタンパク質配列が得られた。

上記に同定された完全長クローンは、ヌクレオチド位置２７７－２７９に明確な翻訳開始部位を、ヌクレオチド位置２４１９－２４２１に終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた（図１、配列番号１）。予想されるポリペプチド前駆物質は７１４アミノ酸長であり、測定された分子量は約７８２２４．７７ダルトン、及び推定ｐｌは約５．６９である。図２（配列番号２）に示す完全長ＰＲＯ９２２４０配列の分析により、図２に示す様々な重要ポリペプチドドメインの存在が実証され、それら重要なポリペプチドドメインの位置は上記に概算した通りである。

【０１７５】

実施例２：ＧｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）を用いた組織発現プロファイリングによる癌性腫瘍中のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの上方制御の検出

他の腫瘍及び／又は正常組織に比べて対象となる特定の腫瘍組織において発現が顕著に上方制御されるポリペプチド（及びそれをコードする核酸）を同定するために、遺伝子発現情報を含む専有データベース（ＧｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）、Ｇｅｎｅ Ｌｏｇｉｃ Ｉｎｃ．、米国メリーランド州ゲイサーズバーグ）を分析した。具体的に言うと、ＧｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースの分析は、Ｇｅｎｅ Ｌｏｇｉｃ Ｉｎｃ．（米国メリーランド州ゲイサーズバーグ）から入手できるＧｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースで使用するソフトウェア、またはＧｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースで使用する、ジェネンテック社で作成され、開発された専有ソフトウェアを用いて行った。分析のポジティブヒットの評価は、例えば、正常基本組織及び／又は正常増殖性組織における組織特異性、腫瘍特異性及び発現レベルなどを含むいくつかの基準に基づく。ＧｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースの分析により決定される組織発現プロファイルが、他の腫瘍組織及び／又は正常組織に比べて特定の腫瘍組織または腫瘍組織において高い組織発現及び顕著な発現の上方制御を示し、状況に応じて正常基本組織及び／又は正常増殖性組織において比較的低い発現を示す分子は以下の通りである。ＰＲＯ９２２４０は、正常胸部組織を対照的として乳癌で、正常卵巣と比較して卵巣癌で、正常な肺と比較して肺癌で、及び正常結腸と比較して結腸直腸癌で、それぞれ上方制御を示した（図３参照）。

【０１７６】

実施例３：ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドのマイクロアレイ分析

しばしば何千もの遺伝子配列を含む核酸マイクロアレイは、対応する正常組織と比較して病変組織においては異なって発現する遺伝子を同定するのに有用である。核酸マイクロアレイを使用し、試験及びコントロール組織試料から得られた試験及びコントロールｍＲＮＡ試料を逆転写し、ｃＤＮＡプローブが生成されるように標識した。次いでｃＤＮＡプローブを固体支持体に固定した核酸のアレイにハイブリダイズした。アレイはアレイの各メンバーの配列及び位置がわかるように構成した。例えば、特定の病態に発現することが知られている遺伝子の選択を固体支持体上で配列することができるものであった。標識プローブの特定のアレイメンバーとのハイブリダイゼーションは、プローブが取得された試料がその遺伝子を発現することを示す。試験（病変組織）試料から得られたプローブのハイブリダイゼーションシグナルがコントロール（正常組織）試料から得られたプローブのハイブリダイゼーションシグナルより大きい場合、病変組織に過剰発現する遺伝子を同定した。この結果により、病変組織に過剰発現するタンパク質は、病態の存在を示す診断マーカーとしてだけでなく、病態の治療の標的としても有用であることが示された。

核酸のハイブリダイゼーションの方法論及びマイクロアレイ技術は従来技術に周知である。一例では、ハイブリダイゼーション及びプローブ、スライド、及びハイブリダイゼーション条件のための核酸の特定の調製法が、2001年3月30日に出願された国際特許出願番号第PCT/US01/10482号に詳細に開示されており、その内容を出典明示によりここに取り込む。

【０１７７】

マクロファージは、サイトカイン産生、微生物及び腫瘍細胞の死滅、並びに抗原の処理及び提示を含む様々な機能を発現する固定及び循環単核貪食細胞の偏在的に分散した集団を表す。マクロファージは、骨髄において二分化能の顆粒球／マクロファージ細胞集団を生じさせる幹細胞から生じる。個別の顆粒球及びマクロファージコロニー形成細胞系統は、特異的なサイトカインの影響下でＧＭ－ＣＳＦから生じる。分裂すると、単芽球が骨髄中に前単球と単球を生じさせる。ここから単球は循環を始める。特定の刺激（例えば感染又は異物）に反応して、単球は組織及び器官内へと移動し、そこでマクロファージに分化する。異なる組織中のマクロファージの形態と機能は様々であり、それらは肝臓中のクッパー細胞、肺の肺胞マクロファージ、及び中枢神経系のミクログリア細胞など、異なる名称を有する。しかしながら、血中単球と組織マクロファージの関係は依然として不明である。本試験では、ヒト及びウシ血清の組み合わせの存在下においてプラスチックに付着することにより単球がマクロファージに分化した。培養７日後、単球由来のマクロファージは、オプソニン化した粒子の貪食能、ＬＰＳ刺激によるＴＮＦａｌｐｈａの分泌、プロセス形成及びマクロファージ細胞表面マーカーの存在を含む、分化した組織マクロファージに典型的な特徴を示した。マイクロアレイ技術を用いて、付着前に回収した非分化単球から得られた遺伝子転写物を、培養１日及び７日のものと比較した。単球又はマクロファージ中に選択的に発現した遺伝子は、ヒトにおける様々な慢性的炎症又は自己免疫疾患の診断と治療に使用することができた。特に、単球／マクロファージ付着及び内皮細胞遊出に関与する、表面に発現する分子又は膜貫通レセプターにより、これらの細胞を炎症部位へホーミングさせることにより慢性的炎症を治療するという新規の標的が提供された。

例示的な炎症性疾患としては、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、骨関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節炎、全身性強皮症、特発性炎症性筋障害、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫媒介性腎疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄性疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害又はギランバレー症候群、及び慢性炎症性脱髄性多発神経障害、胆管疾患、例えば感染性、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性単肝炎、炎症性腸疾患、グルテン敏感性腸疾患、及びウィップル病、水泡性皮膚疾患、多形紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫性又は免疫媒介性皮膚病、乾癬、アレルギー疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、移植片拒絶及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患が挙げられる。

【０１７８】

本実験では、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　ＭＡＣＳ（登録商標）のプロトコルによるポジティブな選択によりＣＤ１４＋単球を選択した。１００ｍｌのヘパリン処置した血液中のリンパ球をＦｉｃｏｌｌ　Ｐａｑｕｅ（登録商標）を用いて分離した。ＰＢＳ／０．５％　ＢＳＡ／２ｍＭ　ＥＤＴＡ中で細胞を２度洗浄した。最終洗浄の際、全ての勾配をプールし、容量をおよそ１０ｍｌにした。細胞を遠心分離し、上清を除去し、細胞ペレットを総容量$10^7$細胞／８０μｌの緩衝液に再懸濁した。合計$10^7$個の細胞につき２０μｌのＣＤ１４マイクロビーズを添加し、混合し、６～１２℃で１５分間インキュベートした。２０×標識容量の緩衝液を添加することにより細胞を洗浄し、ペレットをスピンし、$10^7$細胞につき５００ｕｌの緩衝液に再懸濁した。ＭＡＣＳ（登録商標）枯渇カラムＤ型で細胞を分離し、抗ＣＤ４５及び抗ＣＤ１４抗体を用いた標識化により細胞の純度をチェックした（この時点での純度は＞９５％であった）。ＲＮＡ溶解緩衝液中に細胞を溶解させ、０日目の単球を取得し、次いで残りの細胞をマクロファージ分化培地：ＤＭＥＭ　４．５ｕｇ／ｍｌグルコース、Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ、Ｌグルタミン、２０％ＦＢＳ及び１０％ヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ、カタログ番号１００－５１２）中の６ウェルプレートに蒔いた。ウェル（６ウェルＣｏｓｔａｒ（登録商標）細胞培養プレート）当り１．５×１０ｅ６で細胞を蒔き、３７℃、ＣＯ２　７％で成長させた。２４時間後培養物から細胞を回収し、ＲＮＡ溶解緩衝液に溶解させて１日目のｍＲＮＡを取得した。残りの細胞を７日目まで

培養物中に維持した。７日後培養物から得た細胞をＲＮＡ溶解緩衝液に溶解させて７日目の試料を得た。この時点で細胞は大きなマクロファージ形態を示していた。

Ｑｉａｇｅｎ（登録商標）のミニプレップによりｍＲＮＡを単離し、Ａｆｆｉｍａｘ（登録商標）（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｉｎｃ．／カリフォルニア州サンタクララ）マイクロアレイチップ及び出願人独自のマイクロアレイで分析した。０日目、１日目、及び７日目にそれぞれ回収した細胞に対して同じ分析を行った。７日目に発現が上方制御された遺伝子を、０日目及び１日目と比較した。

このような実験の結果により、０日目の非分化単球と比較した場合に、本発明のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドが１日目及び７日目の分化マクロファージに異なって発現することが示された（図４に示す）。マクロファージは血流に入ることがなく、且つ自己免疫関連疾患に参画しているので、分化により分子が上方制御されることが判明したことは、自己免疫疾患の軽減に有用であると思われる。

【０１７９】

実施例４：ＰＲＯ９２２４０のハイブリダイゼーションプローブとしての使用

以下の方法は、ＰＲＯ９２２４０をコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとして、すなわち哺乳類における腫瘍の存在を診断するための使用を記載する。

本明細書に開示する完全長又は成熟ＰＲＯ９２２４０のコード化配列を含むＤＮＡは、ヒト組織ｃＤＮＡライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリ中の相同ＤＮＡ（例えばＰＲＯ９２２４０の天然発生変異体をコードするもの）をスクリーニングするためのプローブとしても使用できる。

いずれかのライブラリＤＮＡを含むフィルタのハイブリダイゼーション及び洗浄を以下のように高度にストリンジェントな条件下で行った。放射標識したＰＲＯ９２２４０由来のプローブの、フィルタへのハイブリダイゼーションを、５０％のホルムアミド、５×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳ、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８、２×デンハート液、及び１０％デキストラン硫酸の溶液中において、４２℃で２０時間に亘り行った。

当技術分野で既知の標準的技術を用いることにより、完全長天然配列ＰＲＯ９２２４０をコードするＤＮＡと所望の配列同一性を有するＤＮＡが同定された。

【０１８０】

実施例５：大腸菌中でのＰＲＯ９２２４０の発現

この実施例は、大腸菌中での組換え発現によるＰＲＯ９２２４０の非グリコシル化形態の調製を例証する。

ＰＲＯ９２２４０をコードするＤＮＡ配列は、選択されたＰＣＲプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、ｐＢＲ３２２（大腸菌由来のもの；Bolivar等, Gene, 2:95 (1977)参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、脱リン酸化される。ＰＣＲ増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、ｔｒｐプロモーター、ポリ-Ｈｉｓリーダー（最初の６つのＳＴＩＩコドン、ポリ-Ｈｉｓ配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、ＰＲＯ９２２４０コードする領域、ラムダ転写ターミネーター、及びａｒｇＵ遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、ついで、上掲のSambrook等に記載された方法を用いて選択した大腸菌の形質転換に使用される。形質転換体は、それらのＬＢプレートで成長する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミドＤＮＡが単離され、制限分析及びＤＮＡシーケンシングで確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加したＬＢブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を所望の光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

さらに数時間の細胞培養の後、遠心分離による集菌が可能である。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化ＰＲＯ９２２４０タンパク質を、タンパク質が堅く結合する条件下で金属キレート化カラムを用いて精製した。

【０１８１】

以下の手法を用いて、ポリ-Ｈｉｓ（ポリ-ヒス）タグ形態でＰＲＯ９２２４０を大腸菌で発現させてもよい。ＰＲＯ９２２４０をコードするＤＮＡを選択したＰＣＲプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いでＰＣＲ増幅された、ポリ-Ｈｉｓタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株５２（W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)）に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体は、最初に５０mg/mlのカルベニシリンを含有するＬＢ中、３０℃で振盪しながら３－５のＯ．Ｄ．６００に達するまで成長させた。ついで培地をＣＲＡＰ培地（３．５７ｇの$(NH_4)_2SO_4$、０．７１ｇのクエン酸ナトリウム・２Ｈ２Ｏ、１．０７ｇのＫＣｌ、５．３６ｇのＤｉｆｃｏ酵母抽出物、５００mL水中の５．３６ｇのShefield hycase SF、並びに１１０mMのＭＰＯＳ、pH７．３、０．５５％（w/v）のグルコース及び７mMの$MgSO_4$の混合で調製）中に５０－１００倍希釈し、３０℃で振盪させながら約２０－３０時間成長させた。試料を取り出してＳＤＳ-ＰＡＧＥ分析により発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞ペレットを精製及びリフォールディングまで凍結させた。

０．５から１Ｌの発酵（６－１０gペレット）からの大腸菌ペーストを、７Ｍのグアニジン、２０mMのトリス、ｐＨ８バッファー中で１０容量（w/v）で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々０．１Ｍ及び０．０２Ｍとし、溶液を4℃で終夜撹拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸化によりブロックされた変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で４０，０００rpmで３０分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー（6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4）の３－５容量で希釈し、０．２２ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた５mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに充填した。カラムを５０mMのイミダゾール（Calbiochem, Utrol grade）を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄した。タンパク質を２５０mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、４℃で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて２８０nmにおけるその吸収により見積もった。

【０１８２】

試料を、２０mMのトリス、pH８．６、０．３MのＮａＣｌ、２．５Ｍの尿素、５mMのシステイン、２０mMのグリシン及び１mMのＥＤＴＡからなる新たに調製した再生バッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が５０～１００マイクログラム／ｍｌとなるように選択した。リフォールディング溶液を４℃で１２－３６時間ゆっくり撹拌した。リフォールディング反応はＴＦＡを最終濃度０．４％（約３のｐＨ）で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を０．２２ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度２－１０％で添加した。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、０．１％ＴＦＡの移動バッファーと１０～８０％のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。Ａ２８０吸収を持つ画分の一定分量をＳＤＳポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最も緻密であり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の折り畳みＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを含有する画分をプールし、弱い窒素流を溶液に向けながらアセトニトリルを除去した。透析又は調製バッファーで平衡化したＧ２５Superfine（Pharmacia）樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、０．１４Ｍの塩化ナトリウム及び４％のマンニトールを含む２０ｍＭのHepes、ｐＨ６．８にタンパク質を調製した。

ここで記載されるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの所定のものは、この方法を使用して成功裏に発現され精製された。

【０１８３】

実施例６：哺乳動物細胞中でのＰＲＯ９２２４０の発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現によるＰＲＯ９２２４０の潜在的なグリコシル化形態の調製を例示する。

発現ベクターとしてｐＲＫ５（１９８９年３月１５日発行のＥＰ３０７２４７を参照のこと）を用いた。場合によっては、ＰＲＯ９２２４０ＤＮＡを選択した制限酵素を持つｐＲＫ５に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてＰＲＯ９２２４０ＤＮＡを挿入させる。得られたベクターは、各々ｐＲＫ５-ＰＲＯ９２２４０と呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は２９３細胞とすることができる。ヒト２９３細胞（ATCC CCL 1573）は、ウシ胎児血清及び場合によっては栄養成分及び／又は抗生物質を添加したＤＭＥＭなどの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約１０μｇのｐＲＫ５－ＰＲＯ９２２４０ ＤＮＡを、ＶＡ ＲＮＡ遺伝子をコードする約１μｇのＤＮＡと混合し[Thimmappaya等, Cell, 31:543(1982)]、５００μｌの１ｍＭトリス－ＨＣｌ、０．１ｍＭＥＤＴＡ、０．２２７ＭＣａＣｌ$_2$に溶解させた。この混合物に、５００μｌの５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのＮａＰＯ$_4$を滴下添加し、２５℃で１０分間沈殿物を形成させた。沈殿物を懸濁し、２９３細胞に加えて３７℃で約４時間定着させた。培養培地を吸引し、２ｍｌのＰＢＳ中２０％グリセロールを３０秒間添加した。２９３細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約５日間インキュベートした。

形質移入の約２４時間後、培養培地を除去し、培養培地（単独）又は２００μＣｉ／ｍｌ$^{35}$Ｓ－システイン及び２００μＣｉ／ｍｌ$^{35}$Ｓ－メチオニンを含む培養培地で置換した。１２時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、１５％ＳＤＳゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの存在を現すとして選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【０１８４】

これに換わる技術において、ＰＲＯ９２２４０は、Somparyrac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載された硫酸デキストラン法を用いて２９３細胞に一過的に導入される。２９３細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、７００μｇのｐＲＫ５－ＰＲＯ９２２４０ＤＮＡを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、ＰＢＳで洗浄した。ＤＮＡ－デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を２０％グリセロールで９０秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、５μg/mlウシインシュリン及び０．１μｇ/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約４日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたＰＲＯ９２２４０を含む試料を濃縮し、透析及び／又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

他の実施態様では、ＰＲＯ９２２４０をＣＨＯ細胞で発現させることができる。ｐＲＫ５－ＰＲＯ９２２４０は、ＣａＰＯ$_4$又はＤＥＡＥ－デキストランなどの公知の試薬を用いてＣＨＯ細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（単独）又は$^{35}$Ｓ-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの存在を判定した後、培養培地を無血

清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約６日間インキュベートし、ついで条件培地を収集する。ついで、発現されたＰＲＯ９２２４０を含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

【０１８５】

また、エピトープタグＰＲＯ９２２４０は、宿主ＣＨＯ細胞において発現させてもよい。ＰＲＯ９２２４０は、ｐＲＫ５ベクターからサブクローニングした。サブクローン挿入物は、ついで、ＰＣＲを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-Ｈｉｓタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-Ｈｉｓタグ ＰＲＯ９２２４０挿入物は、ついで、安定なクローンの選択のためのＤＨＦＲ等の選択マーカーを含むＳＶ４０誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、ＣＨＯ細胞をＳＶ４０誘導ベクターで（上記のように）形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-Ｈｉｓタグ ＰＲＯ９２２４０を含む培養培地は、次いで濃縮し、$Ni^{2+}$－キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

また、ＰＲＯ９２２４０は、一過性発現法によって、ＣＨＯ及び／又はＣＯＳ細胞中で、あるいは他の安定な発現法によってＣＨＯ細胞中で発現させることもできる。

ＣＨＯ細胞における安定な発現は，以下の方法を用いて実施することが可能である。タンパク質を、各タンパク質の可溶形態のコード化配列（例えば、細胞外ドメイン）がヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ２ドメインを含むＩｇＧ１定常領域配列に融合したＩｇＧ作成物（イムノアドヘシン）及び／又はポリ-Ｈｉｓタグ形態として発現する。

ＰＣＲ増幅に続いて、それぞれのＤＮＡを、Ausubel等，Current Protocols of Molecular Biology，Unit 3.16，John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてＣＨＯ発現ベクターにサブクローニングした。ＣＨＯ発現ベクターは、対象とするＤＮＡの５’及び３’に適合する制限部位を有し、ｃＤＮＡの便利なシャトル化(Shuttling)ができるように作製される。ベクターは、Lucas等，Nucl. Acids Res. 24: 9，1774-1779 (1996)に記載されたようにＣＨＯ細胞での発現を用い、対象とするｃＤＮＡ及びジヒドロフォレートレダクターゼ（ＤＨＦＲ）の発現の制御にＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを用いる。ＤＨＦＲ発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドＤＮＡの１２マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen)，Dosper(登録商標)及びFugene(登録商標)（Boehringer Mannheim）を用いいて約一千万のＣＨＯ細胞に導入した。細胞は、上掲のLucas等に記載されているように成長させた。約$3\times10^{7}$細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

【０１８６】

プラスミドＤＮＡを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を１０mLの媒質を含む遠心管にピペットして、１０００rpmで５分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を１０mLの選択培地（０．２μm濾過ＰＳ２０、５％の０．２μm透析濾過ウシ胎児血清を添加）中に懸濁させた。次いで細胞を９０mLの選択培地を含む１００mlスピナーに分けた。１－２日後、細胞を１５０mLの選択成長培地を満たした２５０mLスピナーに移し、３７℃でインキュベートした。さらに２－３日後、２５０mL、５００mL及び２０００mLのスピナーを$3\times10^{5}$細胞/mLで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なＣＨＯ培地を用いてもよいが、実際には１９９２年６月１６日に発行された米国特許第５１２２４６９号に記載された生産培地を使用した。３Ｌの生産スピナーを$1.2\times10^{6}$細胞/mLで播種した。０日目に、細胞数とｐＨを測定した。1日目に、スピナーをサンプリングし、濾過空気での散布を実施した。２日目に、スピナーをサンプリングし、温度を３３℃に変え、５００g/Lのグルコース及び０．６mLの１０％消泡剤（例えば３５％ポリジメチルシロキサンエマルション、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion）の３０mLとした。生産を通して、ｐＨは７．２近傍に調節し維持した。１０日後、又は生存率が７０％を下回るまで、細胞培

地を遠心分離で回収して０．２２μmフィルターを通して濾過した。濾過物は、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

ポリ-Ｈｉｓタグ作成物について、タンパク質はＮｉ－ＮＴＡカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に５ｍＭの濃度まで添加した。条件培地を、０．３ＭのＮａＣｌ及び５ｍＭイミダゾールを含む２０ｍＭのHepes、ｐＨ７．４バッファーで平衡化した６ｍｌのＮｉ－ＮＴＡカラムに４－５ｍｌ／分の流速で４℃においてポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を０．２５Ｍイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて１０ｍＭのHepes、０．１４ＭのＮａＣｌ及び４％のマンニトール、ｐＨ６．８を含む貯蔵バッファー中で２５ｍｌのＧ２５Superfine（Pharmacia）カラムを用いて脱塩し、－８０℃で貯蔵した。

イムノアドヘシン（Ｆｃ含有）作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、２０ｍＭのリン酸ナトリウムバッファー、ｐＨ６．８で平衡化した５ｍｌのプロテインＡカラム（Pharmacia）にポンプ供給した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、１００ｍＭのクエン酸、ｐＨ３．５で溶離した。溶離したタンパク質は、１ｍｌの画分を２７５μＬの１Ｍトリスバッファー、ｐＨ９を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Ｈｉｓタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はＳＤＳポリアクリルアミドゲルで試験し、エドマン（Edman）分解によりＮ末端アミノ酸配列決定した。

ここに開示されるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの所定のものは、この方法を使用して成功裏に発現され精製された。

【０１８７】

実施例７：酵母中でのＰＲＯ９２２４０の発現

以下の方法は、酵母中でのＰＲＯ９２２４０の組換え発現を記述する。

第１に、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからのＰＲＯ９２２４０の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。ＰＲＯ９２２４０をコードするＤＮＡ及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してＰＲＯ９２２４０の細胞内発現を指示する。分泌のために、ＰＲＯ９２２４０をコードするＤＮＡを選択したプラスミドに、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターをコードするＤＮＡ、天然ＰＲＯ９２２４０シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌アルファ因子又は転化酵素分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）ＰＲＯ９２２４０の発現のためのリンカー配列と共にクローニングすることができる。

酵母菌株ＡＢ１１０等の酵母菌は、ついで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、１０％トリクロロ酢酸での沈降及びＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換えＰＲＯ９２２４０は、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。ＰＲＯ９２２４０を含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

ここに開示されるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの所定のものは、この方法を使用して成功裏に発現され精製された。

【０１８８】

実施例８：バキュロウイルス感染昆虫細胞中でのＰＲＯ９２２４０の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるＰＲＯ９２２４０の組換え発現を示す。

ＰＲＯ９２２４０をコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-Ｈｉｓタグ及び免疫グロブリンタグ（ＩｇＧのＦｃ領域など）を含む。ｐＶＬ１３９３（Navagen）などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いるこ

とができる。簡単に述べると、ＰＲＯ９２２４０コード化配列，又はＰＲＯ９２２４０のコード化配列の所望する部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列が、５’及び３’領域に相補的なプライマーでのＰＣＲにより増幅される。５’プライマーは、隣接する（選択された）制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、ついで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold$^{TM}$ ウイルスＤＮＡ（Pharmingen）を、Spodoptera frugiperda（「Ｓｆ９」）細胞（ATCC CRL 1711）中にリポフェクチン（GIBCO-BRLから市販）を用いて同時形質移入することにより作成される。２８℃で４－５日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等，Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

【０１８９】

次に、発現されたポリ-ＨｉｓタグＰＲＯ９２２４０は、例えばＮｉ$^{2+}$－キレートアフィニティクロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert等，Nature，362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えＳｆ９細胞から調製した。簡単には、Ｓｆ９細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー（２５ｍＭのHepes、ｐＨ７．９；１２．５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$；０．１ｍＭのＥＤＴＡ；１０％グリセロール；０．１％のNP-40；０．４ＭのＫＣｌ）中に再懸濁し、氷上で２回２０秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清をローディングバッファー（５０ｍＭリン酸塩、３００ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ７．８）で５０倍希釈し、０．４５μｍフィルターで濾過した。Ｎｉ$^{2+}$－ＮＴＡアガロースカラム（Qiagenから市販）を５ｍＬの総容積で調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬのローディングバッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分０．５mLでカラムに充填した。カラムを、分画回収が始まる点であるＡ$_{280}$のベースラインまでローディングバッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー（50mMリン酸塩；300mMのＮａＣｌ、10%グリセロール、pH6.0）で洗浄した。Ａ$_{280}$のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で０から５００ｍＭイミダゾール勾配で展開した。１mLの分画を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び銀染色又はアルカリホスファターゼ（Qiagen）に複合したＮｉ$^{2+}$－ＮＴＡでのウェスタンブロットで分析した。溶離したＨｉｓ$_{10}$－タグＰＲＯ９２２４０を含む画分をプールしてローディングバッファーで透析した。

あるいは、ＩｇＧタグ（又はＦｃタグ）ＰＲＯ９２２４０の精製は、例えば、プロテインＡ又はプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

ここに開示されるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの所定のものは、この方法を使用して成功裏に発現され精製された。

【０１９０】

実施例９：ＰＲＯ９２２４０に結合する抗体の調製

この実施例は、ＰＲＯ９２２４０に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。使用することができる免疫原には、精製ＰＲＯ９２２４０、ＰＲＯ９２２４０を含む融合タンパク質、及び細胞表面上に組換えＰＲＯ９２２４０を発現する細胞が含まれる。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくなすことができる。

Ｂａｌｂ／ｃ等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に１－１００マイクログラムで注入したＰＲＯ９２２４０免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（Ribi Immunochemical Researh, Hamilton, MT）

に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで１０から１２日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗ＰＲＯ９２２４０抗体の検出のためのＥＬＩＳＡアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ（陽性）」な動物に、ＰＲＯ９２２４０の静脈内注射の最後の注入をすることができる。３から４日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を（３５％ポリエチレングリコールを用いて）、ＡＴＣＣから番号ＣＲＬ１５９７で入手可能なＰ３Ｘ６３ＡｇＵ．１等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む９６ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

【０１９１】

ハイブリドーマ細胞は、ＰＲＯ９２２４０に対する反応性についてのＥＬＩＳＡでスクリーニングされる。ＰＲＯ９２２４０に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ（陽性）」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のＢａｌｂ／ｃマウスに腹腔内注入し、抗ＰＲＯ９２２４０モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインＡ又はプロテインＧへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【０１９２】

実施例１０：特異的抗体を用いたＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの精製

天然又は組換えＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、対象のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインＡ(Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.)での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインＡでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、ＣｎＢｒ-活性化セファロースTM(Pharmacia LKB Biotechnology)等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはＰＲＯ９２２４０ポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下(例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー)で洗浄される。ついで、カラムは、抗体／ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド結合を分解する条件下(例えば、約２－３といった低ｐＨ、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロープ)で溶離され、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドが回収される。

【０１９３】
実施例１１：インビトロでの腫瘍細胞死滅アッセイ
対象のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を、標準的な発現ベクター及びクローニング法を使用して得る。あるいは、対象のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する多くの腫瘍細胞株は例えばＡＴＣＣから公的に入手可能であり、標準的なＥＬＩＳＡ又はＦＡＣＳ分析法を使用して常套的に同定することができる。ついで抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドモノクローナル抗体（及びその毒素コンジュゲート誘導体）をアッセイで用いて、ＰＲＯ９２２４０ポリペプチド発現細胞を死滅させるインビトロでの抗体の能力を定量することができる。
例えば、対象のＰＲＯ９２２４０ポリペプチドを発現する細胞を上述のようにして得て、９６ウェルの皿に蒔く。一分析例では、抗体／毒素コンジュゲート（又は裸の抗体）を４日の期間の細胞インキュベーションの間、含ませる。第二の独立の分析例では、細胞を抗体／毒素コンジュゲート（又は裸の抗体）と共に１時間インキュベートし、ついで洗浄して、４日の期間、抗体／毒素コンジュゲートの不存在下でインキュベートする。ついで、細胞生存度を、PromegaのCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay（カタログ番号G７５７１）を使用して測定する。未処理細胞はネガティブコントロールになる。
【０１９４】
実施例１２：インビボでの腫瘍細胞死滅アッセイ
コンジュゲート又は未コンジュゲート抗ＰＲＯ９２２４０ポリペプチドモノクローナル抗体の効能を検査するために、横腹に腫瘍促進細胞を皮下投与する２４時間前に抗ＰＲＯ９２２４０抗体をヌードマウスに腹腔内注射した。抗体の注射を毎週２回、実験が終わるまで続ける。ついで、腫瘍体積を毎週２回測定する。
【０１９５】
上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した実施物は、本発明のある側面の一つの例示として意図されており、機能的に等価なあらゆるコンストラクトがこの発明の範囲内にあるため、寄託されたコンストラクトにより、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の特許請求の範囲内に入るものである。
【図面の簡単な説明】
【０１９６】
【図１】天然配列ＰＲＯ９２２４０ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１）を示し、ここで配列番号１は本明細書で「ＤＮＡ３４０５３５」と命名するクローンである。
【図２Ａ】図１に示す配列番号１のコード化配列由来のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。
【図２Ｂ】図１に示す配列番号１のコード化配列由来のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。
【図３】様々な癌（例えば肺癌、乳癌及び卵巣癌）と対応する正常な非癌性組織におけるＰＲＯ９２２４０の発現を示す。甲状腺腫瘍よりも正常な甲状腺における発現が大きいことが分かる。
【図４】単球／マクロファージ分化におけるＰＲＯ９２２４０の発現を示す。

【図１】

## FIGURE 1

GAGGTTCTAGGGCAGCAAGGTTTGAGCACAGGTGGGCACTGAAGGACCAGCGGGATCTAC
CCGGGTACCAAAAAGGTAACCCGGCCAAGTTTCCAGATGAGGTAGACAAGGTTTCTTCCT
CAGCCAGGGCCTCGCCTGGTAGTTTGAACAATTCTAGTAGAGAGAAAGGATGGACAACAA
GGGGAGAGGAGAGGAGAAGCAGCCTGACCAAGGATGCTGTTACCTTCCAGAGCAGTCTC
CCTGTCCAGATCACCAGGATCCCTGCTTGCTGGAGAATGACCCAGATGTCCCAGGTGCAG
GAGCTCTTCCATGAGGCAGCCCAGCAGGATGCCCTGGCCCAGCCCCAGCCCTGGTGGAAG
ACCCAGCTGTTCATGTGGGAGCCTGTGCTGTTTGGGACCTGGGATGGTGTGTTCACATCC
TGCATGATCAACATCTTTGGGGTTGTGCTCTTCCTGAGGACTGGCTGGCTGGTGGGAAAC
ACAGGAGTGCTCCTGGGCATGTTCCTGGTGTCCTTCGTCATCCTGGTGGCCCTCGTCACG
GTGCTGTCTGGCATTGGCGTCCGGGAGCGCAGCAGCATCGGCAGCGGTGGCGTCTACTCC
ATGATCTCCTCGGTCCTGGGTGGGCAGACGGGAGGCACCATCGGGCTGCTCTATGTGTTT
GGACAGTGTGTTGCAGGTGCCATGTATATCACCGGCTTTGCTGAATCCATCTCGGATTTG
CTGGGCCTCGGGAATATCTGGGCTGTGCGAGGAATTTCAGTTGCGGTGCTTCTGGCCTTG
CTGGGCATTAACCTCGCAGGTGTCAAATGGATAATCCGCCTCCAGCTGCTGTTGCTGTTC
CTGCTGGCCGTGTCCACACTGGACTTTGTGGTGGGTTCTTTCACCCACCTGGACCCAGAA
CATGGTTTCATTGGATATTCACCCGAACTGCTACAGAACAACACGCTGCCCGATTACAGC
CCGGGGGAATCTTTTTTTCACTGTCTTTGGGGTTTTCTTCCCAGCGGCTACAGGAGTCATG
GCCGGCTTCAACATGGGGGGCGACCTCAGGGAGCCTGCCGCCAGCATTCCCCTGGGCTCC
CTGGCAGCTGTTGGCATCTCGTGGTTTCTGTACATCGTCTTCGTCTTCCTCCTGGGCGCC
ATCTGCACTCGAGAGGCCCTTCGCTATGACTTCCTGATAGCGGAAAAGGTATCCCTCATG
GGCTTCCTGTTCCTTTTGGCTTATACATCTCGTCCGTGGCTTCCTGCATGGGAGGACTT
TATGGAGCTCCCCGCATCCTGCAGTGCATTGCCCAGGAGAAGTGATCCCTGCACTTGCC
TGTCTGGGACAAGGGAAGGGGCCAAACAAAACACCCGTGGCTGCCATCTGCCTGACCAGC
TTGGTGACCATGGCCTTTGTTTTTGTGGGTCAAGTGAACGTTCTGGCCCCCATCGTCACC
ATCAACTTCATGCTGACATACGTTGCAGTGGACTACTCTTACTTCTCCCTGTCCATGTGT
TCCTGCAGCCTGACCCCGGTGCCTGAGCCGGTGCTCAGGGAGGGCGCAGAAGGCCTCCAC
TGCTCTGAGCACCTGCTCTTAGAGAAAGCTCCCAGTTACGGCTCTGAGGGACCTGCCCAA
AGAGTCTTGGAGGGCACGCTACTGGAATTCACCAAGGACATGGATCAGCTCCTCCAGCTA
ACCAGGAAGCTTGAGAGTAGCCAGCCCAGGCAAGGAGAGGGTAACAGGACCCCAGAAAGT
CAGAAGAGGAAAAGCAAGAAGGCCACCAAGCAGACCCTACAAGATAGCTTCCTCTTGGAC
CTCAAATCCCCTCCTTCTTTCCCTGTCGAGATCTCTGACAGGTTGCCCGCTGCCTCCTGG
GAGGGCAGGAGTCCTGCTGGAACAAGCAGACTTCCAAGAGCGAAGGACTCAGCCTGAG
GGAACATATGGAGAGCAACTTGTTCCTGAGCTGTGCAACCAATCAGAGTCCAGTGGAGAA
GATTTCTTCCTGAAGTCCAGGCTCCAAGAACAAGATGTCTGGAGAAGATCCACTTCTTTC
TATACCCACATGTGCAACCCCTGGGTCTCCCTGTTGGGGGCTGTTGGGTCCCTTCTCATC
ATGTTTGTGATACAGTGGGTGTATACCCTGGTTAACATGGGTGTTGCTGCCATCGTGTAT
TTCTACATTGGCCGGGCCAGTCCAGGGCTTCACCTTGGATCAGCCTCCAACTTCAGCTTT
TTCCGGTGGATGAGGTCTCTCTTGCTCCCTCCTGCAGGAGCTTGCGGTCCCCTCAGGAG
CAGATCATCTTGGCGCCGTCCCTGGCTAAGGTTGACATGGAGATGACTCAGCTCACCCAG
GAGAATGCAGACTTCGCCACTCGGGATCGCTACCACCACTCCTCCCTCGTGAACCGGGAG
CAGCTGATGCCTCACTACTAGATGCAGTGCTGGGACCTTCCTCTTTTGGAGCTGTCCCAT
GTACAGTGGACCCAAGCTCAGGACCTTCGTGGAGCTGCTTCTCCAACCTGAGAAACTCAA
GACCCATCCTCCCGCTGTCACTTTGGACAATGGAAATCTACATTTTCTTTCCCTTTTTT
TTTTTTTTTGAGACAGAGTCTCGCCCTGTCACCCAGGCTGGAGTCCAGTGGCACAATCTT
GGCTCACTGCAACCTCTGCTTCCCGAGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGT
AGCTGGGATTATAGGCATGCACCACCACACCCAGCTATTTTTGTATTTTTACTGGAGAC
AGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCGTGATCCACCCGTCT
CAGCCTCCCAAAGTACTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCATGCCTGGCCAGAAATCTATG
TTTTCTTAGAACATGTGGAGAAGGAAAAAGGCAAAAAGGAAATCTGGATTCTGAGGAC
CACGTCTCACCCAGGGTGACATCAGGAATGGTGCTAGCCTCTGCAACACGACACCCAGTC
TGAAGAGCTCTATACAGGTACTAAGACTAGCAGGGGACACCAAGACTCTGCACAACCAGA
TTGCTTGTGCAGAGGCCACAATAAGTGTATGTTTTATATTTTATTGTATTATTTATTCA
AAAATAAATAATACACTCACATGTTTCCACACCC

【図２Ａ】

## FIGURE 2A

MTQMSQVQELFHEAAQQDALAQPQPWWKTQLFMWEPVLFGTWDGVFTSCMINIFGVVLFL
RTGWLVGNTGVLLGMFLVSFVILVALVTVLSGIGVGERSSIGSGGVYSMISSVLGGQTGG
TIGLLYVFGQCVAGAMYITGFARSISDLLGLGNIWAVRGISVAVLLALLGINLAGVKWII
KLQLLLLFLLAVSTLDFVVGSFTHLDPEHGFIGYSPELLQNNTLPDYSPGESFFTVFGVF
FPAATGVMAGFNMGGDLRSPAASIPLGSLAAVGISWFLIYIVFVFLLGAICTREALKYDFL
IAREVSLMGFLFLLGLYISSLASCMGGLYGAPRILQCIAQEKVIPALACLGQGKGPNKTP
VAAICLTSLVTMAFVFVGQVNVLAPIVTINFMLTYVAVDYSYFSLSMCSCSLTPVPEPVL
RSGAEGLHCSEHLLLEKAPSYGSEGPAQRVLEGTLLEFTKDMDQLLQLTRKLESSQFRQG
EGNRTPESQKSKSKKATKQTLQDSFLLDLKSPPSFPVEISDRLPAASWEGQESCWNKQTS
KSEGTQPEGTYGSQLVPELCNQSESSGEDFFLKSRLQEQDVNRRSTSFYTHMCNPWVSLL
GAVGSLLIMFVIQWYYTLVNNKVAAIVVFYIGRASPGLHLGSASWFSFPRWMRSLLLPSC
RSLRSPQSQIILAPSLAKVDMENTQLTQENADFATRDRYHHSSLVNREQLMPHY

Signal sequence
none

Transmembrane domain

36-56
70-90
111-131
150-170
179-199
227-247
266-286
302-322
367-387
593-613

N-glycosylation site.

221-224
561-564
645-648

Glycosaminoglycan attachment site.

91-94

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site.

490-493
494-497
583-586

【図２Ｂ】

## FIGURE 2B

N-myristoylation site.

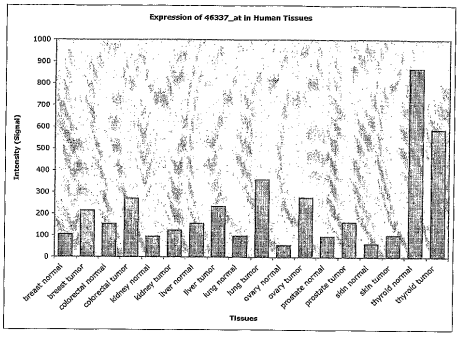
40-45
44-49
70-75
92-97
104-109
115-119
116-121
119-124
129-134
152-157
159-164
170-175
246-251
267-272
287-292
315-320
326-331
426-431
530-535
601-606
637-642
641-646

Leucine zipper pattern.

300-321
307-328
314-335

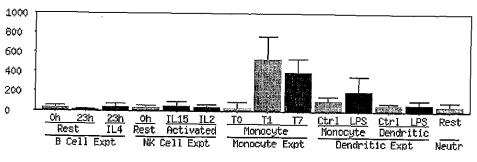
【図３】

## FIGURE 3




【図４】

## FIGURE 4



【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/09992

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC(7) : G01N 33/53; C12P 21/06; C12N 15/00, 5/00; C07H 21/04; C07K 17/00, 16/00; A61K 49/00, 39/00
US CL : 435/7.1, 69.1, 320.1, 325; 536/23.5; 530/350, 387.1; 424/9.1, 184.1

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)
U.S. : 435/7.1, 69.1, 320.1, 325; 536/23.5; 530/350, 387.1; 424/9.1, 184.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenEmbl, GenSeq, Patent Sequence Databases, PIR, SwissProt

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X<br>---<br>Y | GenEmbl Database, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH (Bethesda, MD, USA) Accession No. AF390442, 02 July 2002; DNA encoding SEQ ID No:2. | 1-3, 10-11<br>---<br>5-9, 14-15 |
| X<br>---<br>Y | Genseq Database, Derwent (London, UK) Accession No. ABX56570, 17 October 2002, DNA encoding SEQ ID No:2. | 1-3, 10-11<br>---<br>4-9, 14-15 |
| X | WO 02/080842 A2 (ESTETE-CON AB) 17 October 2002 (17.10.2002), abstract, entire article; in combination with Accession No. ABX56570 above. | 1-3, 5-20, 23, 25-27, 29 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family 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 application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" 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 March 2004 (25.03.2004) | 02 APR 2004 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (703) 305-3230 | Authorized officer<br>Gary B. Nickol Ph.D.<br>Telephone No. (703) 308-0196 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *C12P 21/02* | *(2006.01)* | C12P | 21/02 | C | 4C084 |
| *C07K 14/82* | *(2006.01)* | C07K | 14/82 | | 4C085 |
| *C07K 16/32* | *(2006.01)* | C07K | 16/32 | | 4C086 |
| *C12Q 1/68* | *(2006.01)* | C12Q | 1/68 | A | 4H045 |
| *A61K 39/395* | *(2006.01)* | A61K | 39/395 | E | |
| *A61K 45/00* | *(2006.01)* | A61K | 39/395 | T | |
| *A61K 48/00* | *(2006.01)* | A61K | 45/00 | | |
| *A61K 38/00* | *(2006.01)* | A61K | 48/00 | | |
| *A61K 31/7088* | *(2006.01)* | A61K | 37/02 | | |
| *A61P 35/00* | *(2006.01)* | A61K | 31/7088 | | |
| *A61P 43/00* | *(2006.01)* | A61P | 35/00 | | |
| *A61P 29/00* | *(2006.01)* | A61P | 43/00 | 105 | |
| *A61P 17/00* | *(2006.01)* | A61P | 29/00 | | |
| *A61P 19/02* | *(2006.01)* | A61P | 17/00 | | |
| *A61P 17/06* | *(2006.01)* | A61P | 19/02 | | |
| *A61P 21/00* | *(2006.01)* | A61P | 17/06 | | |
| *A61P 9/00* | *(2006.01)* | A61P | 21/00 | | |
| *A61P 7/06* | *(2006.01)* | A61P | 9/00 | | |
| *A61P 7/00* | *(2006.01)* | A61P | 7/06 | | |
| *A61P 5/14* | *(2006.01)* | A61P | 7/00 | | |
| *A61P 3/10* | *(2006.01)* | A61P | 5/14 | | |
| *A61P 13/12* | *(2006.01)* | A61P | 3/10 | | |
| *A61P 25/00* | *(2006.01)* | A61P | 13/12 | | |
| *A61P 31/04* | *(2006.01)* | A61P | 25/00 | | |
| *A61P 1/16* | *(2006.01)* | A61P | 31/04 | | |
| *A61P 1/00* | *(2006.01)* | A61P | 1/16 | | |
| *A61P 37/02* | *(2006.01)* | A61P | 1/00 | | |
| *A61P 37/08* | *(2006.01)* | A61P | 37/02 | | |
| *A61P 11/06* | *(2006.01)* | A61P | 37/08 | | |
| *G01N 33/53* | *(2006.01)* | A61P | 11/06 | | |
| *G01N 33/574* | *(2006.01)* | G01N | 33/53 | D | |
| *G01N 33/50* | *(2006.01)* | G01N | 33/574 | A | |
| *G01N 33/15* | *(2006.01)* | G01N | 33/50 | Z | |
| *A61P 37/06* | *(2006.01)* | G01N | 33/15 | Z | |
| | | A61P | 37/06 | | |

(72)発明者 クラーク, ヒラリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１３４, サン フランシスコ, ハークネス アベニュー ４９５
(72)発明者 ヘルデンス, シェリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１１６, サン フランシスコ, ２４番 アベニュー ２４５４
(72)発明者 イー, ソジィー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５０１, アラメダ, ピー. オー. ボックス ４０１

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA12 BA41 CA01 DA02 DA06 DA12 FA20 GA11 HA12 HA15

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4B063 | QA19 | QQ02 | QQ08 | QQ53 | QQ79 | QQ96 | QR32 | QR48 | QR55 | QS32 |
| | QX01 | | | | | | | | | |
| 4B064 | AG01 | CA02 | CA06 | CA19 | CC24 | DA05 | DA14 | | | |
| 4B065 | AA26X | AA72X | AA91X | AB01 | AC14 | BA02 | CA24 | CA25 | CA44 | CA46 |
| 4C084 | AA02 | AA06 | AA07 | AA13 | AA17 | BA01 | BA08 | BA19 | BA20 | BA22 |
| | BA23 | CA27 | MA01 | NA14 | ZA012 | ZA362 | ZA512 | ZA552 | ZA592 | ZA662 |
| | ZA752 | ZA812 | ZA892 | ZA942 | ZA962 | ZB072 | ZB112 | ZB132 | ZB152 | ZB212 |
| | ZB262 | ZB352 | ZC062 | ZC352 | | | | | | |
| 4C085 | AA13 | AA14 | AA16 | BB01 | CC32 | DD88 | EE01 | GG01 | | |
| 4C086 | AA01 | AA02 | AA03 | AA04 | EA16 | MA01 | MA04 | NA14 | ZA01 | ZA36 |
| | ZA51 | ZA55 | ZA59 | ZA66 | ZA75 | ZA81 | ZA89 | ZA94 | ZA96 | ZB07 |
| | ZB11 | ZB13 | ZB15 | ZB21 | ZB26 | ZB35 | ZC06 | ZC35 | | |
| 4H045 | AA10 | AA11 | AA30 | BA10 | CA41 | DA76 | EA28 | EA51 | FA74 | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 用于诊断和治疗肿瘤的组合物和方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2007521791A | 公开(公告)日 | 2007-08-09 |
| 申请号 | JP2004571401 | 申请日 | 2003-04-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 健泰科生物技术公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Genentech公司 | | |
| [标]发明人 | ボールドウィンダリルティー<br>クラークヒラリー<br>ヘルデンスシェリー<br>イーソジィー | | |
| 发明人 | ボールドウィン, ダリル, ティー.<br>クラーク, ヒラリー<br>ヘルデンス, シェリー<br>イー,ソジィー | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/82 C07K16/32 C12Q1/68 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61K38/00 A61K31/7088 A61P35/00 A61P43/00 A61P29/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P21/00 A61P9/00 A61P7/06 A61P7/00 A61P5/14 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/00 A61P31/04 A61P1/16 A61P1/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P11/06 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/50 G01N33/15 A61P37/06 A61K A61K39/00 A61K49/00 C07H21/04 C07K14/47 C07K16/00 C07K17/00 C12N5/00 C12N15/00 C12P21/06 | | |
| CPC分类号 | A61P1/00 A61P1/16 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/4748 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K14/82 C07K16/32 C12Q1/68.A A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61K37/02 A61K31/7088 A61P35/00 A61P43/00.105 A61P29/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P21/00 A61P9/00 A61P7/06 A61P7/00 A61P5/14 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/00 A61P31/04 A61P1/16 A61P1/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P11/06 G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61P37/06 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA27 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA362 4C084/ZA512 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB352 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/CC32 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA36 4C086/ZA51 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB35 4C086/ZC06 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及可用于在哺乳动物中诊断和治疗肿瘤的物质组合物，并涉及将那些物质组合物用于哺乳动物的方法。

【図４】

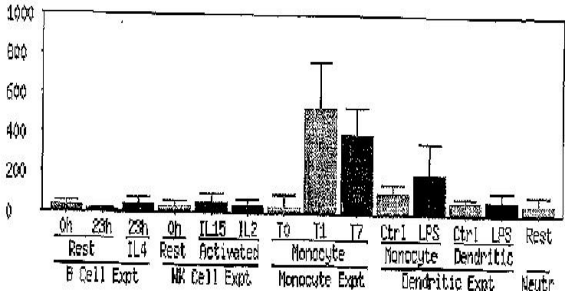



FIGURE 4