

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-314327

(P2006-314327A)

(43) 公開日 平成18年11月24日(2006.11.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C12N 9/64 (2006.01)	C12N 9/64 A	4B050
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B065
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00 H	4C085
審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-201247 (P2006-201247)	(71) 出願人	506252705
(22) 出願日	平成18年7月24日 (2006.7.24)		ハイブリテック インコーポレイティド
(62) 分割の表示	特願平8-533497の分割		アメリカ合衆国, カリフォルニア 921
原出願日	平成8年5月2日 (1996.5.2)		26-9006, サンディエゴ, トレーヤ
(31) 優先権主張番号	08/427,767		ナロード 11095
(32) 優先日	平成7年5月2日 (1995.5.2)	(71) 出願人	598091963
(33) 優先権主張国	米国 (US)		マヨ ファウンデーション フォー メデ
(31) 優先権主張番号	08/622,046		イカル エデュケーション アンド リサ
(32) 優先日	平成8年3月26日 (1996.3.26)		ーチ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 55905 ミネソタ州
			, ロチェスター, ファースト ストリート
			サウス ウェスト 200
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定HK2ポリペプチド変異体

(57) 【要約】

【課題】 hK2ポリペプチド変異体をコードする単離された核酸分子を提供する。

【解決手段】 本発明はプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体をコードする単離された核酸分子であって、野生型hK2ポリペプチドと比べて少なくとも1個のアミノ酸置換を有し、そしてそのポリペプチド変異体が野生型hK2ポリペプチドよりも精製に対してより安定である、前記核酸分子を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プレ - プロ又はプロhK2 ポリペプチド変異体をコードする単離された核酸分子であって、野生型hK2 ポリペプチドと比べて少なくとも1個のアミノ酸置換を有し、そしてこの置換がそのポリペプチド変異体を野生型成熟hK2 ポリペプチドよりも精製に対してより安定なものにする、前記核酸分子。

【請求項 2】

前記アミノ酸置換がhK2 ポリペプチド変異体の成熟形態の中に存在する、請求項 1 記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

前記アミノ酸置換がhK2 ポリペプチド変異体の成熟形態の残基40と218 との間にあり、そしてここでこの置換が基質特異性ドメイン、触媒性トリアドドメイン、主鎖基質結合ドメイン又はオキシアニオンホールドメインを含んで成る残基にある、請求項 2 記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 4】

SEQ ID NO : 3 を有するプレ - プロhK2 ポリペプチド変異体をコードする、請求項 1 記載の単離された核酸分子。

【請求項 5】

SEQ ID NO : 5 を有するプロhK2 ポリペプチド変異体をコードする、請求項 1 記載の単離された核酸分子。

20

【請求項 6】

183位のアスパラギン酸、206位のグリシン、217位のアラニン、189位のセリン、96位のアスパラギン酸、41位のヒスチジン、205位のセリン、204位のトリプトファン、187位のグリシン及び188位のアスパラギン酸より成る群から選ばれるアミノ酸置換を有するhK2 ポリペプチド変異体をコードする請求項 1 記載の単離された核酸分子。

【請求項 7】

SEQ ID NO : 4 又はSEQ ID NO : 6 を有する請求項 6 記載の単離された核酸分子。

【請求項 8】

183位のアスパラギン酸、206位のグリシン、217位のアラニン、189位のセリン、96位のアスパラギン酸、41位のヒスチジン、205位のセリン、204位のトリプトファン、187位のグリシン及び188位のアスパラギン酸より成る群から選ばれるアミノ酸置換を有する成熟hK2 ポリペプチド変異体をコードする単離された核酸分子。

30

【請求項 9】

SEQ ID NO : 1 を有する成熟hK2 ポリペプチド変異体をコードする請求項 8 記載の単離された核酸分子。

【請求項 10】

単離精製されたプレ - プロ又はプロhK2 ポリペプチド変異体であって、野生型hK2 ポリペプチドと比べて少なくとも1個のアミノ酸置換を有し、そしてこの置換がそのポリペプチド変異体に対応の野生型成熟hK2 ポリペプチドよりも精製に対してより安定なものにする、前記ポリペプチド。

40

【請求項 11】

前記アミノ酸置換がhK2 ポリペプチド変異体の成熟形態の中に存在する、請求項10記載の単離精製されたhK2 ポリペプチド変異体。

【請求項 12】

前記アミノ酸置換がhK2 ポリペプチド変異体の成熟形態の残基40と218 との間にあり、そしてここでこの置換が基質特異性ドメイン、触媒性トリアドドメイン、主鎖基質結合ドメイン又はオキシアニオンホールドメインを含んで成る残基にある、請求項11記載の単離精製されたhK2 ポリペプチド変異体。

【請求項 13】

SEQ ID NO : 3 又はSEQ ID NO : 5 を有する請求項10記載の単離精製されたhK2 ポリペ

50

プチド変異体。

【請求項14】

183位のアスパラギン酸、206位のグリシン、217位のアラニン、189位のセリン、96位のアスパラギン酸、41位のヒスチジン、205位のセリン、204位のトリプトファン、187位のグリシン及び188位のアスパラギン酸より成る群から選ばれるアミノ酸置換を有する請求項10記載の単離精製されたhK2ポリペプチド変異体。

【請求項15】

183位のアスパラギン酸、206位のグリシン、217位のアラニン、189位のセリン、96位のアスパラギン酸、41位のヒスチジン、205位のセリン、204位のトリプトファン、187位のグリシン及び188位のアスパラギン酸より成る群から選ばれるアミノ酸置換を有し、ここでこの置換はこのポリペプチド変異体を野生型成熟hK2ポリペプチドよりも精製に対して安定なものにする、単離精製された成熟hK2ポリペプチド変異体。 10

【請求項16】

SEQ ID NO : 1を有する請求項15記載の単離精製された成熟hK2ポリペプチド変異体。

【請求項17】

請求項10又は15記載の単離されたhK2ポリペプチド変異体と薬理的に許容される担体との組合せを含んで成る免疫原組成物又はワクチンであって、この免疫原組成物又はワクチンの動物への投与が前記hK2ポリペプチド変異体に対する抗体の産生を誘導する、前記組成物又はワクチン。

【請求項18】

請求項10記載のhK2ポリペプチド変異体に特異的に結合し、そしてhK3には結合しない抗体。 20

【請求項19】

hK2ポリペプチド変異体にも結合する、請求項18記載の抗体。

【請求項20】

前記野生型hK2ポリペプチドのプレ-プロ又はプロ形態にも結合する、請求項18記載の抗体。

【請求項21】

hK2ポリペプチド変異体の成熟形態には結合しない、請求項18記載の抗体。

【請求項22】

請求項15記載のhK2ポリペプチド変異体の特異的に結合し、そしてhK3には結合しない抗体。 30

【請求項23】

野生型hK2ポリペプチドの成熟形態にも結合する、請求項22記載の抗体。

【請求項24】

hK2ポリペプチド変異体のプロ形態又は野生型hK2ポリペプチドのプロ形態には結合しない、請求項22記載の抗体。

【請求項25】

hK2ポリペプチド変異体のプレ-プロ形態又は野生型hK2ポリペプチドのプレ-プロ形態には結合しない、請求項22記載の抗体。 40

【請求項26】

モノクローナル抗体である請求項18又は22記載の抗体。

【請求項27】

請求項18又は22記載の抗体を含んで成るポリクローナル抗体調製品。

【請求項28】

請求項18又は22記載の抗体より本質的に成るモノクローナル抗体調製品。

【請求項29】

請求項18又は22記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。

【請求項30】

キメラ発現ベクターであって、このベクターにより形質転換された宿主細胞により認識 50

されるコントロール配列に作用可能式に連結された請求項 1 又は 8 記載の核酸分子を含んで成り、ここでこの宿主細胞は多細胞生物に由来する、前記ベクター。

【請求項 3 1】

hK2 ポリペプチド変異体をコードする核酸分子を利用する方法であって、請求項 1 又は 8 記載の核酸分子を、キメラベクターであってこのベクターにより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作用可能式に連結された前記核酸分子を含んで成るキメラベクターにより形質転換された培養宿主細胞において発現させ、そして前記宿主細胞から前記 hK2 ポリペプチド変異体を回収することを含んで成り、ここでこの宿主細胞は多細胞生物に由来する、方法。

【請求項 3 2】

phK2 を検出又は測定するための診断キットであって、独立に包装された：

(a) hK2 のプロ形態には少なくとも結合し、そして hK3 には結合しない抗体を付加することのできる固相；及び

(b) hK2 のプロ形態に特異的に結合し、そして hK3 又は hK2 には結合しない既知量の抗体、ここでこの抗体は検出可能式にラベルされているか、又は検出可能なラベルに結合するものである；

を含むパッケージングを含んで成る前記キット。

【請求項 3 3】

phK2 を含むヒト生理学的流体サンプル中の phK2 を検出又は測定するための方法であって：

(a) ヒト phK2 に特異的に反応する一定量の精製抗体を用意する、ここでこの抗体は hK3 又は hK2 には有意に反応しない；

(b) 前記抗体を試験すべきサンプルと、この抗体の少なくとも一部と前記 phK2 の一部との間で二重複合体の形成がされるのに十分な時間接触させる；そして

(c) 前記抗体と複合した phK2 の存在又は量を検出又は測定することを含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

発明の背景

腺系カリクレインはセリンプロテアーゼのサブグループであって、特異的なポリペプチド前駆体のその生物活性形態に至る後翻訳プロセッシングに参与するサブグループである。ヒトにおいて、このファミリーのうちの 3 つの構成員が同定され、そしてその特性の一部が特性決定されている (Clements, *Endoc. Rev.*, 10, 343 (1989) ; Clements, *Mol. Cell Endo.*, 99, 1 (1994) ; Jones ら *Acta Endoc.*, 127, 481 (1992))。hK1 遺伝子は組織カリクレインタンパク質 hK1 をコードし、hK2 遺伝子は前立腺特異的腺系カリクレインタンパク質をコードし、そして hK3 遺伝子は前立腺特異的抗原タンパク質 hK3 (PSA) をコードする。mRNA のノーザンブロット分析は hK2 及び PSA の双方がヒト前立腺において主として発現されることを示し、一方 hK1 の発現は膵臓、顎下腺、腎臓及びその他の非前立腺組織において見い出されている (Chapdelaine ら、*FEBS Lett.* 236, 205 (1988) ; Youn g ら *Biochem.* 31, 818 (1992))。

【0002】

hK2 と hK3 とのエキソン間のヌクレオチド配列相同性は 80% であり、一方 hK2 と hK1 とのエキソン間のヌクレオチド配列相同性は 65% である。PSA に対する hK2 の推定アミノ酸配列相同性は 78% であり、一方 hK1 に対する hK2 の推定アミノ酸配列相同性は 57% である。更に、hK2 の推定アミノ酸配列は、hK2 がトリプシン様プロテアーゼでありうることを示唆し、一方 PSA はキモトリプシン様プロテアーゼである。

【0003】

PSA レベルは前立腺癌腫の予後指標として幅広く利用されている。しかしながら、血清中の PSA の濃度は前立腺癌 (pCa) 又は良性前立腺過形成 (BPH) を有する患者において高揚

10

20

30

40

50

しているため、PSA の高揚レベルの検出はこのような病気を区別できない。更に、PSA に対するhK2の高度の相同性はPSAのレベルを検出するのに現状利用されている抗体の特異性に対する疑問を投げかけている。循環するhK2のレベルがpCa又はBPHと無関係なら、hK2の夾雑したPSAの調製品に対して、又はhK2に対する相同性をもつPSAの領域に対して生起させた抗体は偽陽性結果をもたらさう。しかしながら、血清中のhK2のレベルの測定、及びpCa又はBPHを有する患者におけるそのレベルの関係の解明は成し遂げられていない。

【0004】

そこで、治療剤及び/又は診断剤として利用するためにhK2ポリペプチドを単離及び精製するための方法についてのニーズがある。

10

発明の概要

本発明は単離精製されたプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体を提供する。「精製」なる語は以下に記載の手順を参照することにより理解される。本発明のプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体は対応の野生型hK2ポリペプチドと比較して、少なくとも1個のアミノ酸置換を有する。更に、プレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体は対応の野生型hK2ポリペプチドよりも精製に対して安定である。本発明の好適な態様はSEQ ID NO: 3又はSEQ ID NO: 5を有する単離された均質hK2ポリペプチド変異体を含む。

【0005】

hK2の三次元モデルはアミノ酸残基217がこのタンパク質の基質特異性ドメインの一部であることを示す(Vinhhinen, *BBRC*, 204, 1251 (1994); Bridon and Dowell, *Urology*, 45, 801 (1995))。この部位でのバリンのアラニンによる保存的置換は野生型hK2に免疫学的に類似するhK2の一層安定的な形態を生み出すであろうことは驚くべき、且つ予測できないことであった。更に、hK2の基質特異性又は触媒性ドメインを構成するその他の部位でのアミノ酸の置換もタンパク質の一層安定的な形態をもたらさう。タンパク質モデリングにより推論されるこのような部位はasp 183, gly 206, ala217(基質特異性ドメイン); ser 189, asp 96, his 41(触媒性トリアド); ser 205, trp 204(主鎖基質結合性残基); 及びgly 187, asp 188(オキシアニオンホール)である。

20

【0006】

そこで、本発明の別の好適な態様は、単離精製されたプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体であって、183位のアスパラギン酸、206位のグリシン、217位のアラニン、189位のセリン、96位のアスパラギン酸、41位のヒスチジン、205位のセリン、204位のトリプトファン、187位のグリシン及び188位のアスパラギン酸より成る群から選ばれるアミノ酸置換を有する変異体を含む。

30

【0007】

更には、単離精製された成熟hK2ポリペプチド変異体であって、183位のアスパラギン酸、206位のグリシン、217位のアラニン、189位のセリン、96位のアスパラギン酸、41位のヒスチジン、205位のセリン、204位のトリプトファン、187位のグリシン及び188位のアスパラギン酸より成る群から選ばれるアミノ酸置換を有する変異体が提供される。

【0008】

本発明は更にプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体をコードする単離された核酸分子を提供する。このプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチドは野生型プレ-プロ又はプロhK2ポリペプチドと比較して少なくとも1個のアミノ酸置換を有する。更に、本発明のプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体は対応野生型hK2ポリペプチドよりも精製に対して一層安定である。本発明の別の態様は、アミノ酸置換が成熟形態のhK2ポリペプチド変異体のアミノ酸配列の中に存在しているプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチドをコードする単離された核酸分子を含む。本発明の好適な態様はSEQ ID NO: 4又はSEQ ID NO: 6を有する単離された核酸分子を含む。

40

【0009】

本発明は更に、183位のアスパラギン酸、206位のグリシン、217位のアラニン、189位のセリン、96位のアスパラギン酸、41位のヒスチジン、205位のセリン、204位のトリ

50

プトファン、187位のグリシン及び188位のアスパラギン酸より成る群から選ばれるアミノ酸置換を有する成熟hK2ポリペプチド変異体をコードする単離された核酸分子を提供する。本発明の好適な態様はSEQ ID NO : 1を有する成熟hK2ポリペプチド変異体をコードする単離された核酸分子である。

【0010】

本発明の単離精製されたhK2ポリペプチドはヒト組織又は生理学的流体に由来するサンプル中のhK2の存在を検出するための診断アッセイにおける試薬として採用できうる。例えば、単離されたhK2は、1993年7月22日提出の米国特許出願第08/096,946号に記載の通り、検出可能ラベルに結合されてhK2についての競合イムノアッセイに採用されうる。

【0011】

本発明の更なる別の態様は、薬理的に許容される担体と組合さった本発明の単離精製されたプレ-プロ、プロ又は成熟hK2ポリペプチド変異体を含んで成る免疫原組成物又はワクチンである。この免疫原組成物又はワクチンの動物への投与はhK2ポリペプチド変異体に結合する抗体の産生を誘導する。

【0012】

本発明は更に、本発明のプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体に特異的に結合し、そしてhK3に結合しない抗体を提供する。本発明の好適な態様は本発明のプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体に結合し、そして更にはhK2ポリペプチド変異体の成熟形態、野生型hK2ポリペプチドの成熟形態、又はその双方にも結合する抗体を提供する。本発明の別の好適な態様は本発明のプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチドに結合し、そして更に野生型hK2ポリペプチドのプレ-プロ又はプロ形態にも結合する抗体を含む。本発明の更に好適な態様には本発明のプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体に結合し、そしてhK2ポリペプチド変異体の成熟形態、野生型hK2ポリペプチドの成熟形態、又はこの変異体もしくは野生型hK2ポリペプチドの成熟形態には結合しない抗体を含む。

【0013】

本発明の更なる別の態様は本発明の成熟hK2ポリペプチド変異体に特異的に結合し、そしてhK3に結合しない抗体である。本発明の好適な態様は本発明の成熟hK2ポリペプチド変異体に結合し、そして野生型hK2ポリペプチドの成熟形態にも結合する抗体を含む。本発明の別の好適な態様には本発明の成熟hK2ポリペプチド変異体に特異的に結合し、そしてhK2ポリペプチド変異体のプロ形態又は野生型hK2ポリペプチドのプロ形態には結合しない抗体を含む。本発明の更なる別の好適な態様は本発明の成熟hK2ポリペプチド変異体に特異的に結合し、そしてhK2ポリペプチドのプレ-プロ形態又は野生型hK2ポリペプチドのプレ-プロ形態に結合しない抗体を含む。

【0014】

従って、本方法により製造されたhK2ポリペプチド、並びにその変異体及びサブユニットは、組織、例えば前立腺癌腫、細胞、例えば前立腺細胞系、又は流体、例えば精液もしくは血液に由来するサンプル中のhK2ポリペプチド(又は「タンパク質」)を検出及び定量するための直接又は競合アッセイを基礎として使用されうる。即ち、本発明はhK2ポリペプチドに特異的に結合するか、hK3には有意に結合しないモノクローナル又はポリクローナル抗体の集団を提供する。「有意」なる語は以下に記載の競合アッセイとの関連で定義する。これらの抗体は天然起源からそのhK2ポリペプチド結合性パートナーを精製するためのアフィニティークロマトグラフィーにおいて利用できうる。

【0015】

更にはキメラ発現系を提供する。キメラ発現ベクターはこのベクターで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作用可能式に連結された本発明のプレ-プロ、プロ又は成熟hK2ポリペプチドをコードする核酸分子を含んで成る。

【0016】

更に、hK2ポリペプチドをコードする核酸分子を利用する方法を提供する。この方法は、本発明のプレ-プロ、プロ又は成熟hK2ポリペプチド変異体をコードする核酸分子の培養宿主細胞の中での発現を含んで成る。この核酸分子は宿主細胞により認識されるコント

10

20

30

40

50

ロール配列に作用可能式に連結されている。次いでこのhK2ポリペプチド変異体を宿主細胞又は培養培地から回収する。

【0017】

本発明の更なる別の態様は phK2 を検出又は測定するための診断キットである。このキットは、別々に包装された (a) 少なくとも hK2 のプロ形態に結合し、hK3 には結合しない抗体の結合することのできる固体表層、及び (b) hK2 のプロ形態には特異的に結合するが、hK3 又は hK2 には結合しない既知量の抗体、を含むパッケージングを含んで成る。この抗体は検出可能式にラベルされているか、又は検出可能ラベルに結合する。

【0018】

本発明の更なる態様は phK2 を含むヒト生理学的流体のサンプル中の phK2 を検出又は測定するための方法にする。この方法はヒト phK2 と特異的に反応する所定量の精製抗体の用意を含んで成り、ここで前記抗体は hK3 及び hK2 には有意に反応せず、そしてここで前記抗体は固体表層に付加できるものである。これらの抗体を検査すべきサンプルと、前記抗体の少なくとも一部と前記 phK2 の一部との二重複合体の形成を可能にするのに十分な時間接触させる。次いで前記抗体と複合した phK2 の存在又は量を検出又は測定する。

10

【0019】

hK2 は分子モデリング研究と一般的に一致するトリプシン様活性を有する (Vinhinen 前掲、1994 ; Bridon and Dosell 前掲、1995)。hK2 の酵素活性は選定のアルギニンに対して特異的であり、そしてトリプシンの基質特異性とは相違する。即ち、体液中の hK2 を検出する活性系診断アッセイにおいて利用できる hK2 - 特異的基質又はインヒビターを

20

【0020】

従って、本発明は hK2 を *in vitro* で検出する方法も提供する。この方法は所定量の hK2 ポリペプチドを所定量の合成ペプチド基質と、hK2 ポリペプチドによるペプチド基質の切断を可能にするのに十分な時間接触させることを含んで成る。このペプチド基質は、hK2 が結合する部位を形成する連続アミノ酸残基を含んで成る。ペプチド基質の切断の有無又は程度を次に検出又は測定する。

【0021】

PSA はヒト血清中の ACT 及び MG と共有結合複合体を形成する (Leinonen ら、Clin. Chem., 34, 2098 (1993))。血清中の様々な形態の PSA の割合のモニター (複合化、対、非複合体) は BPH と pCa との区別において有用である (Christensson ら、J. Urol., 150, 100 (1993))。

30

【0022】

下記に示す結果は hK2 ポリペプチドも ACT 及び MG と複合体を形成することを示す。hK2 と ACT との複合体の形成は予測されず、その理由は ACT が一般にキモトリプシン様プロテアーゼのインヒビターだからである。しかしながら、hK2 は PSA とのコンホメーション的 / 構造的類似体を有することを示唆し、これはインヒビターとのその反応性を示唆する。ACT 及び MG に複合した hK2 と遊離 (未結合) hK2 とは、ヒト血清中の hK2 の主要免疫学的測定可能成分であると予測されるであろう。それ故、このような形態のモニターは pCa と BPH との区別において重要でありうる。

40

【0023】

そこで、本発明の更なる態様は血漿タンパク質との hK2 複合体形成を検出する方法である。この方法は、サンプル中で、血漿タンパク質に結合しない hK2 ポリペプチドを血漿タンパク質に結合する hK2 ポリペプチドから分離することを含んで成る。次に、血漿タンパク質に結合しない hK2 ポリペプチドの量と比較しての血漿タンパク質に結合した hK2 ポリペプチドの量を決定する。

【0024】

本発明の更なる別の態様は哺乳動物組織サンプル中の hK2 を検出又は測定するための方法である。この方法は、hK2 ポリペプチドに結合し、hK3 に結合しない所定量の試薬を哺乳動物組織細胞のサンプルと混合してこの試薬及び細胞を含んで成る二重複合体を形成す

50

ることを含んで成る。次いでサンプル中の複合体形成の有無又は程度を検出又は測定する。

【0025】

更に、サンプルにおいて高度な前立腺上皮内新形成又は前立腺癌を検出又は測定するための方法を提供する。この方法は、hK2ポリペプチドには結合するがhK3には結合しない所定量の試薬を前立腺細胞のサンプルと混合してこの試薬及び細胞を含んで成る二重複合物を形成することを含んで成る。次に、サンプル中の複合体形成の有無又は程度を検出又は測定する。

【0026】

また、哺乳動物組織細胞のサンプル中のhK2を検出するための診断キットを提供し、これは別々に(a)hK2ポリペプチドに結合しない既知量の第一試薬(ここでこの第一試薬は検出可能式にラベルされているか、又は検出可能ラベルに結合する);及び(b)hK2ポリペプチドに特異的に結合するが、hK3には結合しない既知量の第二試薬(ここでこの第二試薬は検出可能式にラベルされているか、又は検出可能ラベルに結合する);を含むパッケージングを含んで成る。

10

【0027】

本発明の更なる別の態様は哺乳動物組織細胞のサンプル中のhK2ポリペプチドを検出するための診断キットであり、これはhK2ポリペプチドに特異的に結合し、そしてhK3に結合しない既知量の試薬を含むパッケージングを含んで成り、ここでこの試薬は検出可能なラベルに検出可能式にラベルされているか、又は検出可能ラベルに結合している。

20

【0028】

本発明は更に高度な前立腺上皮内新形成又は前立腺癌を検出するための診断キットも提供し、これはhK2ポリペプチドに特異的に結合し、そしてhK3に結合しない既知量の試薬を含むパッケージングを含んで成り、ここでこの試薬は検出可能式にラベルされているか、又は検出可能ラベルに結合する。

発明の詳細な説明

PSAに対するhK2の高度なアミノ酸配列同一性、並びにhK2及びPSAの双方の発現が本質的に前立腺に制約されるという事実は、双方のタンパク質の血清濃度の測定が前立腺癌(pCa)の診断及びモニターにおいて有用でありうることを示唆する。最近、pPhK2が細菌において発現されている(Saediら、*Mol. Cell. Endoc.*, 109, 237(1995))。細菌由来のpPhK2はhK2上の非コンホメーション依存性エピトープに対する抗体を作製するのに利用できる。しかしながら、hK2の生合成に関与する工程を見きわめるため、及びhK2の完全にプロセッシングされ、且つ分泌された形態に対して特異的な抗体を得るためには、哺乳動物細胞におけるhK2の発現が必須である。

30

【0029】

本明細書において用いる語「hK2ポリペプチド」には組換プレ-プロ、プロ及び成熟hK2ポリペプチドが含まれる。成熟hK2ポリペプチドは、図1に示すアミノ酸配列を有し、そしてポリペプチド「変異体」はhK3と実質的に相同性な領域において、即ち、図1に示すバーで表示されるものでない領域においてSEQ ID NO: 12と90%以上の相同性を共有する。かかるhK2ポリペプチドは図1の成熟hK2分子と、そのポリペプチドがhK3(又はhK1)とは交差反応しないがそのポリペプチドに対して特異的に結合する抗体によっても規定されるという点で共通する抗原性機能をもつ。好ましくは、前記抗体は図1の成熟hK2分子上にも存在する抗原性部位又はエピトープと反応する。共通の抗原性機能を規定するのに有用な抗体は米国出願番号第08/096,946号に詳細され、即ち、hK2サブユニット41~56に対してin vivoで調製したポリクローナル抗血清である。

40

【0030】

「単離されたhK2核酸」は、生物学的に活性なhK2ポリペプチド又はそのフラグメント変異体をコードする、即ち、天然hK2ポリペプチドRNAもしくはDNAの非コード鎖に対して相補性である、又は前記RNAもしくはDNAとハイブリダイゼーションし、且つストリンジェンシー条件下で安定的に結合している15個より多くの、好ましくは20個以上の連続又

50

クレオチド塩基を含むRNA又はDNAである。即ち、RNA又はDNAは、核酸の天然起源にそれが通常結合している一種以上の夾雑核酸を含まず、そして好ましくは任意のその他の哺乳動物RNA又はDNAを実質的に含まない点で、単離されたものである。「それが通常結合している一種以上の夾雑起源核酸を含まず」とは、核酸が起源又は天然細胞の中に再導入されたが、異なる染色体位置にある場合、又はそうでなければ起源細胞においては通常見出しされない核酸配列が隣接している場合を含む。単離されたhK2核酸の例は、上記の図1のhK2ペプチドのhK3-相同性領域と90%以上の配列同一性を共有する生物学的に活性なhK2ポリペプチドをコードするRNA又はDNAである。hK2ポリペプチドに関して用いる「単離精製された」なる語は下記の方法論との関連で定義する。

【0031】

本明細書で用いる語「組換核酸」、即ち「組換DNA」とは、*in vitro*でその後化学的に改変され、次いで標的宿主細胞、例えば動物、植物、昆虫、酵母、菌類又は細菌起源に由来する細胞に導入されうる任意の適当な組織起源に由来する又は単離された核酸、即ちDNAに関する。起源に「由来」する組換DNAの例はhK2又はそのフラグメントもしくは変異体をコードし、そして本質的に純粋な形態で化学合成される有用なフラグメントとして同定されるDNA配列であろう。起源から「単離」されたかかるDNAの例は化学的手段により、例えば制限エンドヌクレアーゼの利用により前記起源から切除又は除去され、これによって遺伝子工学方法論により本発明における利用のために更に操作、例えば増幅されうるようになる有用なDNA配列であろう。

【0032】

従って、「組換DNA」には完全合成DNA配列、半合成DNA配列、生物起源から単離したDNA配列、及び導入RNAに由来するDNA配列、並びにそれらの混合物が含まれる。一般に、組換DNA配列はDNAの受容体である宿主標的細胞のゲノムの中に本来存在していないか、又はそのゲノムの中に存在しているが、発現しないかもしくは高度に発現しないものである。

【0033】

本明細書で用いる「キメラ」とは、ベクターが、2種以上の種に由来するDNAを含んで成るか、又は「天然」もしくは野生種では認められない態様で連結又は会合した同種由来のDNAを含んで成ることを意味する。

【0034】

本発明における形質転換のために用いる組換DNA配列は環式又は線形の二本鎖又は一本鎖であってよい。一般に、DNA配列は結果としての細胞系の中に存在する組換DNAの発現を促進するコントロール配列が隣接するコード領域を含みうるキメラDNA、例えばプラスミドDNAの形態にある。例えば、この組換DNAはそれ自体哺乳動物細胞の中で活性であるプロモーターを含んで成りうるか、又は形質転換標的であるゲノムの中に既に存在しているプロモーターを利用しうる。かかるプロモーターはCMVプロモーター、並びにSV40後期プロモーター及びレトロウイルスLTR(長期反復因子)を含む。hK2のための転写ユニットを担う組換DNA配列又はその一部とは別に組換DNAの一部は未転写であってよく、調節又は構成的機能を担う。

【0035】

「コントロール配列」は特定の宿主生物において作用可能式に連結されたコード配列の発現にとって必要なDNA配列を意味する。原核細胞にとって適当なコントロール配列は、例えばプロモーターを含み、そして任意的にオペレーター配列、更にはリボソーム結合部位を含む。真核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で知られる。

【0036】

「作用可能式に連結」とは、核酸が他の核酸配列と機能的な関係において配置されていることを意味するものと定義する。例えば、プレ配列又は分泌性リーダーのためのDNAは、ポリペプチドのためのDNAに、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されるように、作用可能式に連結されている；プロモーター又はエンハンサーは配列の

10

20

30

40

50

転写に影響を及ぼすようにコード配列に作用可能式に連結されている；又はリボソーム結合部位は翻訳を助長するように配置されたコード配列に作用可能式に連結されている。一般に、「作用可能式に連結」とは、DNA配列がつかないこと、そして分泌リーダーの場合、連続し、且つ解読相となっていることを意味する。しかしながら、エンハンサーは連続性を有さない。連結は慣用の制限部位でのライゲーションにより成し遂げられる。かかる部位がないなら、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーは慣習に従って利用される。

【0037】

hK2又はその一部のための転写ユニットを担う組換DNA配列とは別に、組換DNAの一部は非転写であってよく、調節又は構成的機能を担う。

10

【0038】

細胞の中に導入する組換DNAは更に一般に選択マーカー遺伝子もしくはリポーター遺伝子又はその双方を、形質転換しようとするつもり細胞集団から形質転換細胞を同定及び選定することを促進するために含むであろう。他方、この選択マーカーは独立のDNA断片上に担持されているか、又は共形質転換手順において利用できる。選択マーカー及びリポーター遺伝子の双方には宿主細胞の中での発現を可能にする適当な調節配列が隣接しうる。有用な選択マーカーは当業界に周知であり、そして例えば抗生物質及び除草剤耐性遺伝子、例えばneo, hpt, dhfr, bar, aroA, dapA等が含まれる。

【0039】

リポーター遺伝子は潜在的に形質転換された細胞を同定するため及び調節配列の機能を評価するために利用される。容易にアッセイ可能なタンパク質をコードするリポーター遺伝子は当業界において公知である。一般に、リポーター遺伝子は受容生物又は組織には存在しない又は発現されないが、発現が多少容易に検出可能な特性、例えば酵素活性により評価されるタンパク質をコードする遺伝子である。好適な遺伝子にはE. coli (E. coli) のTn9由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(cat)、E. coliのuidA座のベータグルクロニダーゼ遺伝子(gus)、及びほたるフォチヌス・ピラリス(Photinus pyralis)由来のルシフェラーゼ遺伝子が含まれる。リポーター遺伝子の発現は、DNAを受容細胞に導入してから適当な時間経過後にアッセイする。

20

【0040】

宿主細胞において機能的なその他の要素、例えばイントロン、エンハンサー、ポリアダニル化配列等も組換DNAの一部でありうる。かかる要素はDNAの機能にとって必須の場合又はそうでない場合があるが、転写、mRNAの安定性等に影響を及ぼすことによりDNAの向上した発現を供しうる。かかる要素は細胞内へのDNAの形質転換の最適な実施を獲得するように所望通りにDNAの中に含ませてよい。

30

【0041】

標的細胞を形質転換しうる組換DNAを構築するための一般的な方法は当業者に周知であり、そして同一の組成物及び構築方法がここで有用なDNAを作製するのに利用されうる。例えば、J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Gold Spring Harbor Laboratory Press (第2版、1989)は適当な構築方法を提供する。

【0042】

組換DNAは、例えばC. Chenら、Mol. Cell. Biol., 7, 2745 (1987)の改良リン酸カルシウム沈殿手順により、hK2をコードするcDNAを含んで成る発現ベクターによるトランスフェクションにより標的細胞の中に容易に導入し得る。トランスフェクションは例えばBRLにより供与される市販のキットを利用し、リポリフェクチンによっても成し遂げられうる。

40

【0043】

hK2ポリペプチドの発現のために適当な宿主細胞は多細胞生物に由来する。かかる宿主細胞は複雑なプロセッシング及びグリコシル化活性の発揮が可能である。原理的には、脊椎培養物又は無脊椎培養物に関係なく、あらゆる高等真核細胞培養物が本発明の実施において採用できうる。無脊椎細胞の例には植物及び昆虫細胞が含まれる。宿主、例えばスポド

50

プテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (幼虫)、エデス・エジプチ (*Aedes aegypti*) (蚊)、エデス・アルボピクトゥス (蚊)、ドロソフィラ・メラノガスター (*Drosophila melanogaster*) (ミバエ) 及びボンビクス・モリ (*Bombyx mori*) 由来の数多くのバキュロウイルス株及び変異体並びに対応の許容の昆虫細胞が同定されている。例えば Luckowら *Bio/Technology*, 6, 47 (1989); Millerら *Genetic Engineering*, J. K. Setlow 編第8巻 (Plenum Publishing, 1986) 頁 277-279; 及び Maeda ら *Nature*, 315, 592 (1985) を参照のこと。トランスフェクション用の様々なウイルス株例えばオートグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) NPV 及びボンビクス・モリ NPV の Bm-5 の L-1 変異体が公共的に入手でき、そしてかかるウイルスは好ましくはスポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのために利用されうる。

10

【0044】

制限消化に由来する DNA の所定のフラグメントの回収又は単離はポリアクリルアミド又はアガロースゲル上での電気泳動による消化物の単離、既知の分子量の DNA フラグメントマーカーのそれに対するその泳動度の対応による注目のフラグメントの同定、所望のフラグメントを含むゲル区画の取り出し、及び DNA からゲル分離を利用しうる。例えば、Lawn ら、*Nucleic Acids Res.*, 9, 6103 (1981) 及び Goeddel ら *Nucleic Acids Res.*, 8, 4057 (1980) を参照のこと。

【0045】

「サザン分析」又は「サザンプロット」は、それにより DNA 又は DNA 含有組成物の制限エンドヌクレアーゼ消化物中の DNA 配列の存在が既知のラベル化オリゴヌクレオチド又は DNA フラグメントへのハイブリダイゼーションにより確認する方法である。サザン分析は一般にアガロースゲル上での DNA 消化物の電気泳動分離、電気泳動分離後の DNA の変性、及び Sambrook ら前掲の第 9.37 - 9.52 章に記載の放射性ラベル、ピオチニル化又は酵素ラベルプローブによる分析のためのニトロセルロース、ナイロン、又はその他の適当な膜支持体への DNA の転写を包括する。

20

【0046】

「ノーザン分析」又は「ノーザンプロット」は、既知のプローブ、例えばオリゴヌクレオチド、DNA フラグメント、cDNA もしくはそのフラグメント、又は RNA フラグメントにハイブリダイズする RNA 配列を同定するために利用する方法である。このプローブは放射性アイソトープ、例えば ^{32}P により、ピオチニル化により、又は酵素によりラベルしておく。分析すべき RNA は通常アガロース又はポリアクリルアミドゲル上で電気泳動式に分離し、ニトロセルロース、ナイロン又はその他の適当な膜に転写し、そして Sambrook ら前掲の第 7.39 - 7.52 章に記載の如き当業界周知の標準技術の利用してプローブとハイブリダイズさせることができる。

30

【0047】

「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」は核酸、RNA 及び / 又は DNA の所定のフラグメントの量を米国特許第 4,683,195 号に記載の通りにして増幅させる手順又は技術を意味する。一般に、注目の領域の末端又はそれを含む配列情報をオリゴヌクレオチドプライマーをデザインするために利用する。これらのプライマーは増幅する鋳型の対立鎖と同一又は類似の配列であろう。PCR は特異的な RNA 配列、全ゲノム DNA 由来の特異的な DNA 配列、及び全細胞 RNA、バクテリオファージ又はプラスミド配列から転写した cDNA 等を増幅するために利用できる。一般的には Mullis ら、*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 263 (1987); Erlich 編 *PCR Technology* (Stockton Press, NY, 1989) を参照のこと。

40

【0048】

「ストリンジェンシー条件」とは、(1) 洗浄のために低イオン強度及び高温を利用する条件、例えば 0.015M の NaCl / 0.0015M のクエン酸ナトリウム (SSC); 0.1% のラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を 50 で利用する条件、又は (2) ハイブリダイゼーション中でホルムアミドの如き変性剤を利用する条件、例えば 50% のホルムアミドと 0.1% の牛血清アルブミン / 0.1% のフィコール / 0.1% のポリビニルピロリドン / 50mM のリン酸ナトリウムバッファー pH6.5 と 750mM の NaCl, 75mM クエン酸ナトリウムを 42 で利用する条件を

50

いう。別の例は、50%のホルムアルデヒド、5×のSSC(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、5×のデンハーツ溶液、音波処理サケ精子DNA(50 μ g/ml)、0.1%のSDS、及び10%の硫酸デキストランを42℃で使用し、0.2×のSSC及び0.1%のSDSAで42℃で洗浄する。

【0049】

hK2ポリペプチドをヒト起源、以外の組換細胞において発現するとき、hK2ポリペプチドはヒト起源のタンパク質又はポリペプチドを全く含まない。しかしながら、hK2ポリペプチドとして実質的に均質な調製品を得るため、組換細胞タンパク質又はポリペプチドからhK2ポリペプチドを精製する必要がある。例えば、培養培地又はリゼートを遠心分離して粒状細胞塊を除去してよい。次いで膜及び溶解性タンパク質画分を分離する。次にhK2ポリペプチドを可溶性タンパク質画分から、そして必要なら、培養リガートの膜画分から分離する。次いでhK2ポリペプチドは夾雑可溶性タンパク質及びポリペプチドから、イムノアフィニティー又はイオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はアニオン交換樹脂、例えばDEAEでの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；Sephadex G-75を利用するゲル濾過；リガンドアフィニティークロマトグラフィーにより精製されうる。

10

【0050】

結果としての遺伝子導入宿主細胞から単離できたなら、hK2ポリペプチドの誘導体及び変異体は容易に調製できる。例えば、本発明のhK2ポリペプチドのアミドは当業界周知の技術により、カルボン酸基又は前駆体をアミドに変換させることによっても調製し得る。C末端カルボキシル基でのアミド形成のために好適な方法はポリペプチドに固相支持体から適当なアミンにより切断すること、又はアルコールの存在下で切断してエステルにし、次いで所望のアミンでアミノ分解することである。

20

【0051】

hK2ポリペプチドのカルボキシル基の塩はペプチドを1又は数当量の所望の塩基、例えば水酸化金属系塩基、例えば水酸化ナトリウム；炭酸もしくは炭酸水素金属塩基、例えば炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム；又はアミン塩基、例えばトリエチルアミン、トリエタノールアミン等との接触により通常の方法で調製し得る。

【0052】

当該ポリペプチドのアミノ基のN-アシル誘導体は最終縮合のためにN-アシル保護化アミノ酸を利用することにより、又は保護もしくは未保護ペプチドのアシル化により調製し得る。O-アシル誘導体は例えば遊離ヒドロキシペプチド又はペプチド樹脂のアシル化により調製し得る。いずれのアシル化も標準のアシル化試薬、例えばアシルハライド、無水物、アシルイミダゾール等を利用することで実施し得る。N-及びO-アシル化は共に、所望するなら一緒に実施してよい。更に、図1の内部hK2アミノ酸配列は特定の位置のための1又は2個の保存性アミノ酸置換、例えばL形態でなくD形態を利用する置換により修飾し得る。本発明は更にhK2ポリペプチドの変異体又は修飾形態にも向けられる。抗原性機能が保持されている限り、このポリペプチドの一又は複数個の残基が保持されている。保存性アミノ酸置換、例えば酸性アミノ酸としてのアスパラギン酸-グルタミン酸；塩基性アミノ酸としてのリジン/アルギニン/ヒスチジン；疎水性アミノ酸としてのロイシン/イソロイシン、メチオニン/バリン、アラニン/バリン；親水性アミノ酸としてのセリン/グリシン/アラニン/トレオニンが好ましい。

30

40

【0053】

ポリペプチドの酸付加塩はポリペプチドを1又は数当量の所望の無機又は有機酸、例えば塩酸と接触させることにより調製し得る。ポリペプチドのカルボキシル基のエステルは当業界公知の任意の通常の方法によっても調製し得る。

【0054】

単離できたら、hK2ポリペプチド及びその抗原的に活性な変異体、その誘導体及びフラグメントを米国出願第08/096,946号に詳細に開示の通りにして、hK2又は抗hK2抗体を含むと予測される生物材料に由来するサンプルにおいてhK2についてのアッセイに利用でき

50

うる。例えば、このhK2ポリペプチドは検出可能ラベルにより、例えば1又は数種の放射性ラベル化ペプチド残基によりラベルでき、そして抗-hK2抗体に対する結合に関して内性hK2と競合するように、即ち、生理学的流体サンプル中の抗-hK2抗体に結合する「捕捉抗原」として、固定化可能な抗-hK2抗体を利用するhK2についての様々な競合イムノアッセイ方式を介して、利用できる。それは下記の通りに実施される：

- (a) 固体表層に付加できる一定量の抗-hK2抗体を用意する；
- (b) hK2を含んで成る生理学的流体サンプルを検出可能なラベルを含んで成る既知量のhK2ポリペプチドと混合し、混合サンプルを作る；
- (c) 前記抗体を前記混合サンプルと、前記抗体と前記hK2との間で抗体-hK2複合体が形成し、且つ前記抗体と前記ラベル化ポリペプチドとの間で抗体-ラベル化ポリペプチド複合体が形成されるよう、免疫学的反応が起きるのに十分な時間接触させる；
- (d) hK2に結合した抗体及びラベル化ポリペプチドに結合した抗体を前記混合サンプルから分離させる；
- (e) 前記固体表層上の抗体に結合した又は前記複合サンプルの中に残っているラベル化ポリペプチドのいずれかの存在又は量を検出又は測定する；そして
- (f) 工程(e)における結果から、前記サンプル中の前記hK2の存在又は量を決定する。

10

【0055】

競合阻害イムノアッセイによりサンプル中の内性hK2を検出できる別の方式においては、既知量の抗-hK2抗体を未知量の内性hK2を含むサンプルに加える。この既知量は、存在すると予測されるhK2の全てが複合するのに必要な量、例えば前立腺癌であることわかっていて患者から獲得した同量の生理学的流体サンプルの中に存在しているであろう量よりも少なくなるように選定する。次に、検出可能ラベルを含んで成る既知量のhK2ポリペプチド又はそのサブユニットを加える。内性hK2がサンプルの中に存在しているなら、少ない量の抗体がラベル化hK2ポリペプチドに結合し、そしてそれは溶液の中で遊離し続けるであろう。もし内性hK2がないなら、添加したラベル化ポリペプチドは添加した抗-hK2抗体と複合し、二重複合体を形成するであろう。次に、二重抗体-抗原複合体を抗哺乳動物IgG抗体(ヒツジ、ヤギ、マウス等)により沈殿させる。沈殿物(ターナリー複合体)の中の放射能又はその他のラベルの量はサンプルの中に存在している内性hK2の量に反比例する。例えば、少ない量の放射能を含むペレットは内性hK2の存在の指標となる。

20

30

【0056】

実験室及び家畜においてポリクローナル抗体又は抗血清を調製するための慣用の技術の他に、公知のハイブリドーマ細胞培養技術を利用してhK2ポリペプチドに対するモノクローナル抗体を調製できる。一般に、この方法は例えばミエローマ細胞の適合性連続系と融合した一次脾臓細胞の抗体産生融合細胞系を調製し、そしてこの融合細胞をマス培養又はミエローマ細胞系の由来するもしくは適合する動物種の中で増殖させることを含む。かかる抗体は動物の接種により産生されるもの比べて数多くの利点を供し、なぜならこれらは高特異性且つ高感度であり、そして免疫学的に比較的「純粋」だからである。当該抗体の免疫学的に活性なフラグメント、例えばf(ab)フラグメントも、部分ヒト化モノクローナル抗体として本発明の範囲に属する。

40

【0057】

本発明を以下の詳細な実施例を参考に更に説明する。

実施例 1

材料及び方法

哺乳動物hK2発現ベクターの構築

図2に示す全プレプロ-hK2(pphK2)をコードするcDNA(長さ約820bp)(pphK2転写体の開始部位に対し、ヌクレオチド#40~#858)を、hK2特異性オリゴヌクレオチドプライマーの対

(5'ACGCGGATCCAGCATGTGGGACCTGGTTCTCT3' SEQ ID NO : 8及び

50

5'ACAGCTGCAGTTTACTAGAGGTAGGGGTGGGAC3' SEQ ID NO : 9)

による逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT - PCR) を利用してヒトBPH組織のRNA から合成した。このcDNAは5'及び3'末端 (pphK2 センス配列に対し) が BamHI 及び Pst I 配列のそれぞれで包囲されるように作製した。次にこのcDNAをアガロースゲル電気泳動により精製し、そして BamHI 及び Pst I 制限酵素で消化した。制限処理したcDNAを BamHI - Pst I 消化pVL1393 プラスミドベクターとライゲーションし、そして E . コリ HB101 株に形質転換した。pphK2 cDNA / pVL1393 プラスミドベクターを有する E . コリを選定した。pphK2 含有インサートを配列決定した。プラスミド pphK2 cDNA / pVL1393 を E . コリの中で大量生産し、そして CsCl 勾配超遠心分離により精製した。

【 0 0 5 8 】

E . コリ HB101 におけるプラスミド pphK2 / pVL1393 はブダペスト条約の規則のもとで 1994年5月2日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、Rockville, MD, USA に寄託しており、そして ATCC 69614 の寄託番号が付与されている。

【 0 0 5 9 】

全 pphK2 コード配列を示す 0.8kb のフラグメント (図 2) を次のプライマー A (5'ATATGGATCCATATGTCAGCATGTGGGACCTGGTTCTCTCCA3') (SEQ ID NO : 10) 及び B (5'ATATGGATCCTCAGGGGTTGGCTGCGATGGT3') (SEQ ID NO : 11) 並びに pphK2 含有プラスミド pVL1393 (Dr. Young, Mayo Clinic より贈程) を鋳型として用いる PCR により作製した。PCR 生成物を TA - クローニングベクター (Invitrogen Corp. , San Diego, CA) に挿入し、そして全インサートの DNA を配列決定した。

【 0 0 6 0 】

哺乳動物 hK2 発現ベクターを得るため、hK2 含有インサートを対応の TA クローンから単離し、そしてプラスミド pGT - d (Bergら、Nucl. Acids Res., 20, 54-85 (1992)) (Dr . Brian Grinnell, Lilly から贈程) の Bcl I 部位に GBMT プロモーターのコントロール下で挿入した。哺乳動物発現ベクター PLNS - hK2 及び PLNC - hK2 をプラスミド pLNSX 及び pLNCX (Milerら、Biotech. 9, 980 (1989)) のそれぞれに、対応の TA ベクター由来の 0.8 kb の野生型 hK2 インサートをクローニングすることにより得た。全哺乳動物発現ベクター中のインサートの方向を DNA 配列決定により確認した。

組換えクローンの作製

AV12 - 664 (ATCC CRL - 9595) 、シリアンハムスターにおけるアデノウィルス誘導腫瘍に由来する細胞系及び DU145 細胞を 10% の胎児血清 (D10F) の添加したダルベッコ改良イーグル培地 (高グルコース) の中で培養した。PC3 細胞を 10% の胎児牛血清を含む最少イーグル培地の中で培養した。AV12 細胞をリン酸カルシウム法 (Maniatisら前掲 (1989)) を利用し、hK2 発現ベクターでトランスフェクションした。3日後、トランスフェクション細胞を D10F + 200nM のメトトレキサート (MTX) の中に懸濁した。薬剤耐性クローン細胞を 2 ~ 3 週間後に単離し、そしてその使用培地をウェスタンブロットにより分析した。PC3 及び DU145 細胞をリポフェクタミン (Gibco - BRL, Gaithersburg, MD) を用いる hK2 哺乳類発現ベクターによりトランスフェクションし、そしてクローン (PC3 - hK2 及び DU145 - hK2) を 400 µ g / ml の G418 を含む培地で選別した。

タンパク質の精製及び配列決定

AV12 - hK2 クローンを D10F + 200nM の MTX の中で増殖させた。約 60% の集密度において、細胞を Hank's バランス塩溶液で洗い、そして無血清 HH4 培地に再懸濁した。無血清培地を添加して 7 日後に消費培地を回収し、そして - 20 で保存した。タンパク質を精製するため、無血清消費培地を濃縮し、そして 50mM の炭酸水素ナトリウム pH8 と交換した。サンプルを 0.2 µ のフィルターで濾過し、そして TSK DEAE - 5 PW HPLC カラム 21mm x 150mm に 5 ml / 分の流速で直接汲み入れた。バッファー A は 50mM の炭酸水素ナトリウム pH7.9 を含み、そしてバッファー B は 50mM の炭酸水素ナトリウムと 0.5M の NaCl pH7.6 を含んだ。溶出プロフィールは 35 分にわたる 0 ~ 50% のバッファー B の勾配 ; 35 ~ 40 分にわたる 50 ~ 100% のバッファー B の勾配 ; 及び 5 分間の 100% の B でのインクラチック溶出、それに次ぐバッファー A での再平衡化により展開させた。流速は全体を通じて 5 ml / 分とした。上

10

20

30

40

50

記手順において、硼酸バッファーが有意差を伴うことなく炭酸水素バッファーを代用する。

【0061】

DEAE画分を、ウサギ抗 - pphK2 を利用する乾燥ELISA 法（下記参照）によりhK2 の存在についてアッセイした(Saediら、*Mol. Cell. Endoc.*, 109, 237 (1995))。hK2 活性をもつ画分をプールし、そして膜（10kDのカットオフ値）による限外濾過により約5～8 mlまで濃縮した。次いで固形硫酸アンモニウムを1.2Mの最終濃度にまで加えた。次いでこのサンプルをポリLC、ポリプロピルアスパルトアミドカラム1000 孔径、4.6mm×200mm に注入し、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC) によりタンパク質を分解した。バッファーAは20mMのリン酸Na, 1.2Mの硫酸Na pH6.3とし、そしてバッファーBは50mMのリン酸Na, 5%の2-プロパノール、pH7.4 とした。溶出勾配は5分にわたる0～20%のB; 5～20分にわたる20～55%のB; 20～23分の55% B, 23～25分の55～100%のBのイソクラチック; 2分の100%のBのイソクラチック、次いでバッファーAでの再平衡化した。流速は1 ml/分とした。約50% Bで溶出したhK2 を含むHIC ピークをCentricon¹⁰ (Amicon) 10K MW カットオフ限外濾過による反復濃縮により50mMの硼酸バッファーpH8 に交換した。純度をSDS-PAGE及びウェスタンブロット分析の双方により評価した。hK2^{v217} 濃度を評価するのに用いた励起係数は1.84 = 1 mg/mlのA₂₈₀ とした。

10

【0062】

あるケースにおいては、hK2 を含むHIC ピークを10/30 Pharmacia S12カラムでサイズ排除クロマトグラフィー(SEC) により更に精製した。この場合、hK2 を含むHIC ピークを上記のようにして限外濾過により1 ml未満に濃縮し、次いで100mMの酢酸アンモニウムpH7又は硼酸ナトリウムpH8で平衡にしたサイズ排除カラムに載せた。流速は0.7ml/分とした。次いでhK2 ピークを限界濾過により濃縮した。酢酸アンモニウム中のSEC回収ピークを凍結乾燥してバッファーを除き、次いで水の中で再構成させた。このサンプルアリコート気性6NのHClにおいて真空下で20時間112で加水分解し、次いで0.1NのHClの中で再構成し、そしてHewlett PackardAminoquantアミノ酸分析器で第一アミンについてはOPAにより、そして第二アミンについてはFMOCによるアミノ酸のプレ-カラム誘導化を利用して分析した。

20

【0063】

hK2 をアフィニティークロマトグラフィーにより精製するためにHK1G586.1 アフィニティー樹脂を使用した。HK1G586.1 モノクローナル抗体(mAb) をPharmacia GammaBind plus Sepharose (cat No.17-0886) に、Schneider (*J. Biol. Chem.*, 257, 10766 (1982)) に従ってカップリングさせた。簡単に述べると、HK1G586.1 mAb 及び樹脂を回転させながら4で一夜インキュベーションした。樹脂を遠心分離し(500×gで5分、4)、そして0.2MのトリエタノールアミンpH8.2で2回洗った。アミン基を新鮮な架橋溶液(0.2MのトリエタノールアミンpH8.2中の25mMのジメチルピメリミデート二塩酸塩)の中で45分室温(22)で架橋させた。この樹脂を20mMのエタノールアミンpH8.2で室温で5分クエンチングし、次いで1MのNaCl, 0.1MのPO₄, pH7.0で2回洗った。樹脂をPBSで更に2回洗い、そして使用するまで0.05%のNaN₃で4で保存した。

30

【0064】

Applied Biosystems Model 477a パルス液相シーケンサーをタンパク質及びペプチドを配列決定するために用いた。モデル477aはN末端から順次アミノ酸を遊離する自動式エドマン分解化学、それに次ぐPTH誘導化及び逆相HPLCによるクロマトグラフィーを利用する。ペプチドサンプルをシーケンサーにバイオペレン処理ガラスファイバーフィルター支持体上に載せ、そして全タンパク質はバイオペレン処理フィルター又は予備活性化Portonフィルター(Beckman, Fullerton, CA)のいづれかに載せた。サンプルをプロット順にまずNovexシステム(Novex, San Diego, CA)上でミニ-ゲルとして泳動させ、次いでProb lot PVDF膜に移し、クマジーブルーで目視化させ、適当なバンドを切り出し、そしてPVDF膜から直接配列決定した。

40

モノクローナル抗体の製造

50

A / Jマウスに、1日目に完全フロイドアジュバント(CFA)中の50 μ lのphK2を腹腔内注射し、14日目に不完全フロイドアジュバント(IFA)中の25 μ gのphK2を腹腔内注射し、そして28日目にPBS中の25 μ gのphK2を腹腔内注射した。融合の3日前にマウスをPBV中の10 μ gのphK2の静脈内注射でブースティングした。マウスを殺し、そして単一細胞懸濁物を脾臓から調製した。免疫B細胞を当業界周知の技術を利用してP3.653ミエローマ細胞と融合させた。クローンをELISAによりスクリーニングし、そしてhK2^{v217}及びphK2^{v217}に対する上清液の反応性及びPSAとの最少限の反応性に基き選別した。このような基準により選定した2種のクローン、即ちクローンHK1G464及びHK1G586をFACStar plusセルソーターを用いてサブクローニングし、単一細胞をマウスの脾臓支持細胞層の上に載せた。サブクローンHK1G464.3及びHK1G586.1を更なる研究のために用いた。

10

【0065】

免疫原をhK2^{v217}とし、CFA及びIFAの代わりにみょうばんを使用し、BALB/cマウスをA/Jマウスの代わりに使用することを除き上記と同じプロトコルを採用した別の融合はクローンHK1H247を製造した。

ELISA アッセイ

乾燥式ELISA方式を、クローンの無血清消費培地中及びhK2精製の際に集めた画分中のhK2を測定するために用いた。マイクロタイタープレート(Becton Dickinson Labware, NJ)に50 μ lの消費培地又はカラム画分を37で一夜かけてコーティングした。そのウェルをPBS+0.1%のTween 20(PBST)で洗い、そして50 μ lの第一抗体と1時間インキュベーションした。そのウェルを再びPBS+Tで洗い、そして37で1時間西洋ワサビペルオキシダーゼにカップリングした50 μ lのヤギ抗マウス-IgG又はヤギ抗ウサギ-IgG Fc抗体(1:500, Jackson Immunosearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)とインキュベーションした。ウェルをPBSTで洗い、O-フェニレンジアミン二塩酸塩(OPD, Sigma, MO)と5分間インキュベーションし、そして比色反応をELISAリーダー(Biotek Instruments, Inc., モデルEL310, VT)でA₄₉₀にて測定した。サンプルは全て二重測定でアッセイした。ベクターのみでトランスフェクションしたAV12細胞由来の無血清消費培地をネガティブコントロールとして使用した。

20

【0066】

抗体をビオチニル化phK2^{v217}, hK2^{v217}及びPSAを用いる溶液系ELISA方式で試験した。PSAはSensabaugh and Blake (*J. Urology*, 144, 1523 (1990))の方式により精製した。50 μ lのバッファーA(8.82mMのクエン酸、82.1mMのリン酸ナトリウム(二塩基性)、10%のBSA、0.1%のマンニトール、0.1%のNonidet P-40, pH7.0)に希釈した20ngのビオチニル化hK2^{v217}もしくはphK2^{v217}、又はPBS中の10%のウマ血清(HS)に希釈した0.25ngのビオチニル化PSAを、50 μ lのハイブリドーマ上清液、ネガティブコントロール上清液(即ち、phK2^{v217}及びhK2^{v217}に関しては無関係なハイブリドーマ上清液、又はPSAに関してはHS中の20 μ gの無関係な精製mAb)、又はポジティブコントロール(即ち、PSAに関してはHS中の20 μ g/mlの精製PSM773(抗-PSA)mAb、又はphK2^{v217}及びhK2^{v217}に関してはHK1D104(抗「hK2」)ハイブリドーマ上清液)とインキュベーションした。hCGに対するmAbであるHC0514をPSAアッセイにおいてネガティブコントロールとして用い、そしてtauに対するmAbであるZTG085をhK2アッセイにおいてネガティブコントロールとして用いた。

30

40

【0067】

このような抗体及び抗原の混合物をストレプトアビジンコーティング化マイクロタイタープレート(Labsystems, Helsinki, Finland)の中で振盪させながら1時間インキュベーションした。このプレートを300 μ lのPSB, 0.1%のTween-20(PBST)で3回洗い、そしてHSに1:10,000に希釈した100 μ lのガンマー特異性ヤギ抗マウスIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)と1時間振盪させながらインキュベーションした。2回のPBST洗浄後、振盪しながら50mMのリン酸-クエン酸バッファー、0.03%の過硼酸ナトリウム、pH5.0(Sigma Chemical, St. Louis, MO)中の100 μ lの1mg/mlのO-フェニレンジアミンを添加して

50

30分かけて発色させた。反応は50 μ lの4NのH₂SO₄の添加によりクエンチングした。発色強度はマイクロタイタープレートリーダーを用い490nm及び540nmにおいて吸収を測定することにより決定した。490nmで2.6を超える吸収は540nmの測定値により補正した。サンプル値は三重測定の前平均 \pm 標準偏差である。コントロール値は二重測定の前平均値である。

ウェスタンブロットアッセイ

ウェスタンブロットアッセイは標準の手順を利用して実施した。無血清消費培地をCentricon 10 (Amicon, Inc., Beverly, MA)を用いて10倍濃縮し、そして12%のゲル(Bio-Rad, Inc., Melville, NY)を用いてSDS/PAGEにかけた。分析目的のため、SDS/PAGEは8~25%勾配ゲルを用いてPharmacia PhastSystemで実施した。電気泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜に転写し、そしてPBS中の2%の脱脂粉乳で4に一夜ブロッキングした。ブロットをすすぎ、次いで第一抗体(腹水の1:1000希釈物又は1 μ g/mlの精製mAbもしくはポリクローナルAb)と22で1時間インキュベーションした。次いでブロットを洗い、そして第二抗体(ヤギ抗-マウス-HRP又はヤギ抗-ウサギ-HRP, 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)と45分インキュベーションした。免疫反応バンドをDAB (Sigma, St. Louis, MO)とH₂O₂を利用してブロットを発色させることにより、又はECL (Amersham, Buckinghamshire, England)システムを製造者の仕様に従って利用することにより検出した。

10

共有複合体形成

共有複合体形成について試験するため、0.175 μ MのhK2を20 μ MのインヒビターとpH 8で100mMの硼酸バッファー中でインキュベーションした。試験したインヒビターは1-アンチキモトリプシン、1-アンチトリプシン、1-アンチプラスミン、アンチトロンビン及び2-マクログロブリンとした。5 μ lのhK2(10 μ g/ml)に100mMの硼酸バッファーの中に調製した計算 μ gのインヒビターを加え、そして必要なら、各サンプルを10 μ lの総容量にした。サンプルを37で3時間インキュベーションし、その後35%の2-メルカプトエタノールを含む1.5 μ lの7x PhastSystem SDSサンプルバッファーを加え、そしてこのサンプルを湯浴の中で3分煮沸した。サンプルをSDS/PAGE及びウェスタン分析に適用する前にSDSサンプルバッファーの化に1/4に希釈した。

20

ペプチド基質のタンパク質分解

hK2のペプチド基質を切断する能力を決定するため、ペプチドを10mg/mlにおいてDMSOの中に溶かし、次いでPSA, hK2又はトリプシンを含む100mMの硼酸バッファーpH8の中に1:10に希釈した。典型的な実験は下記の通りに実施した: 1 μ lのペプチドを7 μ lの100mMの硼酸バッファーに加え、次いで2 μ lのhK2(10 μ g/ml)、PSA(500 μ g/ml)又はトリプシン(0.5 μ g/ml)を加えた。一般にサンプルを37で16時間インキュベーションした。サンプルを100 μ lの0.2%のTFA/水でクエンチングし、そしてそのクエンチングしたサンプルをAS100オートサンプラー、デュアル1350ポンプ及びBiodimensionalスキャンUV-VIS検出器の備ったBioRadモデル800 HPLCに取り付けたVydac C-18逆相カラムに直接載せた。溶媒Aは0.1%のTFA/水であり、そして溶媒Bは0.1%のTFAを含むアセトニトリルとした。サンプルを90%の溶媒Aの中に入れ、そして勾配を10分かけて60%の溶媒Bに至るまで展開させた。吸収を220nm及び280nmで同時にモニターした。HPLCで集めたピークを真空遠心分離又は凍結乾燥により濃縮し、次いでアミノ酸シーケンサーに入れて個々のフラグメントを同定した。あるケースにおいては10 μ lのクエンチング済みサンプル混合物を配列決定膜に直接載せ、そしてその配列がわかっているため、各サイクルに存在するアミノ酸分布から切断部位を決定した。

40

発色原基質を用いるプロテアーゼアッセイ

パラ-ニトロアナリド誘導化基質の加水分解を測定するアッセイはプログラム式恒温型7-ポジションセルホルダーの備ったHP8452A UV-VIS光度計を用いて実施した。アッセイは37にインキュベーションした100mMの硼酸ナトリウムpH8の中で実施し、吸収上昇を405nmでモニターした。メトキシスクシニル-Arg-Pro-Tyr-パラニトロアナリド(Meo-Suc-R-P-Y-pNA)及びH-D-プロ-phe-arg-パラニトロアナリド(

50

P - F - R - pNa)はアッセイにおいて 1 mMとした。

【 0 0 6 8 】

標準のFast Moc化学を利用するABI モデル431Aペプチドシンセサイザーを図16に挙げる全ペプチドの合成のために採用したが、# 2 アンジオテンシノーゲン及び# 5 インスリンの酸化型ペター鎖はSigma から入手した。各合成ペプチドの質量の質量スペクトル (University of Michigan, Core Facility)によりES/MSを用いて確認した。上記のシーケンサーABI モデル 477a をペプチド配列の確認のために使用した。

phK2^{v217}からhK2^{v217}への変換

50mMの硼酸ナトリウム中の 100~400 µg/mlの phK2^{v217}のサンプルを1% w/wのトリプシン又はhK2と37 でインキュベーションした。プロから成熟体に至る変換は1~2 µgのhK2^{v217}出発材料を100 µlのHIC バッファーAに希釈し、そして二形態を上記の通りにして HIC - HPLCにより分解することによりモニターした。hK2^{v217}と phK2^{v217}とのインキュベーションは同じようにして行ったが、但し、同等量の二形態を図17Bに示すように一緒にインキュベーションした。

実施例 2

哺乳動物細胞中のhK2^{v217}の発現及び精製

哺乳動物細胞系においてhK2を発現させるため、hK2の全コード配列 (pphK2) (図2)をコードする 0.8kbのフラグメントをPCRを用いて増幅し、ベクターPCR II (TA)にサブクローニングし、そしていくつかのクローンを単離した。これらのクローンのうちのいくつかにおける全pphK2インサートのヌクレオチド配列を、PCR増幅により生じうる任意の突然変異を検定するために決定した。一方の野生型hK2インサートを有するクローンTA-hK2、及び他方の突然変異hK2インサートを有するクローンTA-hK2^{v217}の2つのクローンを更なる分析のために選別した。TA-hK2^{v217}はhK2のコドン650にCのTによる置換を含み、hK2のアミノ酸残基217でのバリン(GTT)によるアラニン(GCT)の保存的置換がもたらされている(図2)。哺乳動物発現ベクターを得るため、TA-hK2及びTA-hK2^{v217}のpphK2インサートをGBMTプロモーターのコントロール下でプラスミドPGT-dにサブクローニングし、プラスミドpGThK2及びpGThK2^{v217}をもたらした。GBMTプロモーターはいくつかの調節配列より成り、そしてアデノウィルスE1aタンパク質により活性化される(Bergら、前掲(1992))。

【 0 0 6 9 】

pphK2^{v217}遺伝子が哺乳動物細胞の中で発現されるかを調べるため、プラスミドpGThK2^{v217}をAV12-664細胞の中にトランスフェクションした。この細胞系はアデノウィルスタイプ12によりシリアンハムスターにおいて誘導された腫瘍に由来し、そしてアデノウィルスE1aタンパク質を発現する。E1aタンパク質はGBMTプロモーターを活性化し、このプロモーターのコントロール下での遺伝子産物の発現をもたらす。2~3週間後、MTX-耐性クローン細胞を単離し、そしてその消費培地をウェスタンブロットにより分析した。いくつかのクローンが同定され、それらは抗-pphK2抗血清に免疫反応性であるポリペプチドを培地の中に分泌する。一のクローン(AV12-pGThK2^{v217}#2)を更なる特性決定及びタンパク質精製のために選別した。

【 0 0 7 0 】

hK2ポリペプチドを精製するため、AV12-pGThK2^{v217}クローン#2由来の無血清消費培地を7日後に集め、濃縮し、そしてアニオン交換クロマトグラフィーにかけた(図4A)。ELISAアッセイによる決定に従い、hK2活性のピークは約0.2MのNaClにおいて溶出した(点線)。ELISAアッセイは同じ画分のSDS/PAGEにより認められるタンパク質の約34kDのバンドの出現とよく相関した。アニオン交換カラム由来のhK2陽性画分を集め、そして疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)(図4B)にかけた。A₂₈₀の大部分はHICカラムに保持されなかった。22分目にて溶出したHIC上に保持された主要ピークもELISAアッセイにより最大の活性ピークを示した(点線、図4C)。約34kDの主要タンパク質バンドがSDS-PAGEによっても観察された。HIC由来の22分のピークをSECにより分解すると、一般にタンパク質A₂₈₀の約80~90%が19.4分において溶出し、保持時間は約34kD

のタンパク質と一致した(図4C)。16.7分に溶出するSEC上の唯一のその他のタンパク質ピークは事前の精製工程において観察された約70kDのタンパク質に相当する。

【0071】

精製タンパク質を更に同定するため、約2.5 μ gのタンパク質を自動N末端分析にかけ、下記の配列が得られた。Val - Pro - Leu - Ileu - Gln - Ser - Arg - Ile - Val - Gly - Gly - Trp - Glu - 。エドマン分解手順による順に遊離されるアミノ酸プロフィールからは競合する配列は認められなかった。PSAに対する分析により、このタンパク質はphK2^{v217}であり、なぜなら成熟PSA(精液から単離)の既知の配列はIleu - Val - Glyで始まり、そしてpPSA及びphK2はN末端に更に7個のアミノ酸を有するものと推定される(図2)。このタンパク質のアミノ酸分析はphK2^{v217}の推定配列と一致するアミノ酸組成をもたらした。このphK2ポリペプチドはmg量で精製された。

10

実施例3

phK2^{v217}の特性決定及びhK2^{v217}の作製

実施例2において採用した精製スキームの効率を調べるため、1.5 μ gの精製phK2^{v217}をベーターメルカプトエタノール(BME)の存在下又は非存在下でSDS/PAGEにかけ、そしてそのゲルを銀染色した。サンプル中のphK2^{v217}を約95%の純度であることを結果は示した(図5)。phK2^{v217}はBMEの非存在下で約30kDにて泳動し、そしてBMEの存在下では約34kDにて泳動することも示された。このパターンは精液から精製したPSAについて観察されたものと類似である(図5)。

【0072】

cDNA配列から推定したhK2のアミノ酸配列は残基78にある一の潜在的なN-連結グリコシル化部位の存在を示す(N-M-S)。この部位がグリコシル化されているかを決定するため、phK2^{v217}をSDS/PAGEにかけ、ニトロセルロース紙に転写し、ジゴキシゲニン(DIG)-カップリング化レクチン、次いで西洋ワサビペルオキシダーゼラベル化抗-DIGと反応させた。

20

【0073】

図6において(レーン1)、2 μ gのphK2をコンカナバリンA(ConA)で染色し、タンパク質中の2個の非置換又は2-O-置換-マンノシル残基の存在を示唆した。レーン2は陽性コントロール糖タンパク質のZCE025mAbのConA染色を示す。このmAbの重鎖(50kD)及び軽鎖は共にマンノースコアを有するN連結化オリゴ糖を含むことで知られる。レーン3は非グリコシル化タンパク質(BSA)がConAレクチンと反応しないことを示した。phK2^{v217}はRCA(Gal b 1-4GlcNAc特異性)及びAAA((1-6)連結化フコース特異性)とも反応した。このレクチン反応性パターンは複合N-連結化オリゴ糖の存在と一致した。phK2^{v217}上のオリゴ糖はシアル酸も含み、なぜならSNA(ガラクトースにシアル酸が(2-6)連結)及びMAA(ガラクトースにシアル酸が(2-6)連結)は共にphK2^{v217}と反応したからである。

30

【0074】

hK2のプロ領域の配列はVPLIQSRである。このプロ配列におけるアルギニンのカルボキシ末端での酵素切断はphK2をhK2に変換させる。精製phK2^{v217}のペプチド結合をこの位置において加水分解するための温和なトリプシン消化を開発した。phK2^{v217}を1%のトリプシンとインキュベーションし、そしてその変換をHIC-HPLCによりモニターした(図7)。この手順はphK2^{v217}からhK2^{v217}に至る完全変換をもたらした。hK2^{v217}と表示したピークをN末端配列決定し、そして配列IVGGWEで始まることが示され、それはhK2の成熟形態にとってのN末端である。上記以外の配列は検出されず、この温和なトリプシン処理が任意の有意なレベルの非特異的切断をもたらさないことを示した。トリプシン処理サンプルのSDS/PAGEは泳動度においてわずかではあるが認識できる増大を示し、概してプロペプチドの質量である826ダルトンの質量のわずかな減少に相当した。

40

実施例4

hK2 - 特異的Absの作製

phK2^{v217}及びhK2^{v217}をhK2に対するmAbを作製するための免疫原として用いた。ハ

50

イブリドーマをhK2^{v217}又はphK2^{v217}との高度な反応性及びPSAとの最低限の反応性に基きスクリーニングした。ハイブリドーマから獲得したmAbの代表例を表1に示す。phK2^{v217}による免疫はmAb HK1G586.1及びHK1G464.3をもたらした。HK1G586.1はhK2 - 特異性であり、なぜならそれはphK2^{v217}及びhK2^{v217}の双方は認識するが、PSAは認識しないからである。他方、HK1G464はphK2 - 特異性であり、なぜならそれはphK2^{v217}のみを認識し、そしてhK2^{v217}又はPSAは認識しないからである。

【0075】

【表1】

表 1

hK2^{v217}及びphK2^{v217}に対して生起させた様々なmAbの特異性

A. phK2^{v217}に対して生起させたmAb

mAbs	PSA	hK2 ^{v217}	phK2 ^{v217}
無関係なAb	0.245	0.162	0.125
陽性コントロール	2.242±0.06	9.196	8.91±0.02
HK1G586.1 (10µg/ml)	0.150±0.004	11.154±0.18	10.146±0.87
HK1G464.3 (腹水1:2000)	0.143±0.03	0.245±0.02	6.644±0.17

B. phK2^{v217}に対して生起させたmAb

試験したmAbs	PSA	hK2 ^{v217}	phK2 ^{v217}
無関係なAb	0.157±0.18	0.132±0.01	0.153±0.01
陽性コントロール	2.768±0.08	8.342±1.3	9.673±0.99
培地のみ(ネガティブ コントロール)	0.129±0.02	0.240±0.02	0.247±0.01
HK1H247	0.157±0.01	9.34±0.7	0.179±0.004

【0076】

hK2^{v217}による免疫はmAbHK1H247をもたらした。このmAbはhK2 - 特異的であり、なぜならこれはhK2^{v217}のみを認識し、phK2^{v217}又はPSAは認識しないからである。これらの結果はphK2^{v217}及びhK2^{v217}が様々なhK2形態に特異的なmAbを作製するうえで免疫原として無価値だからである。

【0077】

ウェスタンブロット分析を、HK1G580が精液中のhK2を認識するかどうかを調べるために用いた(図8)。約22kD、約33kD及び約85kDのhK2 - 免疫反応性バンドがこのmAbにより認識された。精液中の類似のhK2 - 免疫反応性パターンもDeperthesらBiochem. Biophys. Acta, 1245, 311 (1995)より報告されている。この結果はhK2^{v217}に対して生起させたmAbが精液中の天然hK2を認識することを示唆した。hK2^{v217}又はphK2^{v217}に対して

10

20

30

40

50

生起させた全ての抗体はhK2及びphK2の対応の形態も認識し、hK2^{v217}及びphK2^{v217}がそれぞれ免疫学的に類似していることを示唆した(下記参照)。

実施例 5

哺乳動物細胞におけるhK2の発現

哺乳動物細胞において野生型hK2(hK2)を発現させるため、pGThK2(図3)をAV12細胞でトランスフェクションした。hK2ポリペプチドを発現するいくつかのクローンをHK1D106.4(hK2のアミノ酸残基17~71に対応するポリペプチドに対して生起させたhK2-特異的mAb)を用いるウェスタン分析により同定した。クローンAV12-hK2#27(AV12-hK2)をその高度なhK2発現レベルに基づき更なる分析のために選別した。ベクターのみでトランスフェクションした細胞(pGTD)はHK1D106.4との反応性を示さなかった。

10

【0078】

HK1D106.4 mAb を利用するELISA は7日目でのAV12-hK2の無血清消費培地中の約0.5~1 µg/mlのhK2ポリペプチドの存在を示唆した。AV12-hK2^{v217}からのphK2^{v217}の精製において利用した同じ方法をAV12-hK2の7日目の消費培地からhK2ポリペプチドを精製するために用いた。これは低収率の精製hK2ポリペプチドを供し、それは精製手順に対して非常に不安定であり、それ故免疫原として使用するには非現実的であった。

【0079】

hK2ポリペプチドを上記の方法を利用して部分精製し、SDS/PAGEにかけ、エレクトロブロッティングし、そしてN末端アミノ酸配列決定にかけた。この分析は7日目のAV12-hK2の消費培地の中にhK2ポリペプチドがN末端に配列IVGGWECEKを有することを示した。エドマン分解手順により順に遊離されるアミノ酸のプロフィールから競合配列は認められなかった。PSAとの対比により、この配列は成熟hK2(hK2)に相当した。このタンパク質のアミノ酸分析はhK2のそれとも一致した。

20

【0080】

この発見は興味深く、なぜなら7日目においてAV12-hK2^{v217}の無血清消費培地の中にphK2^{v217}が優先的に存在し、一方7日目のAV12-hK2の無血清消費培地にはhK2が優先的に存在していることが示されたからである。1日目のAV12-hK2の無血清培地の中に存在するhK2の形態を調べるため、この材料をHK1G586.1 mAbを用いるアフィニティー精製により部分精製した。約34kDのタンパク質をPVDF上に転写し、そしてN末端分析にかけ、配列VPLIQSRIVGGが示された。エドマン分解手順により順に遊離したアミノ酸のプロフィールからは競合配列が認められなかった。PSAとの対比し、この配列はphK2に相当した。このことは、hK2ポリペプチドがAV12-hK2及びAV12-hK2^{v217}の双方によりプロ形態として分泌されることを示唆した。しかしながら、phK2^{v217}は安定であり、そしてhK2^{v217}に変換されないが、phK2は不安定であり、そして細胞外でhK2に容易に変換した。

30

実施例 6

hK2の生合成

哺乳動物細胞におけるhK2の生合成を更に研究するため、経時的試験を行い、それではAV12-hK2クローン#27由来の無血清消費培地を8日間連続して毎日集め、濃縮し、そしてSDS-PAGEにかけた。タンパク質をニトロセルロース膜に移し、そしてHK1D106.4又はHK1G464.3 mAbのいずれかでプロービングした(図9)。図9に示す通り、HK1D106.4はphK2及びhK2を共に認識し、一方HK1G464.3はphK2のみを認識し、なぜならそのエピトープはhK2の-7~+7領域にあるからである。hK2ポリペプチド(約34kD)の発現はHK1D106.43 mAbによる検出に従い、3日目にピークとなり、そしてその後プラトーとなった。約70kD~約90kDで泳動する2本のその他の免疫反応性バンドも4日目以降に検出された。

40

【0081】

他方、同一のサンプルをブロッティングし、そしてHK1G464.3でプロービングすると、hK2レベルの暫進的な低下が4日目に検出された。8日目、非常に低レベルのhK2が消費培地の中で見い出された。この結果は、phK2がAV12-hK2細胞により培地の中に分泌され、そして徐々にhK2に細胞外で変換されることを示す。驚くべきことに、約70kD及び約

50

90kDのバンドはHK1G464.3 mAb では観察されず、これらのバンドがhK2のホモオリゴマーであるか、又は未だ未知のタンパク質に共有複合したhK2であることを示唆した。これらのバンドの同一性はこの時点ではまだわかっていないが、それらは消費培地中のhK2の存在についてのマーカーを担う。図9において、精製 phK2^{v217}及びhK2^{v217}タンパク質をコントロールとして用いた。

【0082】

AV12細胞におけるhK2^{v217}の生合成を研究するため、類似の経時的試験をAV12-hK2^{v217}クローン#2で行った。図10に示す通り、HK1D106.4 mAb による検出に従い、hK2^{v217}の発現は3日目にピークとなり、そして4日目以降はさほど変化しなかった。プロットをHK1G464.3 mAb でプロービングしたときに類似の結果が得られた(図10)。これはAV12-pGThK2^{v217}クローン#2細胞が1日目以降にphK2^{v217}を発現し、そして少なくともその8日後において、このタンパク質が成熟形態に変換されていないことを示唆する。このような結果は、8日目までに培地の中に残っているとするとhK2へと変換されるphK2の結果と異なり、phK2^{v217}が37にて培地の中で8日間安定であることを示唆する。

10

【0083】

phK2からhK2に至る細胞外変換が培養物中のAV12-hK2クローン#27細胞の生存に相關するかを調べるため、クローン#27細胞をトリパンブルー排除を利用して計算した。消費培地中のhK2の発現はHK1D106.4及びHK1G464.3 mAbの双方を用いるELISAにより測定した。図11に示す通り、生存細胞の数は3日目の培養物中での38,000,000個にてピークとなり、そしてその後徐々に減少した。8日目、生存細胞数は10,000,000未満に減少した。phK2の発現(HK1G464.3により測定)も3日目にピークとなり、そしてその後徐々に減少した。

20

【0084】

他方、hK2の発現(HK1D106.4により測定)は3日目にピークとなったが、その後プラトーに達した。この結果は、phK2がAV12-hK2細胞により分泌され、そしてその一部が4日目にhK2へと細胞外で徐々に変換されたことを示唆する。更に、phK2からhK2への変換は細胞生存の減少に明らかに相関し、死細胞により放出される細胞外プロテアーゼがこの変換を担う一つの要因でありうることを示唆する。hK2の発現は細胞が最も活発な時点で最高であった。hK2の減少は細胞生存率の減少と平行し、このような細胞によりhK2が分泌されることを示唆し、細胞の死及び溶解を経て放出されることと対立する。また、hK2の上昇はphKの降下に対応し、hK2のプロ形態が経時的に成熟形態へと自動的に変換したことを示唆する。

30

【0085】

前立腺癌腫細胞におけるhK2の生合成を調べるため、hK2をDU145及びPC3細胞系において発現させた。pphK2をプラスミドpLNCX及びpLNSX(Miller and Rosman, *Bio Techniques*, 7, 980 (1989))の中に、CMV及びSV40プロモーターのそれぞれのコントロール下でクローニングした。得られるプラスミドpLNC-hK2及びpLNS-hK2をそれぞれPC3及びDU145細胞のそれぞれにトランスフェクションし、そしてクローンをG418含有培地の中で選別した。高レベルのhK2を発現するクローンをELISA及びウェスタンプロットにより選別した(PC3-hK2及びDU145-hK2)。

40

【0086】

培地中のhK2及びphK2のレベルを評価するため、PC3-hK2及びDU145-hK2細胞の無血清培地をHK1D106.4(hK2-特異性)及びHK1G464.3(phK2-特異性)mAbを用いてウェスタンプロット分析にかけた(図12)。結果は、phK2がDU145-hK2及びPC3-hK2の双方の消費培地の中に存在することを示した。このことは、前立腺癌腫細胞hK2がphK2として分泌され、そして細胞外で成熟形態に変換されることを示唆する。優先的なphK2は7日後でさえもPC3-hK2細胞の消費培地の中で検出されたが、優先的なhK2は1日目からDU145-hK2の無血清培地の中に存在した。これはおそらくはDU145消費培地中の豊富な細胞外プロテアーゼに基づくのであろう。

【0087】

50

上記の結果が一のクローンに限定されるかどうかを調べるため、AV12 - hK2 の3種類の別な独立に単離したクローン及びAV12 - hK2^{v217}の4種類の別な独立に単離したクローンをhK2ポリペプチドの発現について試験した。クローンの無血清培地を7日目に集め、そしてHK1D106.4 (hK2 - 特異性) 及びHK1G464 (phK2 - 特異性) mAbを用いるウェスタンブロットによりhK2の発現について試験した(図13及び14)。全てのAV12 - hK2クローンにおいて、HK1D106.4mAbは主要約34kDバンド(「hK2」)を検出したばかりでなく、約70kD及び約90kDをも検出し、これはhK2の存在の指標である(図13)。HK1G464.3は全てのAV12 - hK2クローンにおいて非常に低レベルのphK2を検出した(図14)。この結果は、優先的なhK2が全てのAV12 - hK2クローンの消費培地の中に存在していることを示唆し、AV12 - hK2 #27クローンについての確立された生合成メカニズムを確認せしめた。同じ分析をAV12 - hK2^{v217}クローンに対して用いた(図14)。結果は、これらのクローンの消費培地の中に7日目ではphK2^{v217}のみが存在することを示唆し、AV12 - hK2^{v217}クローンによる我々の発見を確認せしめた。

10

【0088】

上記の結果は総合するとhK2が哺乳動物細胞の中でプロ形態として発現され、そして未だ未知のプロテアーゼにより細胞外で成熟形態に変換されることを示唆する。これらの結果はphK2が生物学的流体の中に存在し得、従ってpCa及びBPHにとっての有用な診断マーカーでありうることも示唆する。

実施例7

hK2及びhK2^{v217}の酵素活性及び特異性

少量のhK2を、その酵素活性及び基質特異性を確立するために十分な純度にまで精製した。hK2の一般活性をペプチドのp-ニトロアニリド誘導体に対する発色原的なそのアミド分解活性を決定することにより測定した(表2)。このような基質のタンパク質分解により遊離されるp-ニトリアニリドを吸収A₄₀₅で測定する。キモトリプシン様プロテアーゼを測定するために基質メトキシスクシニル - Arg - Pro - Tyr - パラ - ニトロアニリド(MeO - Suc - R - P - Y - pNA)を使用し、それはフェニルアラニンで切断する。この基質はPSAの活性を測定するために既に使用されている(Christenssonら、*Eur. J. Biochem.*, 194, 755 (1990))。基質H - D - Pro - Phe - Arg - パラ - ニトロアニリド(P - F - R - pNA)はトリプシン様プロテアーゼに特異的であり、それはアルギニン(R)において切断される。

20

30

【0089】

hK2はhK2^{v217}よりもP - F - R - pNAに対して10倍以上の総合的な活性を有することが見い出され、そしてどのタンパク質もキモトリプシン基質MeO - Suc - R - P - Y - pNAを加水分解する能力を示さなかった。トリプシン様切断部位(リジン、アルギニン)を含むその他の同等な基質も試験し、そしてhK2は最大の率で基質P - F - R - pNAを加水分解することが見い出された。これらの発見はhK2がトリプシン様活性を有することを示唆する。

【0090】

【表 2】

表 2
発色原性基質に対するアミド分解活性

プロテアーゼ	MeO-Suc-R-P-Y-pNA xmol/min/ μ g/ml	P-F-R-pNA xmol/min/ μ g/ml
hK2 ^{v217}	0	8.7pmol
hK2	0	4.1nmol
PSA	13.3pmol	2.2pmol
トリプシン	13.3pmol	25.5nmol

10

【0091】

表 2：発色原性基質に対する hK2，hK2^{v217}，PSA 及びトリプシンのアミド分解活性。

【0092】

hK2 及び hK2^{v217} の特異性は、どのペプチド結合が加水分解されるかを調べるため、ペプチド基質を利用すると共に N - 末端アミノ酸配列分析を利用して一層詳しく調べた。図 15 はポリペプチド CALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAAN に対するアミド分解活性を示し、それは潜在的なトリプシン及びキモトリプシン切断部位の双方を有する。hK2^{v217} はトリプシン (R - K) 及びキモトリプシン (Y - R) 部位の双方を、2 : 1 のトリプシン様切断対キモトリプシン様切断比で切断する。これらの実験におけるコントロールとして、phK2^{v217} をこのペプチドともインキュベーションし、そしてアミド分解活性は示されなかった。hK2 は hK2^{v217} とは異なる特異性をこのペプチド基質に対して示した。hK2 に関してこの基質に対するキモトリプシン様特異性は認められず、そしてその活性はトリプシン様部位 (R - K) に対してのみであった。このポリペプチド内のどのその他のリジン (K) 残基も加水分解されず、hK2 の特異性がアルギニン (R) 残基に対してのみであることが示唆された。

20

30

【0093】

コントロールとして、トリプシンもこの基質に対して試験し、そしてトリプシン切断にとって適切な部位であることの知られていない K - P 結合を除く全てのリジン (K) 及びアルギニン (R) 部位が切断された。トリプシンは 210 - 236 基質 (ペプチド # 1、図 6) の R - K 部位を hK2 より約 4 倍速く、そして hK2^{v217} よりも約 4000 倍速い速度で切断した。どのキモトリプシン様結合もトリプシンによっては切断されなかった。PSA は主に Y - R 結合を切断した。PSA に関しては R - K 結合に対するごくわずかなトリプシン様結合も認められた (図 15)。このことは、発色原性基質に対する PSA に関して予め認められたわずかなトリプシン様活性と一致した (表 2)。

40

【0094】

いくつかのその他のペプチド基質も hK2 及び PSA とインキュベーション (図 16)。試験したペプチドの全てにおいて、hK2 は特定のアルギニンに対してのみ特異的であり、そして PSA は特定のチロシン (Y)、フェニルアラニン (F) 及びロイシン (L) 残基に対して主に特異的であった。図 16 においてはペプチド # 1 のみが hK2^{v217} により切断され、それは図 15 のクロマトグラフィー図に詳細してある。

実施例 8

hK2 による phK2^{v217} の活性化

図 16 におけるペプチド # 3 の配列は phK2 のアミノ酸残基 - 7 ~ + 7 に相当する。この領域はプロペプチド VPLIQSR を含み、それは phK2^{v217} の N 末端リーダーペプチドとして

50

見い出された。上述の通り、hK2はこのペプチドを切断してプロペプチド領域を遊離させることができるが、hK2^{v217}はできなかった。hK2が天然基質上のこのプロ配列を切断し得るかを調べるため、phK2^{v217}及びhK2^{v217}を変換するその能力をモニターした。phK2^{v217}を1%のhK2とインキュベーションし、そしてその変換をHIC-HPLC法によりモニターした(図17A)。結果は、hK2がphK2^{v217}をhK2^{v217}に変換することを示したが、速度はトリプシンの30分の1であった。phK2^{v217}を40%のhK2^{v217}とインキュベーションすると、2種のhK2形態の比の相違は6時間でさえも認められなかった(図17B)。このことはペプチド基質についての前記の所見を確認せしめ、そして天然基質に対してさえも、hK2^{v217}ではなく、hK2のみがhK2のプロ領域を切断した。

【0095】

これらの結果は長期間のインキュベーションの際のphK2^{v217}及びhK2^{v217}の安定性を総合的に実証する。hK2^{v217}と比較すると、hK2はより高いタンパク質分解活性、より高度な特異性、そして特に図15におけるプロペプチドに対する活性及び図17におけるphK2^{v217}に対するその活性により実証される通り、hK2のプロ形態に対する特異性を有することが示された。

【0096】

これらの結果はhK2とhK2^{v217}との間での酵素活性の有意な相違を示し、そしてphK2^{v217}と比較してのhK2を培地から精製する試みに伴う低収率の説明に役立つ。hK2の高純度調製品はその他の活性プロテアーゼについて認められるのと同様に自己分解により安定でないことがある。このような結果は、免疫学的試験に加え、hK2-特異的基質に対する酵素活性が体液中のこのタンパク質のレベルをモニターするのに使用できることを更に示唆する。

実施例 9

hK2とのインヒビター複合体の形成

PSAは2マクログロブリン(MG)及びセリンプロテアーゼインヒビターのアンチキモトリプシン(ACT)と複合体を形成することが示された。その複合体形成を開拓するため、hK2をヒト血漿の中に存在する一連の一般的なプロテアーゼ(ACT, 2-アンチプラスミン、アンチトロンピンIII、及び1-アンチトリプシン)(Travis and Salvesen, *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 655 (1983))とインキュベーションし、そしてその混合物をウェスタンブロットにより分析した(図18)。hK2とこのようなセルピンとの任意の共有複合体は還元条件下でのSDS/PAGEで約80~100kDのバンドをもたらすであろう。

【0097】

ACT及び2-アンチプラスミンはhK2と有意な複合体を形成した(図18、レーン1及び2)。アンチトロンピンIII(レーン3)及び1-アンチトリプシン(1プロテアーゼインヒビター、レーン4)はhK2と検出可能な複合体を形成しなかった。血漿の主要成分MGもhK2と直ちに複合した(レーン5)。この複合体は約200kD及び120kDのMrに相当し、それらはPSAを精製MGとインキュベーションしたときも形成された(図18、レーン8、下記参照)。hK2が広域なトリプシン様プロテアーゼを阻害するにもかかわらず1-アンチトリプシンと複合体を形成しないことは極めて興味深い(Loebermannら、*J. Mol. Biol.*, 177, 531 (1984); Carrell and Travis, *TIBS*, 10, 20 (1985))。

【0098】

hK2が2-アンチプラスミンと複合体を形成することは驚くべきことではなく、なぜならこのタンパク質はそのインヒビター活性部位にアルギニン残基を有するからである。(Hunt and Dayhoff, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 95, 864 (1980); Chandraら、*Biochemistry*, 22, 5055 (1983); Potempaら、*Science*, 241, 699 (1985); Shiehら、*J. Biol. Chem.*, 264, 13420 (1989); Mastら、*Biochemistry*, 30, 1723 (1991))。しかしながら、hK2がACTと複合体を形成することが予想し得ず、なぜならACTはそのインヒビター活性部位にロイシンを有するからである。明らかに、PSAとhK2との間での構造類似性は一般のインヒビターとの複合体形成を、たとえそのタンパク質分解特異性が図16及び表2に示されるように全体的に異なるにしても、影響を及ぼす。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】

女性ヒト血清の中に入ると、hK2はウェスタンブロットにより検出される通り、MGと直ちに複合体を形成する(図18)。レーン1及び3はそれぞれhK2及び血清のみのコントロールである。レーン2はACTとインキュベーションしたhK2であり、90kDのhK2-ACT複合体及び残留hK2を示す。レーン4及び5は血清の中にそれぞれ15分及び1時間入れたhK2である。レーン6は精製MGと4時間インキュベーションしたhK2である。レーン7は血清の中に15分入れたPSAであり、そしてレーン8は精製MGと4時間インキュベーションしたPSAである。

【 0 1 0 0 】

これらの結果はMGが、hK2又はPSAをin vitro実験でヒト血清の中に入れたときの主要複合体であることを示す。ACTとのPSA複合体は前立腺障害を有する患者の血清の中に認められることがわかっているため、血清の中に存在するhK2は若干のレベルのACT複合体も形成するようである。

10

実施例10前立腺組織とのモノクローナル抗体586の免疫反応性

hK2が前立腺において発現され、そしてもしそうなら前立腺癌と相関するかを調べるため、264の根治的(radical)前立腺切除検体(そのうちの257は未処置患者に由来し(図20)、そして7はアンドロゲン枯渇治療処置患者に由来する(図21))を対比試験において分析した。各検体を、良性上皮、高度前立腺内皮新形成(PIN)及びアデノ癌腫を有する領域におけるhK2の細胞質発現について分析した。

20

【 0 1 0 1 】

前立腺組織を秤量し、三次元で測定し、そしてインク塗りした。先端及び基底部分を厚さ4~5mmで切断し、そして3mmにて連続切片にした。残りの前立腺は前立腺の先端から精嚢の頂部に至るまで腺の長軸に対して垂直にナイフで4~5mm間隔で連続切片にした。横断切片を調製し、そしてヘマトキシリンとエオシンとで染色した。癌及び良性組織を包括する各患者の根治的前立腺切除検体の一枚の切片を10%の中性緩衝ホルマリンの中で固定し、そして当業界周知の方法によりパラフィンに包埋した。

【 0 1 0 2 】

スライド上の組織切片をキシレン及び95%のエタノールに浸してパラフィン除去した。内性ペルオキシダーゼ活性は、切片をメタノール/H₂O₂の中で10分インキュベーションし、次いで切片を水道水ですすぐことによりブロッキングした。切片を10mMのクエン酸バッファーpH6.0の中に入れ、そして30分スチーム処理した。切片を5分間冷却し、次いで低温水道流水ですすいだ。非特異的タンパク質結合は切片を5%のヤギ血清と10分インキュベーションすることによりブロッキングした。次いでスライドを静かに排液した。第一抗体hK1G586又はPSM773 0.5µg/mlを切片に室温で30分加えておき、次いで切片を水道水ですすいだ。切片をペルオキシダーゼコンジュゲーション化ストレプトアビジン(1:500)と30分インキュベーションし、次いで水道水ですすいだ。次に、切片を3-アミノ-9-エチルカルバゾール(ABC)発色原溶液と15分インキュベーションし、次いで水道水ですすいだ。切片を無水銀ヘマトキシリンでカウンター染色し、そして流水で5分すすいだ。スライドを水性マウンティング媒体(グリセロールゼラチン)に載せた。染色された細胞の%を、良性上皮、高度PIN及びアデノ癌腫について0~100%の間で10%の間隔で記録した。

30

40

【 0 1 0 3 】

良性萎縮腺は、特に炎症領域(そこでは事実上免疫反応がなかった)は最低量の染色を示した。萎縮の徴候のない過形成房腺及び良性房腺においては、往々にして管腔表層にまで広がる核のすぐ上の分泌性管腔細胞表層における顆粒模様で通常認められる、中程度から強い免疫反応性があった。尿道又はビバ・モンタヌム(viva montanum)の尿上皮の染色は、下層の腺が往々にして免疫反応性を示さないにもかかわらず、認められなかった。基底細胞は通常ネガティブであった。

【 0 1 0 4 】

50

高度なPINを示す検体は大半のケースにおいて細胞質全体を通じて及び細胞質先端小気胞において強い免疫反応性を示した。種々のPINパターン間で、篩状パターンを除き免疫反応性において明確な相違はなく、かかる篩状パターンは通常、外周と比べて中央で強度が減少した。

【0105】

癌腫抗体は事実上全てのケースにおいて強い細胞質反応性を示した。豊富な細胞質小胞を有する細胞、例えば印環細胞及びムチンの領域は低い染色性を示した。その他では細胞質は強く染色された。最大の強度は高度アデノ癌腫において認められ(Gleasonパターン4)、それは事実上全ケースにおいて免疫反応性を示した。篩状癌腫を有する焦点は篩状PINと、中央より外周に強めの強度がある点で類似していた。癌腫の周辺及びその手前の縁は常に強く免疫反応性であった。

10

【0106】

アンドロゲン枯渇治療を受けた患者由来の7検体において、良性萎縮房腺の大半において免疫反応性はほとんど又は全くなかったが、PIN及びアデノ癌腫は往々にして強い細胞質染色を示した。

【0107】

良性上皮、高度PIN及びアデノ癌腫におけるモノクローナル抗体HK1G586により染色された細胞数のまとめを表3に示す。ペア式分析、即ち、良性対PIN、良性対癌腫、及びPIN対癌腫は各カテゴリーについて有意な相違を示した(P<0.001, Spearman級相関)。

20

【0108】

【表3】

表 3
hK1G586 との免疫反応性

	平均	標準偏差%
良性上皮	44.3%	10~90
高度 PIN	69.1%	20~100
アデノ癌腫 (未処置)	80.0%	20~100

30

【0109】

即ち、前立腺組織における細胞質hK2発現の上昇は前立腺新形成及び癌に相関する。アンドロゲン枯渇治療処置患者から獲得した前立腺由来のデータはサンプルサイズの小ささを理由に統計学的に有意でないが、これらの患者においては、未処置患者と比べ、良性上皮、高度PIN及びアデノ癌腫においてhK2発現の低下があった。即ち、前立腺におけるhK2発現の上昇は高度PIN及び前立腺癌にとっての新規のマーカーである。

40

考 察

PSA又はhK2についてのin vivoタンパク質プロセッシング及び分泌メカニズムはわかっていない。ここに示す結果はphK2がAV12-hK2, DU145-hK2及びPC3-hK2細胞により分泌されることを示し、hK2がphK2として通常分泌され、そしてこのプロペプチドが細胞外で切断されることを示唆する。このことはphK2が生物流体の中に存在し、そしてpCa又はBPHについての有用な診断マーカーでありうることを示唆する。

【0110】

hK2の突然変異形態(hK2^{v217})及びhK2の野生型の双方がAV12細胞から精製された。hK2は採用した精製手順に対して非常に不安定であり、それは他のプロテアーゼにより認

50

められるように、その自己触媒特性に原因し得、そしてhK2又はphK2を免疫原及びキャリアプレーターとして使用するのに十分な量で精製することを非常に困難なものとする。他方、phK2^{v217}は非常に安定であり、そしてトリプシン消化により、これも安定であるhK2^{v217}に変換される。精製phK2^{v217}及びhK2^{v217}はhK2及びphK2に特異的なmRNAを作製するための免疫原を担う。

【0111】

本発明を詳細に説明してきたが、本発明はその範囲を逸脱することなく改良及び変更されうる。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】野生型成熟hK2 (SEQ ID NO: 12) 及びhK3 (SEQ ID NO: 7) のアミノ酸配列を示す。

【図2】野生型pphK2 (それぞれSEQ ID NO: 14及びSEQ ID NO: 15)、phK2 (SEQ ID NO: 16及びSEQ ID NO: 17)、並びにhK2 (SEQ ID NO: 12及びSEQ ID NO: 13) のアミノ酸配列及び対応の核酸配列を示す。コドン217 (GCT, Ala)は太字で示し、そして下線を付した。

【図3】pGT 発現ベクター pGThK2 及び pGThK2^{v217} の模式図である。

【図4】phK2^{v217}の精製に由来するクロマトグラフィープロフィールを示す。(A) pphK2^{v217}をコードするベクターでトランスフェクションされたAV12細胞由来の7日目の消費培地のDEAEクロマトグラフィー図。使用培地のサンプルを炭酸水素バッファーpH8に入れ、そして塩勾配で溶出させた。A₂₈₀ 溶出プロフィールを実線で示す。点線は個々のカラム画分の一部のELISA アッセイの結果であり、それらの画分はマイクロタイタープレート上で乾かし、そしてウサギ抗 - pphK2 抗体で発色させたものである。(B) プールしたDEAE画分の疎水性相互作用プロフィール。(A) のDEAEクロマトグラフィー溶出物由来の画分24~30をプールし、濃縮し、そして1.2Mの硫酸ナトリウムでHIC(疎水性相互作用カラム)に載せ、そして降下式塩勾配で溶出させた。溶出プロフィール(A₂₈₀)を実線で示す。点線は個々のカラム画分の一部のELISA アッセイ結果であり、画分はマイクロタイタープレート上で乾かし、そしてウサギ抗 - hK2 抗体で発色させたものである。(C) (B)からの22分ピーク由来のhK2含有画分を濃縮し、そしてPharmacia S12サイズ排除カラムに載せる。画分を集め、そしてSDS/PAGEにより分析した。19.4分のピークはSDS-PAGEにより均質であることが明らかとされた。

【図5】精製したhK2及びPSAのSDS/PAGE分析である。精製phK2^{v217}又はPSAの1.5mgのサンプルを1%のベーターメルカプトエタノール入りで(R)又は抜きで(N)サンプルバッファー中で煮沸した。サンプルを4~20%のゲル上でSDS/PAGEにかけた。タンパク質バンドはゲルを銀染色により識別化した。

【図6】phK2^{v217}のコンコナバリンA染色を示す。phK2の推定位置を矢印で示す。ZCE(抗-CEAmAb)及びBSAをそれぞれグリコシル化及び非グリコシル化タンパク質の例として含ませた。phK2レーンにおける推定位置でのバンドの存在はこのタンパク質がグリコシル化されていることを実証する。

【図7】トリプシン切断によるプロから成熟hK2^{v217}に至る変換を示す。トリプシン(1% w/w)をphK2^{v217}と10分間37°Cにおいて10mMの硼酸バッファーpH8中でインキュベーションし、次いでHIC-HPLCにかけた。破線はトリプシンとのインキュベーション前のphK2^{v217}のプロフィールを示す。実線はトリプシン消化後のphK2のプロフィールである。プロフィールを対比のために重ね合わせた。二形態の同一性はタンパク質のN末端配列決定により確認した。

【図8】モノクローナル抗体(mAb) hK1G586.1を利用する精液のウェスタンブロット分析を示す。処理済みの精液をPBSの中で1:1に希釈し、そして10,000×gで20分遠心分離した。上清液をPhastSystem (Pharmacia)を用い8~25%のゲル上でのSDS/PAGEにかけた。タンパク質をニトロセルロースに転写し、そしてプロテインG精製したHK1G586.1(1µg/ml)、次いでヤギ抗-マウスIgG-HRP(1:1000)とインキュベーションした。こ

10

20

30

40

50

のプロットをECL 検出システム (Amersham) を用いて展開させた。

【図 9】 AV12細胞におけるhK2 発現の経時的研究を示す。AV12 - hK2 クローン # 27を約60 ~ 70%の集密度に至るまで増殖させ、次いで細胞をHBSSで洗い、そして無血清HH4 培地を添加した。消費培地を毎日抜き取り、濃縮し、そして12%のゲル上での SDS / PAGEにかけた。タンパク質をエレクトロブロッティングし、そして pHK2 及びhK2 (1 : 1000) の双方を検出するモノクローナル抗体HK1D106.4、又は pHK2 (1 : 1000) を検出するHK1G464.3、次いでヤギ抗 - マウス IgG - HRP (1 : 500) とプロービングした。このプロットをECL (Amersham) により、その製造者の仕様に従って展開した。精製した pHK2^{v217} 及びhK2^{v217} をコントロールとして用いた。hK2 の位置は矢印で示す。

【図 10】 トランスフェクションしたAV12細胞におけるhK2 の変異形態の発現の経時的研究である。約60 ~ 70%の集密度において、AV12 - hK2^{v217} 細胞をHBSSで洗い、そして無血清HH4 培地を加えた。消費培地を毎日抜き取り、濃縮し、そして12%ゲル上で SDS / PAGEにかけた。タンパク質をエレクトロブロッティングし、そしてモノクローナル抗体HK1D106.4 及びHK1G464.3 でプロービングした。ヤギ抗 - マウス IgG - HRP (1 : 500) を第二抗体として用い、そしてプロットをECL (Amersham) により製造者の仕様に従って展開した。精製した pHK2^{v217} 及びhK2^{v217} をコントロールとして用いた。hK2 の位置を矢印で示す。

【図 11】 経時的なhK2 発現及び細胞生存率のプロットである。AV12 - hK2 クローン # 27を60 ~ 70%の集密度に至るまで増殖させ、HBSSで洗い、そして無血清HH4 培地を加えた。消費培地を毎日抜き取り、そしてhK2 濃度を第一抗体としてのHK1D106.4 又はHK1G464.3 及び第二抗体としてのヤギ抗 - マウス IgG - HRP を用いるELISA により測定した。反応をOPD (Sigma, St. Louis, MO) で発色させた。生存細胞をトリパンブルー色素排出を利用して毎日計測した。

【図 12】 PC3 及びDU145 細胞におけるhK2 の発現を示す。pGThK2 でトランスフェクションしたPC3 及びDU145 細胞を約60 ~ 70%の集密度に至るまで増殖させ、洗浄し、そして無血清HH4 培地の中に再懸濁した。pGThK2 トランスフェクションしたDU145 細胞の消費培地を再懸濁の3日後に集め、そしてpGThK2 トランスフェクションしたPC3 細胞の消費培地は再懸濁の5日後に集めた。上記の通りにしてタンパク質をエレクトロブロッティングし、そしてHK1D106.4 又はHK1G464.3 でプロービングした。精製 pHK2^{v217} 及び pHK2^{v217} をコントロールとして用いた。hK2 の位置を矢印で示す。

【図 13】 選定のhK2 含有AV12クローンによるhK2 の発現を示す。hK2 含有AV12クローン番号10, 27, 31及び32を含む細胞を約60 ~ 70%の集密度に至るまで増殖させ、そしてHBSSで洗い、次いで無血清HH4 培地を加えた。無血清培地を添加して7日後に消費培地を抜き取り、濃縮し、そして12%のゲル上での SDS / PAGEにかけた。タンパク質をエレクトロブロッティングし、そしてHK1D106.4 及びHK1G464.3 でプロービングした。ヤギ抗 - マウス IgG - HRP (1 : 500) を第二抗体として用い、そしてプロットをECL (Amersham) によりその製造者の仕様に従って展開した。精製した pHK2^{v217} 及びpK2^{v217} をコントロールとして用いた。hK2 の位置を矢印で示す。

【図 14】 選定のAV12 - hK2^{v217} クローンにおける pHK2^{v217} の発現を示す。AV12クローン番号2, 3, 4, 45及び48由来の細胞を約60 ~ 70%の集密度に至るまで増殖させ、そしてHBSSで洗い、そして無血清HH4 培地を加えた。無血清培地を添加して7日後に消費培地を抜き取り、濃縮し、そして12%のゲル上での SDS / PAGEにかけた。タンパク質をエレクトロブロッティングし、そしてHK1D106.4 及びHK1G464.3 でプロービングした。ヤギ抗 - マウス IgG - HRP (1 : 500) を第二抗体として用い、そしてそのプロットをECL (Amersham) により製造者の仕様に従って展開した。精製 pHK2^{v217} 及びpK2^{v217} をコントロールとして用いた。hK2 の位置は矢印で示す。

【図 15】 hK2 の残基 210 ~ 236 に対するhK2^{v217}, hK2 及びPSA のアミド分解特異性を示す。合成ペプチド (0.63mM) を37 °C で一夜 1 µg / ml のhK2, 40 µg / ml のhK2^{v217} 又は 100 µg / ml のPSA で消化し、そして消化生成物をRP - HPLCにより分離した。ピークを標準化して切断の定性的態様を比較した。

【図 16】 様々なペプチド基質に対するhK2 及びPSA の特異性を示す。白抜き矢印はPSA

10

20

30

40

50

により切断したペプチド結合を示し；黒塗り矢印はhK2により切断した結合を示す。ペプチド#1はhK2のアミノ酸残基210~236を示す。ペプチド#2はアンジオテンシノーゲンのアミノ酸残基1~14、即ち、レニン基質テトラデカペプチドを示す。ペプチド#3はphK2のアミノ酸残基-7~+7を示す。ペプチド#4はhK2のアミノ酸残基41~56を示す。ペプチド#5はインスリンの酸化型ペター鎖のアミノ酸配列を示す。ペプチド#6はPMSAのアミノ酸残基196~213を示す。

【図17】hK2^{v217}ではなく、hK2によるphK2^{v217}の活性化を示す。phK2^{v217}はhK2^{v217}には存在しない配列であるプロリターペプチド配列VPLIQSRを含む。パネルAは1% w/wのhK2とインキュベーションしたphK2^{v217}を示す。パネルBはphK2^{v217}と6時間インキュベーションした40% w/wのhK2^{v217}によるコントロールである。

10

【図18】プロテアーゼインヒビターとインキュベーションしたhK2のウェスタンブロット分析を示す。各サンプルを8~25%勾配SDS-PAGEで分離し、ブロッティングし、そしてHK1G586.1でプロービングした。hK2を37で4時間、下記のインヒビターとインキュベーションした：レーン1：アンチキモトリプシン(ACT)；レーン2：アルファ-2-アンチプラスミン；レーン3：アンチトロンピンIII；レーン4：アルファ-1-プロテアーゼインヒビター(アンチトリプシン)；レーン5：アルファ-2-マクログロブリン；レーン1及び2は90~100kDの推定Mrの共有複合体を示す。セルピンインヒビターは20μMで、マクログロブリンは2.8μMで、そしてhK2は0.175μMで使用した。レーン5はhK2とアルファ-2-マクログロブリンとの共有複合体形成を示す高Mr複合体を示す。

【図19】ヒト血清中でのhK2の複合体形成を示す。hK2及びPSAのウェスタンブロットをヒト血清とインキュベーションした。hK2サンプルをHK1G586.1により、そしてPSAサンプルをPSM773抗-PSAmAbでプロービングした。レーン1~6はhK2サンプルを含み、そしてレーン7及び8はPSAサンプルを含む。レーン1はhK2コントロールである。レーン2はACTと4時間インキュベーションしたhK2を含む。レーン3はプロテアーゼの添加していない血清コントロールを示す。レーン4は血清と15分インキュベーションしたhK2を含む。レーン5は血清と4時間インキュベーションしたhK2を示す。レーン6は精製アルファ-2マクログロブリンと4時間インキュベーションしたhK2を含む。レーン7は血清と4時間インキュベーションしたPSAを含む。レーン8は精製アルファ-2-マクログロブリンと4時間インキュベーションしたPSAを含む。

20

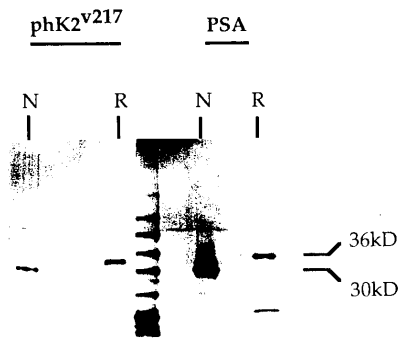
【図20】未処理ヒト前立腺のモノクローナル抗体hK1G586の免疫反応性。n=257。

30

【図21】アンドロゲン枯渇治療-処理ヒト前立腺のモノクローナル抗体hK1G586の免疫反応性。n=7。

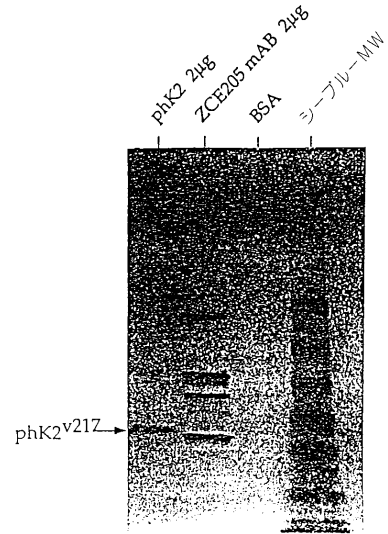
【 図 5 】

図5



【 図 6 】

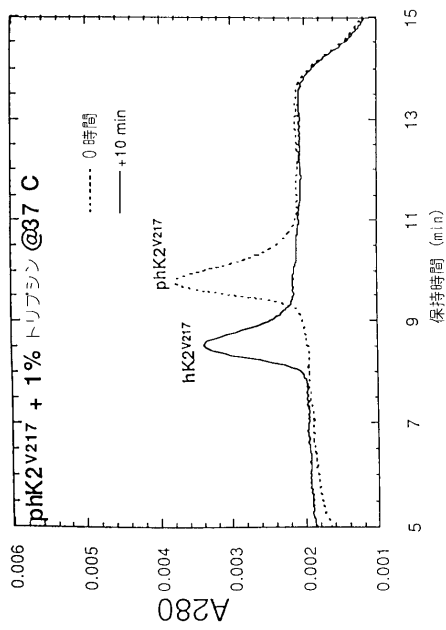
図6



— Con A - dig
 — αdig - HRP

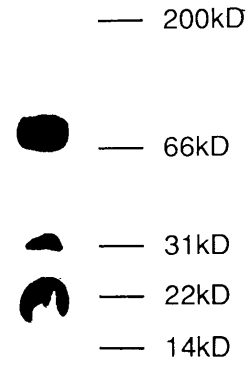
【 図 7 】

図7



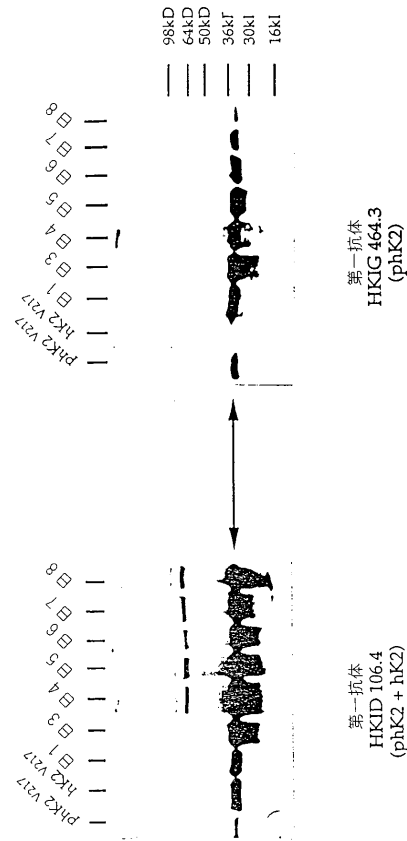
【 図 8 】

図8



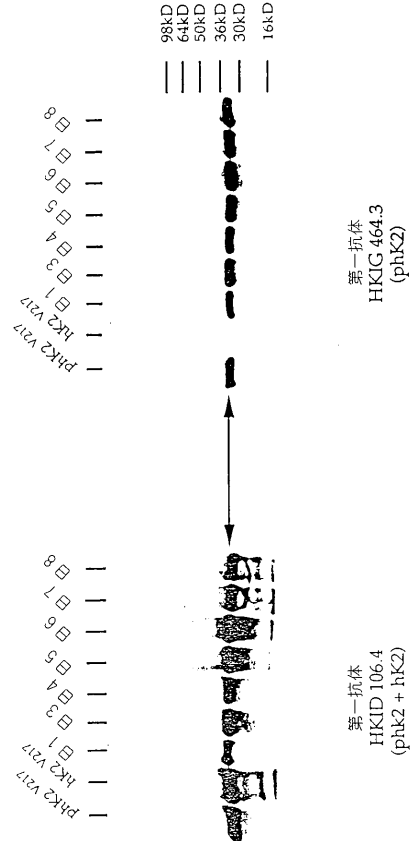
【 図 9 】

図9



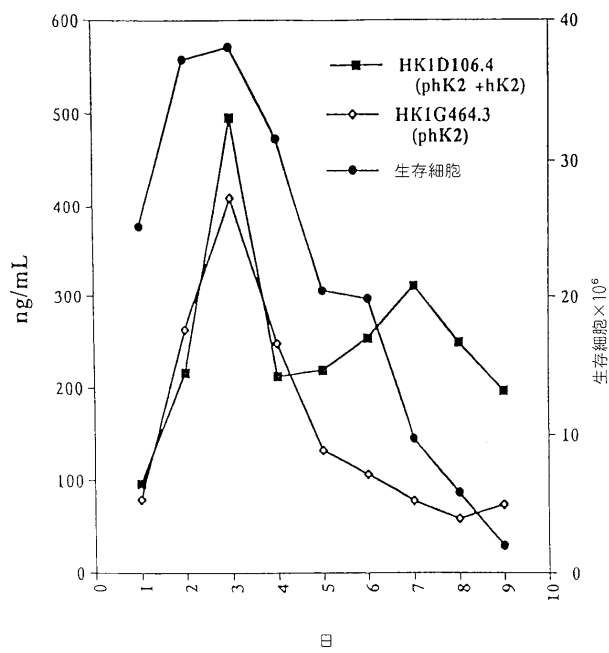
【 図 10 】

図10



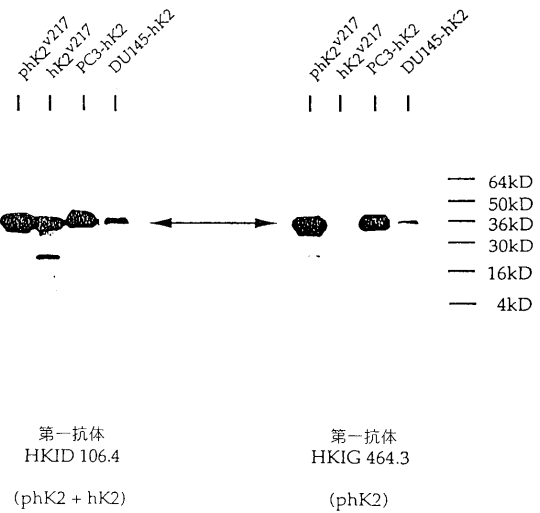
【 図 11 】

図11



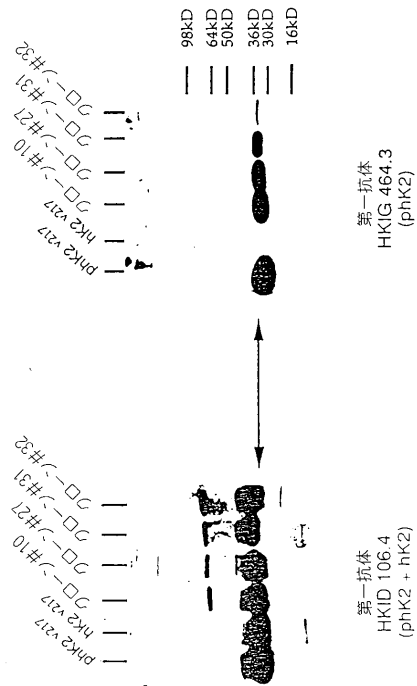
【 図 12 】

図12



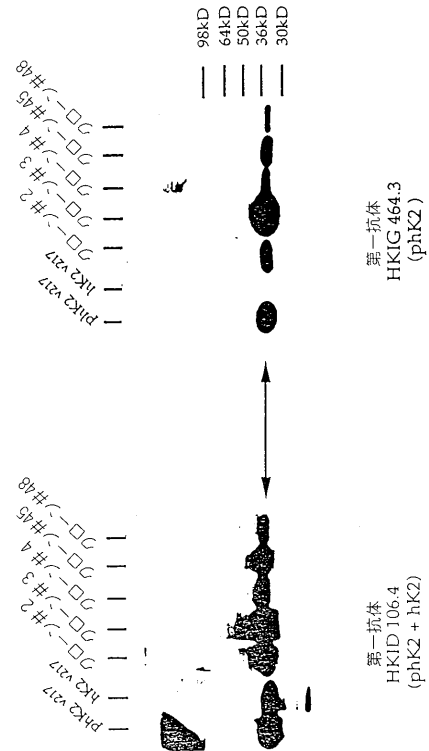
【 図 1 3 】

図13



【 図 1 4 】

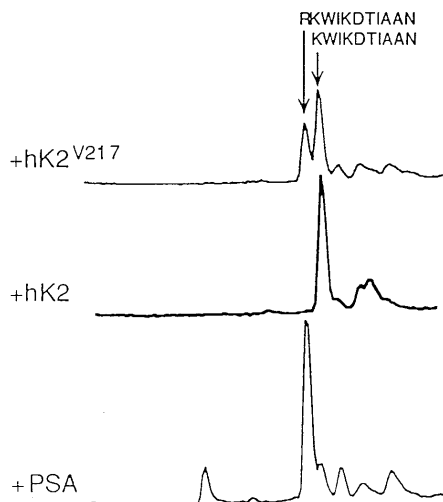
図14



【 図 1 5 】

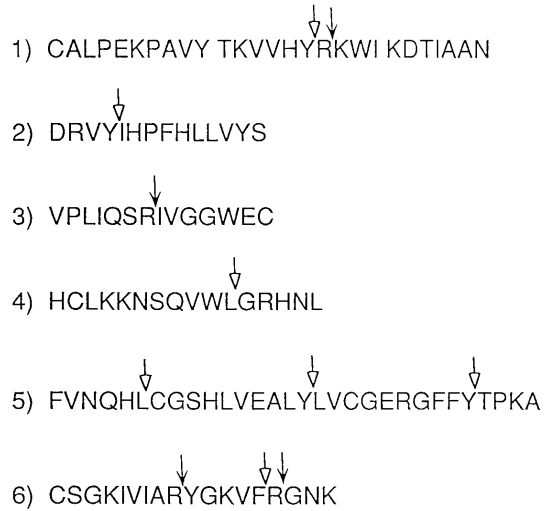
図15

ペプチド = CALPEKPAVYTKVVHYRKWKIDTIAAN
 消化物の RP HPLC プロフィール :



【 図 1 6 】

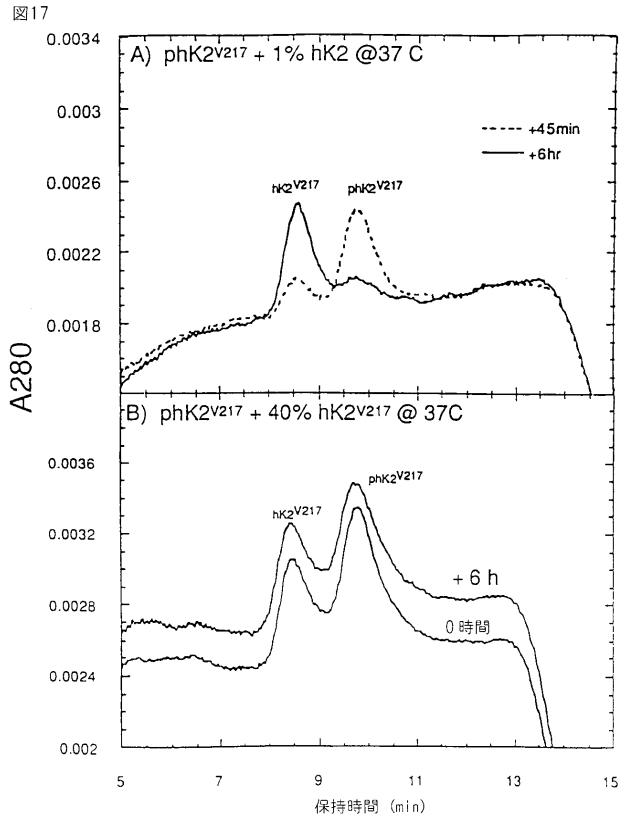
図16



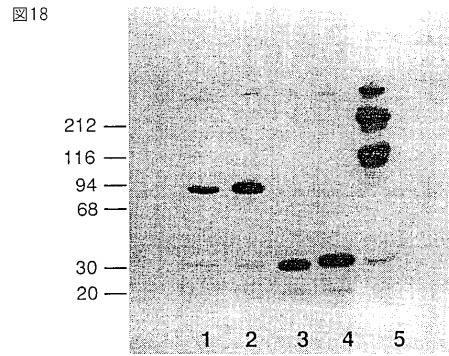
↓ = PSA ↓ = hK2

R= Arg; K= Lys; Y=Tyr; F= Phe; L= Leu; T= Thr

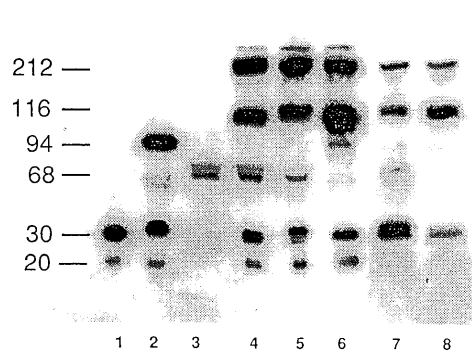
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】

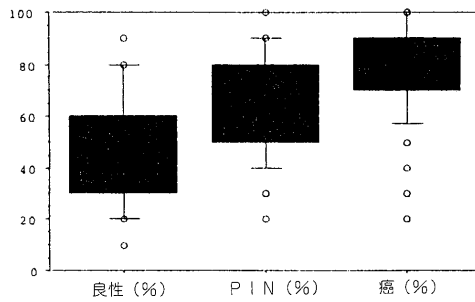


【 図 1 9 】



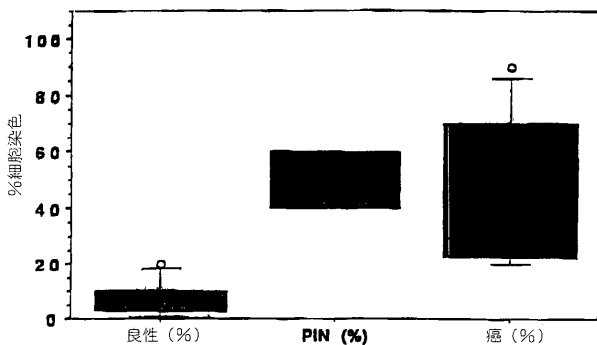
【 図 2 0 】

図20 ヒト前立腺におけるHK2 586 に対する免疫反応性



【 図 2 1 】

図21 ヒト前立腺におけるHK2 586 に対する免疫反応性



【手続補正書】

【提出日】平成18年8月17日(2006.8.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

野生型hK2ポリペプチドと比べて少なくとも1個のアミノ酸置換を有し、そしてこの置換がそのポリペプチド変異体に対応の野生型成熟hK2ポリペプチドよりも精製に対してより安定なものにする、単離精製されたプレ-プロ又はプロhK2ポリペプチド変異体に特異的に結合し、そしてhK3には結合しない抗体。

【請求項2】

hK2ポリペプチド変異体にも結合する、請求項1記載の抗体。

【請求項3】

前記野生型hK2ポリペプチドのプレ-プロ又はプロ形態にも結合する、請求項1記載の抗体。

【請求項4】

hK2ポリペプチド変異体の成熟形態には結合しない、請求項1記載の抗体。

【請求項5】

183位のアスパラギン酸、206位のグリシン、217位のアラニン、189位のセリン、96位のアスパラギン酸、41位のヒスチジン、205位のセリン、204位のトリプトファン、187位のグリシン及び188位のアスパラギン酸より成る群から選ばれるアミノ酸置換を有し、ここでこの置換はこのポリペプチド変異体を野生型成熟hK2ポリペプチドよりも精製に対して安定なものにする、単離精製された成熟hK2ポリペプチド変異体に特異的に結合し、そしてhK3には結合しない抗体。

【請求項6】

野生型hK2ポリペプチドの成熟形態にも結合する、請求項5記載の抗体。

【請求項7】

hK2ポリペプチド変異体のプロ形態又は野生型hK2ポリペプチドのプロ形態には結合しない、請求項5記載の抗体。

【請求項8】

hK2ポリペプチド変異体のプレ-プロ形態又は野生型hK2ポリペプチドのプレ-プロ形態には結合しない、請求項5記載の抗体。

【請求項9】

モノクローナル抗体である請求項1又は5記載の抗体。

【請求項10】

請求項1又は5記載の抗体を含んで成るポリクローナル抗体調製品。

【請求項11】

請求項1又は5記載の抗体より本質的に成るモノクローナル抗体調製品。

【請求項12】

請求項1又は5記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P	13/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
(74)代理人 100086276			
弁理士 吉田 維夫			
(74)代理人 100082898			
弁理士 西山 雅也			
(72)発明者 サエディ, モハマド エス.			
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 6, サンディエゴ, ヘンドリックス ドライブ 7 8 9 8			
(72)発明者 ミコライックジック, スティーブン デー.			
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 1 7, サンディエゴ, コンラド アベニュー 4 0 5 2			
(72)発明者 ティンダール, ドナルド ジェイ.			
アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 9 0 1, ロチェスター, テレマーク レーン 2 3 0 4			
(72)発明者 ロッシェ, パトリック シー.			
アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 9 0 2, ロチェスター, シックスティーンズ ストリート サウス ウェスト 4 1 0			
(72)発明者 ポストウィック, デビッド ジー.			
アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 9 0 2, ロチェスター, オーダズ レーンサウス ウェスト 1 1 4 2			
(72)発明者 クマー, アブハイ			
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 2, サンディエゴ, ユニット 6 2 2 3, パルミラ ドライブ 7 6 7 5			
(72)発明者 クースーレイチェル, クリスティーン			
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 1 6, サンディエゴ, リッチフィールド ロード 5 0 4 7			
Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA05 CA11 DA02			
4B050 CC04 DD11 FF05 FF12 FF14 LL01			
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01			
4B065 AA91X AA92X AB05 BA08 CA25 CA44 CA46			
4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 CC04 CC05 DD22 DD23 EE01 FF24			
GG01			
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA28 EA51 FA74			

专利名称(译)	稳定的HK2多肽变体		
公开(公告)号	JP2006314327A	公开(公告)日	2006-11-24
申请号	JP2006201247	申请日	2006-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	Hybritech Incorporated的雷开球德 梅约医学教育与研究基金会		
申请(专利权)人(译)	Hybritech Incorporated的雷开球德 梅奥基金会的医学教育和研究		
[标]发明人	サエディモハマドエス ミコライツクジックステイーブンデー ティンダールドナルドジェイ ロッシェパトリックシー ポストウィックデビッドジー クマーアブハイ クースーレイチェルクリスティーン		
发明人	サエディ,モハマド エス. ミコライツクジック,ステイーブンデー. ティンダール,ドナルドジェイ. ロッシェ,パトリックシー. ポストウィック,デビッドジー. クマー,アブハイ クースーレイチェル,クリスティーン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N9/64 C07K16/40 C12N5/10 A61K39/00 A61P13/08 A61P35/00 G01N33/53 C12P21/08 A61K38/00 A61K39/395 A61P37/04 A61P43/00 C12R1/91 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61P13/08 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K16/40 C12N9/6445 C12N2799/026		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N9/64.A C07K16/40 C12N5/00.B A61K39/00.H A61P13/08 A61P35/00 G01N33/53.D C12P21/08 C07K16/40.ZNA C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/DA02 4B050/CC04 4B050/DD11 4B050/FF05 4B050/FF12 4B050/FF14 4B050/LL01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/FF24 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	08/427767 1995-05-02 US 08/622046 1996-03-26 US		
其他公开文献	JP4205738B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供编码hK2多肽变体的分离的核酸分子。解决方案：分离的核酸编码pre-pro或pro hK2多肽变体，与野生型hK2多肽相比具有至少一个氨基酸取代基，并且比野生型hK2多肽更稳定。 Z

mAbs	PSA	hK2 ^{*217}	phK2 ^{*217}
無関係なAb	0.245	0.162	0.125
陽性コントロール	2.242±0.06	9.196	8.91±0.02
HK1G586.1 (10μg/ml)	0.150±0.004	11.154±0.18	10.146±0.87
HK1G464.3 (腹水1:2000)	0.143±0.03	0.245±0.02	6.644±0.17