

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3946044号  
(P3946044)

(45) 発行日 平成19年7月18日(2007.7.18)

(24) 登録日 平成19年4月20日(2007.4.20)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

請求項の数 24 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-554420 (P2001-554420)	(73) 特許権者	501398064
(86) (22) 出願日	平成13年1月26日(2001.1.26)		アジェンシス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2003-520605 (P2003-520605A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 904
(43) 公表日	平成15年7月8日(2003.7.8)		04, サンタ モニカ, 17ティーエ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/002651		イチ ストリート 1545
(87) 国際公開番号	W02001/055391	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成13年8月2日(2001.8.2)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成15年2月7日(2003.2.7)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/178,560		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成12年1月26日(2000.1.26)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
前置審査		(72) 発明者	ジャコボビッツ, アヤ
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 902
			10, ビバリー ヒルズ, ハットン
			ドライブ 3135

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 84P2A9：前立腺癌において高度に発現される前立腺および精巣特異的タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

84P2A9タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ここで、該ポリヌクレオチドは、以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド残基番号163からヌクレオチド残基番号1674の配列を含むポリヌクレオチド；または

(b) 配列番号1のヌクレオチド残基番号163からヌクレオチド残基番号1674の配列を含むポリヌクレオチドであって、ここで、Tは、Uでもあり得る、ポリヌクレオチド；

のいずれかである、ポリヌクレオチド。

【請求項2】

請求項1の(a)または(b)のいずれかのポリヌクレオチドに完全に相補的である、ポリヌクレオチド。

【請求項3】

配列番号2に示されるポリペプチド配列をコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む、組換え発現ベクター。

【請求項5】

請求項4に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

## 【請求項 6】

細菌細胞である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 7】

8 4 P 2 A 9 タンパク質（配列番号 2）を産生するためのプロセスであって、該 8 4 P 2 A 9 タンパク質の産生に十分な条件下で、請求項 5 または 6 に記載の宿主細胞を培養する工程を包含する、プロセス。

## 【請求項 8】

産生された前記 8 4 P 2 A 9 タンパク質を回収する工程をさらに包含する、請求項 7 に記載のプロセス。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載のプロセスによって産生された、8 4 P 2 A 9 タンパク質。

10

## 【請求項 10】

配列番号 2 を含む、単離された 8 4 P 2 A 9 タンパク質。

## 【請求項 11】

8 4 P 2 A 9 タンパク質（配列番号 2）に存在するエピトープに免疫特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 12】

モノクローナルである、請求項 11 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 13】

請求項 12 に記載の抗体を産生する、ハイブリドーマ。

20

## 【請求項 14】

前記フラグメントは、F a b フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント、または F v フラグメントである、請求項 11 または 12 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 15】

物質で標識されている、請求項 11、12、または 14 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 16】

前記物質は、放射性同位体、化学療法剤、および毒素からなる群より選択される、請求項 15 に記載の抗体またはそのフラグメント。

30

## 【請求項 17】

前記放射性同位体は、<sup>211</sup>A t、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>90</sup>Y、<sup>186</sup>R e、<sup>188</sup>R e、<sup>153</sup>S m、<sup>212</sup>B i、<sup>32</sup>P および L u の放射性同位体からなる群より選択される、請求項 16 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 18】

請求項 11、12、または 14 ~ 17 のうちのいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントであって、該抗体またはそのフラグメントは、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 19】

試験サンプル中の 8 4 P 2 A 9 タンパク質（配列番号 2）または 8 4 P 2 A 9 ポリヌクレオチド（配列番号 1）の存在を検出するための方法であって、

40

それぞれ、該 8 4 P 2 A 9 タンパク質または 8 4 P 2 A 9 ポリヌクレオチドに特異的に結合する、それぞれ、抗体、または請求項 1 の ( a ) もしくは ( b ) のいずれかのポリヌクレオチドに対して完全に相補的であるポリヌクレオチドを、該サンプルに接触させる工程、および

それらに対する該サンプル中の、それぞれ、8 4 P 2 A 9 タンパク質または 8 4 P 2 A 9 ポリヌクレオチドの結合を検出する工程を包含する、方法。

## 【請求項 20】

前記ポリヌクレオチドは m R N A である、請求項 19 に記載の方法。

50

## 【請求項 2 1】

前記ポリヌクレオチドは、逆転写によって前記サンプルから生成される c D N A である、請求項 1 9 に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

請求項 1 9 ~ 2 1 のうちのいずれか 1 項に記載の方法であって、

前記決定する工程は、前記 8 4 P 2 A 9 タンパク質または 8 4 P 2 A 9 ポリヌクレオチドに特異的に結合する、抗体またはポリヌクレオチドの結合量を、対応する正常サンプル中の該タンパク質またはポリヌクレオチドの存在と比較する工程を包含する、方法。

## 【請求項 2 3】

前記正常組織サンプルと比較した前記試験サンプル中での増加した 8 4 P 2 A 9 ポリヌクレオチドまたは 8 4 P 2 A 9 タンパク質の存在が、癌の存在の指標を提供する、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の方法であって、前記癌は、白血病、ならびに前立腺、精巣、腎臓、脳、骨、皮膚、卵巣、乳房、膵臓、結腸および肺の癌からなる群より選択され、そして前記試験組織サンプルおよび正常組織サンプルが、血清、血液または尿、ならびに前立腺、精巣、腎臓、脳、骨、皮膚、卵巣、乳房、膵臓、結腸および肺の組織からなる群より選択される、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願は、2000年1月26日に出願された米国仮特許出願番号60/178,560の利益を主張し、この内容全体は、本明細書中に参考として援用される。

## 【0002】

(発明の分野)

本明細書中に記載された発明は、新規な遺伝子およびそのコードするタンパク質(84P2A9と称される)に関し、そして84P2A9を発現する種々の癌、特に前立腺癌の管理において有用な診断および治療の方法および組成物に関する。

## 【0003】

(発明の背景)

ガンは、冠状動脈疾患(coronary disease)に次いで、第2の主なヒトの死亡原因である。全世界的に、数百万の人々が、毎年癌により死亡している。米国単独では、癌は毎年50万人をはるかに超える人々の死亡原因であり、毎年140万あまりの新たな症例が診断されている。心臓疾患での死亡は、有意に減少している一方で、癌に起因する死亡は、一般に増加の傾向にある。来世紀の初期には、癌は死亡の主原因になると予測されている。

## 【0004】

全世界で、いくつかの癌が主要な死亡原因(killer)として顕著である。特に、肺、前立腺、乳房、結腸、膵臓、および卵巣の癌腫は、主要な癌の死亡原因の代表である。これらおよび事実上全ての他の癌腫は、共通する致死的特徴を共有している。ごくわずかな例外はあるが、癌腫が原因の転移性疾患は、致命的である。さらに、初期の段階ではその原発性癌を生き延びた癌患者についてすら、その生活が劇的に変化したという共通の経験が示されている。多くの癌患者は、再発または処置の失敗についての可能性を承知しているために駆り立てられる、強い不安を経験している。多くの癌患者は、処置後に肉体的衰弱を経験している。さらに、多くの癌患者は、再発を経験している。

## 【0005】

全世界で、前立腺癌は、男性において4番目に最も一般的な癌である。北部アメリカおよび北欧では、はるかに、最も一般的な男性の癌であり、そして男性における癌による死亡の2番目の主原因である。米国単独では、肺癌のみに次いで、40,000人をはるかに超える男性がこの疾患で毎年死亡している。これらの数字の規模にもかかわらず、転移性

10

20

30

40

50

の前立腺癌に対する有効な処置は未だ存在しない。外科的前立腺切除、放射線療法、ホルモン除去 (hormone ablation) 療法、外科的去勢および化学療法は、主要な処置様式であり続けている。不運にも、これらの処置は、多くに対して有効でなく、かつしばしば、所望されない結果を付随する。

【0006】

診断現場において、初期ステージの局在化した腫瘍を正確に検出し得る前立腺腫瘍マーカーが存在しないことは、依然としてこの疾患の診断および管理における大きな限界を残している。血清の前立腺特異抗原 (PSA) アッセイは非常に有用なツールであるが、その特異性および一般的利用性は、いくつかの重要な点が欠如していると広く考えられている。

10

【0007】

前立腺癌についてのさらなる特異的マーカーを同定することにおける進歩は、マウスにおける疾患の異なるステージを再現し得る前立腺癌異種移植片の生成により改善されてきた。LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) 異種移植片は、重症複合型免疫不全 (SCID) マウスにおける経過を生き延び、かつアンドロゲン依存性からアンドロゲン非依存性への移行を模倣する能力を示した前立腺癌異種移植片である (Kleinら、1997、Nat. Med. 3: 402)。より近年同定された前立腺癌マーカーとしては、PCTA-1 (Suzら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252)、前立腺特異膜 (PSM) 抗原 (Pintoら、Clin. Cancer Res. 1996 Sep; 2(9): 1445-51)、S

20

【0008】

PSA、PSM、PCTAおよびPSCAのような以前に同定されたマーカーは、前立腺癌を診断し、そしてこれを処置する取り組みを促進したが、診断および治療をさらに改善するために、前立腺癌および関連する癌に対するさらなるマーカーおよび治療標的を同定する必要がある。

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、新規の、広く前立腺および精巣に関連した、84P2A9と称する遺伝子に関する。この遺伝子は、前立腺、精巣、腎臓、脳、骨、皮膚、卵巣、乳房、膵臓、結腸、リンパ球および肺の癌を含む複数の癌において過剰発現する。正常な組織における84P2A9遺伝子発現のノーザンブロット発現分析は、成体の組織における前立腺および精巣に関連した高度な発現パターンを示す。正常な前立腺および前立腺腫瘍異種移植片における84P2A9発現の分析は、LAPC-4およびLAPC-9前立腺腫瘍異種移植片において過剰発現を示す (LAPC-9において最も高い発現)。84P2A9のヌクレオチド (配列番号1) 配列およびアミノ酸 (配列番号2) 配列を、図2に示す。84P2A9アミノ酸配列の位置は、dbESTデータベース中のESTにいくらかの相同性を示す。84P2A9の、正常な成体組織におけるこの前立腺および精巣関連の発現プロフィールは、前立腺腫瘍異種移植片において観察される過剰発現と共に、84P2A9が、少なくともいくつかの癌において異常に過剰発現し、従って、癌 (例えば、前立腺、精巣、腎臓、脳、骨、皮膚、卵巣、乳房、膵臓、結腸、リンパ球および肺の癌) のための有用な診断および/または治療の標的として作用することを示す (例えば、図4~8を参照のこと)。

30

40

【0010】

本発明は、84P2A9の遺伝子、mRNAおよび/またはコード配列 (好ましくは、84P2A9タンパク質および4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のアミノ酸のフラグメントをコードするポリヌクレオチド、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッドならびに関連分子、84P2A9の遺伝子もしくはは

50

mRNA配列またはその一部分に相補的かまたは少なくとも90%の相同性を有する、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、ならびに84P2A9の遺伝子、mRNAもしくは84P2A9をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む単離された形態における)のすべてもしくは一部分に対応するか、または一部分に相補的なポリヌクレオチドを提供する。84P2A9をコードするcDNAおよび遺伝子を単離するための手段もまた、提供する。84P2A9遺伝子産物の発現のための、84P2A9ポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子、このような分子で形質転換した細胞または形質導入した細胞、ならびに宿主ベクター系をまた、提供する。本発明はさらに、84P2A9タンパク質およびそのポリペプチドフラグメントに結合する抗体(ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、マウスおよび他の哺乳動物の抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および完全なヒト抗体、ならびに検出可能なマーカーで標識された抗体を含む)を提供する。

10

**【0011】**

本発明はさらに、種々の生物学的サンプルにおける84P2A9ポリヌクレオチドおよび84P2A9タンパク質の存在および状態を検出するための方法、ならびに84P2A9を発現する細胞を同定するための方法を提供する。本発明の代表的な実施形態は、癌のような増殖を調節できないいくつかの形態を有するかまたはこのような形態を有することが疑われる組織サンプルまたは血液学的サンプルにおける84P2A9遺伝子産物をモニターするための方法を提供する。

**【0012】**

本発明はさらに、前立腺癌のような84P2A9を発現する癌を処置するための種々の免疫原性組成物または治療組成物およびストラテジーを提供する。これらの組成物およびストラテジーとしては、84P2A9の転写、翻訳、プロセッシングまたは機能を阻害することを目的とした治療、ならびに癌ワクチンが挙げられる。

20

**【0013】**

(発明の詳細な説明)

他に規定しない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語、表記、および他の科学技術用語または用語法は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解される意味を有することが意図される。いくつかの場合において、一般的に理解される意味を有する用語は、明確さおよび/または迅速な参照のために本明細書中で定義され、そしてこのような定義の本明細書中への包含は、当該分野において一般に理解されるものを制して実質的な相違を表すとは必ずしも解釈されるべきではない。本明細書中に記載または参照される技術および手順の多くは、一般に、従来の方法論(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N.Y.に記載の広く使用される分子クローニングの方法論のような)を使用して、当業者によって十分に理解され、そして一般的に用いられる。適切な場合、市販のキットおよび試薬の使用を含む手順は、他に注記されない限り、一般に、製造業者によって規定されるプロトコルおよび/またはパラメーターに従って実行される。

30

40

**【0014】**

(定義)

本明細書中で使用される場合、用語「進行した前立腺癌」、「局所的に進行した前立腺癌」、「進行した疾患」および「局所的に進行した疾患」とは、前立腺被膜を通して伸長した前立腺癌を意味し、そして米国泌尿器学会(AUA)システムの下でのステージC疾患、Whitmore-Jewettシステムの下でのステージC1-C2疾患、およびTNM(腫瘍、節、転移)システムの下でのステージT3-T4およびN+疾患を含むことが意味される。一般に、手術は、局所的に進行した疾患を有する患者のためには推奨されず、そしてこれらの患者は、臨床的に局在化している(器官に限定された)前立腺癌を有する患者と比較して、実質的により好ましくない結果を有する。局所的に進行した疾患は

50

、前立腺の側縁を超える硬化の触診可能な証拠、または前立腺基部下の不均衡もしくは硬化によって臨床的に同定される。局所的に進行した前立腺癌は、腫瘍が前立腺被膜に侵入するかもしくは浸透するか、外科的な境界まで伸長するか、または精嚢に侵入する場合、現在、徹底的な前立腺切除後に病理学的に診断される。

【0015】

用語「抗体」は、広い意味で使用される。従って、「抗体」は、天然に存在し得るか、または慣用的なハイブリドーマ技術によって産生されるモノクローナル抗体のような人工物であり得る。抗84P2A9抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにこれらの抗体の抗原結合ドメインおよび/または1以上の相補性決定領域を含むフラグメントを含む。本明細書中で使用される場合、抗体フラグメントは、その標的に結合する免疫グロブリン分子の可変領域(すなわち、抗原結合領域)の少なくとも一部として定義される。1つの実施形態において、特に、単一の抗84P2A9抗体(アゴニスト、アンタゴニストおよび中和抗体を含む)、およびポリエピトープ(polyepitopic)特異性を有する抗84P2A9抗体組成物を含む。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団(すなわち、この集団を含む抗体は、少量で存在する天然に存在する潜在的な変異を除いて、同一である)から得られた抗体をいう。

10

【0016】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞傷害剤」は、細胞の機能を阻害するかまたは妨げ、そして/または細胞の破壊を引き起こす物質をいう。この用語は、放射性同位体(例えば、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ およびLuの放射性同位体)、化学療法試薬、および毒素(例えば、低分子の毒素、あるいはフラグメントおよび/またはその改変体を含む細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素)を含むことが意図される。

20

【0017】

本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドの文脈において使用される、用語「ハイブリダイズ」、「ハイブリダイズする(hybridizing)」、「ハイブリダイズする(hybridizes)」などは、従来のハイブリダイゼーション条件、好ましくは、例えば、50%ホルムアミド/6xSSC/0.1%SDS/100 $\mu$ g/ml ssDNA中でのハイブリダイゼーションをいうことが意味される。ここで、ハイブリダイゼーションのための温度は、37より高い温度であり、そして0.1xSSC/0.1%SDS中での洗浄のための温度は、55より高い。

30

【0018】

本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドは、84P2A9遺伝子以外の遺伝子に、対応するかまたは相補的である混入物ポリヌクレオチド、あるいは84P2A9遺伝子産物もしくはそのフラグメント以外のポリペプチドをコードする混入物ポリヌクレオチドから実質的に分離される場合、「単離された」と言われる。当業者は、容易に核酸単離手順を利用して、単離された84P2A9ポリヌクレオチドを獲得し得る。

【0019】

本明細書中で使用される場合、物理的方法、機械的方法または化学的方法を使用して、84P2A9タンパク質に通常関連する細胞成分からこの84P2A9タンパク質を取り出した場合に、タンパク質が「単離された」といわれる。当業者は、標準的な精製方法を使用して、単離された84P2A9タンパク質を容易に獲得し得る。

40

【0020】

本明細書中で使用される場合、用語「哺乳動物」は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよびヒトを含む、哺乳動物として分類される任意の哺乳動物をいう。本発明の1つの好ましい実施形態において、この哺乳動物は、マウスである。本発明の別の好ましい実施形態において、この哺乳動物は、ヒトである。

【0021】

本明細書中で使用する場合、用語「転移性前立腺癌」および「転移性疾患」は、局所的な

50

リンパ節、または離れた部位に拡がった前立腺癌を意味し、そしてAUAシステム下でのステージD疾患、およびTNMシステム下でのステージT×N×M+を包含することが意味される。局所的に進行した前立腺癌の場合、手術は一般的には転移性疾患を有する患者には指示されず、そしてホルモン（アンドロゲン除去）治療が好ましい治療様式である。転移性前立腺癌を有する患者は、最終的に、処置の開始から12～18ヶ月以内にアンドロゲン抵抗性の状態を発症し、そしてこれらの患者のおよそ半数がアンドロゲン抵抗性状態の発症の後6ヶ月以内に死亡する。前立腺癌転移についての最も一般的な部位は骨である。前立腺癌の骨転移は、しばしば特徴的に、溶骨性ではなく骨芽細胞性である（すなわち、正味の骨の形成を生じる）。骨への転移は、脊椎において最も頻繁に見出され、大腿骨、骨盤、胸郭、頭蓋、および上腕骨が続く。転移のための他の一般的な部位としては、

10

#### 【0022】

「中程度にストリンジェントな条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989によって記載され、同定されるが記載されたものに限定されず、そして洗浄溶液および上記の条件よりも低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度、および%SDS）の使用を含む。中程度にストリンジェントな条件の例は、以下である：20%ホルムアミド

20

#### 【0023】

本明細書中で使用される場合、84P2A9関連タンパク質の生物学的モチーフにおけるような「モチーフ」は、特定の機能または改変（例えば、リン酸化されるか、グリコシル化されるか、またはアミド化される）に関連する、タンパク質の一次配列の一部を形成するアミノ酸の任意のセット（これは連続的であるか、または一般的に不変または保存された特定の位置に配置され得る）を言う。

30

#### 【0024】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は、少なくとも10塩基または10塩基対の長さのヌクレオチドのポリマー形態を意味し、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドのいずれかまたはいずれかの型のヌクレオチドの改変形態であり、そして一本鎖および二本鎖の形態のDNAおよび/またはRNAを含むことを意味する。当該分野において、この用語は、しばしば「オリゴヌクレオチド」と相互に使用される。本明細書中で議論される場合、ポリヌクレオチドは、本明細書中で開示されたヌクレオチド配列を含み得、ここでチミン（T）（例えば、配列番号1に示されるような）はまたウラシル（U）であり得る。この説明は、DNAおよびRNAの化学的構造間の違い、特に4つの主な塩基のうち1つがRNAでは、チミンの代わりにウラシルであるという知見に関連する。

40

#### 【0025】

本明細書中で使用する場合、用語「ポリペプチド」は、少なくとも約4、5、6、7または8アミノ酸のポリマーを意味する。本明細書を通して、アミノ酸についての標準的な3文字表記または1文字表記が使用される。当該分野において、この用語は、しばしば「ペプチド」と相互に使用される。

#### 【0026】

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可

50

能であり、そして一般的には、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験による計算である。一般に、長いプローブほど、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、一方、短いプローブほど、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般に、融解温度より下の環境において相補鎖が存在する場合の、変性した核酸配列が再アニーリングする能力に依存する。プローブと、ハイブリダイズ可能な配列との間の所望される相同性の程度が高いほど、使用され得る相対的な温度が高くなる。結果として、より高い相対的な温度が、反応条件をよりストリンジェントにする傾向があるが、より低い温度ではそのようなことがより少ない、ということになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley, Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

10

## 【0027】

本明細書中に規定されるように、「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」は、以下の条件によって同定され得るが、これらに限定されない：(1)洗浄のために低いイオン強度および高い温度を使用する条件(例えば、0.015M 塩化ナトリウム/0.0015M クエン酸ナトリウム/0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、50);(2)ハイブリダイゼーションの間に変性剤(例えば、ホルムアミド)を使用する条件(例えば、50% (v/v)ホルムアミドおよび0.1% ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll/0.1% ポリビニルピロリドン/50mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)および750mM 塩化ナトリウム、75mM クエン酸ナトリウム、42);または(3)50% ホルムアミド、5xSSC(0.75M NaCl、0.075M クエン酸ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1% ピロリン酸ナトリウム、5xDenhardt's溶液、超音波処理したサケ精子DNA(50μg/ml)、0.1% SDS、および10% 硫酸デキストラン、42、さらに以下の洗浄工程、42において0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)および50%ホルムアミド、55、続いて、高ストリンジェンシー洗浄(EDTAを含む0.1xSSCからなる、55)を使用する条件。

20

## 【0028】

「トランスジェニック動物」(例えば、マウスまたはラット)は、導入遺伝子を含む細胞を有する動物であり、その導入遺伝子は、その動物に、または出生前(例えば、胚段階)でその動物の祖先に導入される。「導入遺伝子」は、細胞のゲノムに組み込まれるDNAであり、トランスジェニック動物は、その細胞から発生する。

30

## 【0029】

本明細書中で使用される場合、84P2A9遺伝子およびタンパク質は、本明細書中で具体的に記載される84P2A9遺伝子およびタンパク質、ならびに他の84P2A9にコードされたタンパク質またはペプチドに対応する遺伝子およびタンパク質、および前述の構造的に類似の改変体を含むことが意味される。このような他の84P2A9ペプチドおよび改変体は、一般的に、84P2A9コード配列に高度に相同なコード配列を有し、そして好ましくは、少なくとも約50%のアミノ酸相同性(BLAST基準を使用して)、そして好ましくは、50%、60%、70%、80%、90%以上の核酸相同性、そして少なくとも約60%のアミノ酸相同性を共有し(BLAST基準を使用して)、より好ましくは、70%以上の相同性を共有する(BLAST基準を使用して)。

40

## 【0030】

本発明の84P2A9関連タンパク質は、本明細書中で詳細に同定された84P2A9関連タンパク質、ならびに対立遺伝子、保存的置換改変体およびホモログを含み、これらは、本明細書中で概略される方法または当該分野において容易に利用可能な方法に従う過度の実験なしに単離/生成および特徴付けされ得る。異なる84P2A9タンパク質またはそれらのフラグメントの一部を合わせる融合タンパク質、ならびに84P2A9タンパク質および異種ポリペプチドの融合タンパク質もまた含まれる。このような84P2A9タ

50

ンパク質は、まとめて84P2A9関連タンパク質、本発明のタンパク質、または84P2A9として言われる。本明細書中で使用される場合、用語「84P2A9関連ポリペプチド」は、ポリペプチドフラグメントまたは4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15以上のアミノ酸の84P2A9タンパク質配列を言う。

#### 【0031】

(84P2A9の構造および発現)

以下に詳細に議論されるように、雄SCIDマウスにおいてLAPC-4 AD異種移植片を用いる実験は、アンドロゲン依存性(AD)前立腺癌からアンドロゲン非依存性(AI)癌への進行に関連する遺伝子の同定をもたらした。簡単には、LAPC-4 AD異種移植片を有するマウスを、腫瘍の大きさが直径1cmに達した時に去勢した。腫瘍の大きさが退行し、そして一時的にアンドロゲン依存性タンパク質PSA産生が停止した。去勢後7~15日で、PSAレベルは、マウス血中において再び検出可能であった。最終的に、このような腫瘍は、AI表現型を発現し、そして去勢マウスにおいて再び増殖を開始する。去勢後、異なる時点で腫瘍を収集し、アンドロゲン非依存性への移行の間に開始および停止される遺伝子を同定した。

10

#### 【0032】

次に抑制サブトラクティブ(suppression subtractive)ハイブリダイゼーション(SSH)(Diatchenkoら、1996、PNAS 93:6025)を使用して、種々のアンドロゲン依存性およびアンドロゲン非依存性LAPC異種移植片由来のcDNAを比較することによって新規な遺伝子(例えば、前立腺癌において過剰発現される遺伝子)を同定した。この戦略は、組織および癌特異的発現を示す新規な遺伝子の同定をもたらした。これらの遺伝子の1つ(84P2A9と称される)が、去勢3日後のLAPC-4 AD腫瘍に由来するcDNAを、インタクトな雄で増殖したLAPC-4 AD腫瘍に由来するcDNAから差し引いた、差し引き(サブトラクション)から同定された。約425pbのSSH DNA配列(図1)は、新規であり、そしてdbESTデータベースにおける発現配列タグ(EST)にのみ相同性を示す。

20

#### 【0033】

84P2A9は、前立腺および精巣に関連した発現を示す推定核タンパク質をコードする。84P2A9の最初の特徴付けは、それが前立腺癌、精巣癌、腎臓癌、脳の癌、骨の癌、皮膚癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、結腸癌、リンパ球の癌および肺癌を含む複数の癌において異常に発現されることを示す。前立腺癌における84P2A9の発現は、このタンパク質が、腫瘍進行において機能的な役割を有する証拠を提供する。転写因子としての84P2A9機能が、腫瘍形成に関連する遺伝子の活性化または腫瘍形成をブロックする遺伝子の抑制に関連する可能性がある。

30

#### 【0034】

以下の実施例でさらに記載されるように、84P2A9遺伝子およびタンパク質は、多くの分析的アプローチを使用して特徴付けられている。例えば、ヌクレオチドコードおよびアミノ酸配列の分析を、潜在的に関連する分子、および認識可能な構造ドメイン、位相的特徴、ならびに84P2A9 mRNAおよびタンパク質構造内の他のエレメントを同定するために行った。84P2A9 mRNA発現のノザンブロッド分析を、84P2A9メッセージを発現する正常組織および癌性組織の範囲を確立するために行った。

40

#### 【0035】

2345塩基対の全長84P2A9 cDNAクローン(クローン1)(配列番号1)を、LAPC-4 AD cDNAライブラリー(Lambda Zap Express, Stratagene)からクローン化した(図2)。このcDNAは、504アミノ酸(配列番号2)のオープンリーディングフレーム(ORF)をコードする。配列分析は、6つの潜在的な核局在化シグナルの存在を明らかにし、そしてPSORTプログラム(<http://psort.nibb.ac.jp:8800/form.html>)を使用して核にあることが予想された。このタンパク質配列は、ヒト脳タンパク質KIAA1152(配列番号5)と幾分の相同性(337アミノ酸領域にわたって39.5%の同

50

一性)を有し、LUC A 15腫瘍サプレッサータンパク質(配列番号6)に相同であるドメインを含む(42アミノ酸領域にわたって64.3%の同一性)(GenBank寄託番号P52756)(図3)。

#### 【0036】

84P2A9発現は、正常成体ヒト組織において前立腺および精巣に関連するが、前立腺癌、精巣癌、腎臓癌、脳の癌、骨の癌、皮膚癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、結腸癌、リンパ球の癌および肺癌を含む特定の癌においても発現される(例えば、図4~8を参照のこと)。ヒト前立腺腫瘍の異種移植片は、高レベルの84P2A9を発現する重度の転移性前立腺癌を有する患者に元々由来した(図4)。

#### 【0037】

本明細書中に開示されるように、84P2A9は、そのポリヌクレオチド、ポリペプチド、反応性細胞傷害性T細胞(CTL)、ヘルパーT細胞(HTL)および抗ポリペプチド抗体が、例えば、癌(特に前立腺癌)における調節されない細胞増殖に関連する状態の試験に関連する周知の診断的アッセイに使用される、遺伝子のファミリーに見出される特性と類似である特定の特性を示す(例えば、実施例3に例として記載されるような、その非常に特異的な組織発現パターンおよび前立腺癌におけるその過剰発現の両方を参照のこと)。このクラスの最も知られたメンバーは、PSA(何年もの間前立腺癌の存在を同定およびモニターするために医者によって使用されてきた典型的なマーカー)である(例えば、Merrillら、J.Urol.163(2):503~5120(2000);Polascikら、J.Urol.Aug;162(2):293~306(1999)およびFortierら、J.Nat.Cancer Inst.91(19):1635~1640(1999)を参照のこと)。p53およびK-rasを含む種々の他の診断マーカーもまた、この状況において使用される(例えば、Tulchinskyら、Int J Mol Med 1999 Jul;4(1):99~102およびMinimotoら、Cancer Detect Prev 2000;24(1):1~12)。従って、84P2A9ポリヌクレオチドおよびポリペプチド(ならびにこれらの分子の存在を同定する使用される84P2A9ポリヌクレオチドプローブおよび抗84P2A9抗体を)およびこれらの特性のこの開示は、当業者が、例えば、癌に関連した状態の検査に関連した種々の診断的アッセイにおいて使用される方法と類似である方法においてこれらの分子を使用することを可能にする。

#### 【0038】

本明細書中に記載された84P2A9ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体を使用する診断方法の代表的な実施形態は、PSAポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体を使用する十分に確立された診断アッセイ由来のこれらの方法と類似する。例えば、PSA過剰発現および前立腺癌の転移をモニターする方法においてPSA mRNAの存在および/またはレベルを観察するためにPSAヌクレオチドを、プローブ(例えば、ノザン分析において(例えば、Shariefら、Biochem.Mol.Biol.Int.33(3):567~74(1994)を参照のこと)およびプライマー(例えば、PCR分析において(例えば、Okegawaら、J.Urol.163(4):1189~1190(2000)を参照のこと)として使用されるように、本明細書中に記載された84P2A9ポリヌクレオチドは、84P2A9の過剰発現またはこの遺伝子を発現する前立腺および他の癌の転移を検出するために同様に使用され得る。あるいは、PSAポリペプチドを使用してPSAに特異的な抗体を生成し、次にこの抗体を、PSAタンパク質の過剰発現(例えば、Stephanら、Urology 55(4):560~3(2000)を参照のこと)または前立腺細胞の転移(例えば、Alanenら、Pathol.Res.Pract.192(3):233~7(1996)を参照のこと)をモニターする方法においてPSAタンパク質の存在および/またはレベルを観察するために使用し得るように、本明細書中で記載された84P2A9ポリペプチドは、84P2A9過剰発現またはこの遺伝子を発現する前立腺細胞および他の癌の細胞の転移の検出に使用するための抗体を生成するために使用され得る。

10

20

30

40

50

## 【0039】

具体的に、転移は、元々の器官（例えば、精巣または前立腺など）から身体の異なる領域（例えば、リンパ節）への癌細胞の移動に関係するので、84P2A9ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドを発現する細胞の存在について生物学的サンプルを試験するアッセイが、転移の証拠を提供するために使用され得る。例えば、84P2A9発現細胞を通常含まない組織（リンパ節）由来の生物学的サンプルが、LAPC4およびLAPC9（それぞれ、リンパ節および骨転移から単離された異種移植片）に見られる84P2A9発現のような84P2A9発現細胞を含むことが見出される場合、この発見は、転移を示す。

## 【0040】

あるいは、84P2A9ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドは、例えば、通常84P2A9を発現しないかまたは異なるレベルで84P2A9を発現する生物学的サンプル中の細胞が、84P2A9を発現するかまたは84P2A9の増加した発現を有することが見出された場合に、癌の証拠を提供するために使用され得る（例えば、図4～10に示される、腎臓、肺および結腸癌の細胞ならびに患者サンプルなどにおける84P2A9の発現を参照のこと）。このようなアッセイにおいて、当業者は、生物学的サンプルを、第二の組織制限マーカー（84P2A9に加えて）（例えば、PSA、PSCAなど）の存在について試験することによって転移の補足的な証拠を生成することをさらに望み得る（例えば、Alanenら、*Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-237(1996)を参照のこと）。

## 【0041】

PSAポリヌクレオチドフラグメントおよびポリヌクレオチド改変体が、PSAをモニターする方法における使用のために当業者によって使用されるように、84P2A9ポリヌクレオチドフラグメントおよびポリヌクレオチド改変体が、類似の様式で使用される。特に、PSAをモニターする方法において使用される代表的なPSAポリヌクレオチドは、PSA cDNA配列のフラグメントからなるプローブまたはプライマーである。これを例示すると、PSAポリヌクレオチドをPCR増幅するために使用されるプライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応において機能するように全PSA配列未満を含まなくてはならない。このようなPCR反応の状況において、当業者は、一般に、目的のポリヌクレオチドの異なる部分を増幅するためにかまたは増幅反応を最適化するためにプライマーとして使用され得る、種々の異なるポリヌクレオチドフラグメントを作製する（例えば、Caetono - Anolles, *G. Biotechniques* 25(3): 472-476, 478-480(1998); Robertsonら, *Methods Mol. Biol.* 98: 121-154(1998)を参照のこと）。このようなフラグメントの使用のさらなる例が実施例3に提供され、ここで、84P2A9ポリヌクレオチドフラグメントが、癌細胞における84P2A9 mRNAの過剰発現を示すためのプローブとして使用される。さらに、医療従事者によるそれらの使用を容易にするために、改変体ポリヌクレオチド配列は、代表的に、PCRおよびノーザン分析における対応するmRNAについてのプライマーおよびプローブとして使用される（例えば、Sawaiら, *Fetal Diagn. Ther.* Nov-Dec; 11(6): 407-13および *Current Protocols In Molecular Biology*, Volume 2, Unit 2, Frederick M. Ausubulら, 編, 1995を参照のこと）。ポリヌクレオチドフラグメントおよび改変体は、代表的に、それらが、高いストレンジェンシーの条件下で、標的ポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号1に示される84P2A9ポリヌクレオチド）に結合し得る共通の性質および特徴を有する限り、この状況において有用である。

## 【0042】

PSAポリペプチドフラグメントおよびポリペプチド改変体が、PSA分子をモニターする方法における使用のために当業者によって使用されるように、84P2A9ポリペプチドフラグメントおよびポリペプチド改変体が、類似の様式で使用され得る。特に、PSA

10

20

30

40

50

をモニターする方法において使用される代表的な P S A ポリペプチドは、P S A タンパク質に特異的に結合する抗体または T 細胞によって認識され得る抗体エピトープを含む P S A タンパク質のフラグメントである。ポリペプチドフラグメントまたはポリペプチド改変体を使用して抗体（例えば、抗 P S A 抗体または T 細胞）を生成するこの実施は、代表的に、当業者によって使用されている融合タンパク質のような広範な種々の系と共に当該分野にある（例えば、Current Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubel ら、編、1995 を参照のこと）。この状況において、目的のタンパク質の各エピトープは、抗体または T 細胞が反応性である構造を提供するように機能する。代表的に、当業者は、目的のポリペプチドの異なる部分に特異的な抗体を生成するために使用され得る種々の異なるポリペプチドフラグメントを一般に生成する（例えば、米国特許第 5,840,501 号および米国特許第 5,939,533 号を参照のこと）。例えば、本明細書中に記載されるかまたは当該分野で利用可能な 84P2A9 生物学的モチーフの 1 つを含むポリペプチドを利用することが、好ましくあり得る。ポリペプチドフラグメントおよび改変体またはアナログは、代表的に、これらが標的ポリペプチド配列（例えば、配列番号 2 に示される 84P2A9 ポリペプチド）に特異的な抗体または T 細胞を生成し得るエピトープを含む限り、この状況において有用である。

#### 【0043】

本明細書中に示されるように、84P2A9 ポリヌクレオチドおよびポリペプチド（ならびに、これらの分子の存在を同定するために使用される 84P2A9 ポリヌクレオチドプローブおよび抗 84P2A9 抗体または T 細胞）は、それらを前立腺の癌を診断する際に有用にする特定の特性を示す。前立腺癌のような、本明細書中に記載の特定の疾患状態を存在または発症を評価するために、84P2A9 遺伝子産物の存在を測定する診断アッセイは、予防的基準についての患者の同定またはさらなるモニタリングのために有用であり、このことは、P S A を用いて首尾良くなされている。さらに、これらの物質は、例えば、前立腺起源の転移の明確な診断が、P S A のみの試験に基づいてなされ得ない状況における、P S A に対して類似または相補的特性を有する分子についての当該分野での必要性を満足する（例えば、Alanen ら、Pathol. Res. Pract. 192(3):233-237(1996)）。その結果、84P2A9 ポリヌクレオチドおよびポリペプチド（ならびに、これらの分子の存在を同定するために使用される 84P2A9 ポリヌクレオチドプローブおよび抗 84P2A9 抗体）は、前立腺起源の転移を確認するために使用される。

#### 【0044】

最後に、診断アッセイにおける使用に加えて、本明細書中に開示される 84P2A9 ポリヌクレオチドは、1q32.3 におけるオンコジーン関連染色体異常の同定におけるそれらの使用のような、多くの他の特異的な有用性を有する。さらに、診断アッセイにおけるそれらの使用に加えて、本明細書中に開示される 84P2A6 関連タンパク質およびポリヌクレオチドは、未知の起源の組織の法医学的分析におけるそれらの使用のようなタンパク質の利用性を有する（Takehama K Forensic Sci Int 1996 Jun 28;80(1-2):63-9）。

#### 【0045】

（84P2A9 ポリヌクレオチド）

本発明の一つの局面は、84P2A9 遺伝子、mRNA および / またはコード配列のすべてもしくは一部分に対応するか、またはそのすべてもしくは一部分に相補的な、ポリヌクレオチド（好ましくは、84P2A9 タンパク質およびそのフラグメント、DNA、RNA、DNA/RNA ハイブリッドならびに関連分子をコードするポリヌクレオチド、84P2A9 遺伝子もしくは mRNA 配列またはその一部分に相補的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、ならびに 84P2A9 遺伝子、mRNA もしくは 84P2A9 をコードするポリヌクレオチド（集合的に、「84P2A9 ポリヌクレオチド」）にハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む単離形態における）を提

10

20

30

40

50

供する。

【0046】

84P2A9ポリヌクレオチドの一つの実施形態は、配列番号1に示される配列を有する84P2A9ポリヌクレオチドである。84P2A9ポリヌクレオチドは、配列番号1に示されるようなヒト84P2A9のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド(ここで、Tはまた、Uであり得る)；84P2A9タンパク質のすべてまたは一部分をコードするポリヌクレオチド；前述のポリヌクレオチドに相補的な配列；あるいは前述のうちのいずれかのポリヌクレオチドフラグメントを含み得る。別の実施形態は、配列番号1に示されるような、ヌクレオチド残基番号163～ヌクレオチド残基番号1674の配列を有するか、または残基番号718～残基番号1390の配列を有するポリヌクレオチドを含み、ここで、Tはまた、Uであり得る。別の実施形態は、その配列が、American Type Culture Collectionに、登録番号PTA-1151として寄託されたプラスミドに含まれるcDNAによってコードされる、84P2A9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。別の実施形態は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1に示されるヒト84P2A9cDNAまたはそのポリヌクレオチドフラグメントにハイブリダイズし得るポリヌクレオチドを含む。

10

【0047】

本明細書中で開示される本発明の代表的な実施形態は、84P2A9 mRNA配列(およびこのような配列に相補的な配列)の特定の一部をコードする84P2A9ポリヌクレオチド(例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上連続するアミノ酸のタンパク質およびそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド)を含む。例えば、本明細書中で開示される本発明の代表的な実施形態は、以下を含む：図2(配列番号2)に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸位置1～およそアミノ酸位置10をコードするポリヌクレオチド、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸10～およそアミノ酸20をコードするポリヌクレオチド、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸20～およそアミノ酸30をコードするポリヌクレオチド、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸30～およそアミノ酸40をコードするポリヌクレオチド、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸40～およそアミノ酸50をコードするポリヌクレオチド、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸50～およそアミノ酸60をコードするポリヌクレオチド、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸60～およそアミノ酸70をコードするポリヌクレオチド、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸70～およそアミノ酸80をコードするポリヌクレオチド、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸80～およそアミノ酸90をコードするポリヌクレオチド、および図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸90～およそアミノ酸100をコードするポリヌクレオチドなど。このスキームに従って、84P2A9タンパク質のアミノ酸100～504のアミノ酸配列の一部をコードするポリヌクレオチド(少なくとも10個の核酸の)は、本発明の代表的な実施形態である。

20

30

【0048】

84P2A9タンパク質のより大きな部分をコードするポリヌクレオチドがまた意図される。例えば、図2に示される84P2A9タンパク質のおよそアミノ酸1(または20、または30、または40など)～およそアミノ酸20(または30、または40、または50など)をコードするポリヌクレオチドは、当該分野に周知の種々の技術によって生成され得る。このようなポリヌクレオチドの例示の実施形態は、図2に示されるような配列を有するヌクレオチド残基番号718からヌクレオチド残基番号1390のポリヌクレオチドからなる。

40

【0049】

本明細書中で開示される本発明のさらなる例示的な実施形態は、84P2A9タンパク質配列内に含まれる、1つ以上の生物学的モチーフをコードする84P2A9ポリヌクレオ

50

チドフラグメントを含む。一つの実施形態において、本発明の代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、本明細書中で開示される1つ以上の核局在化配列をコードし得る。別の実施形態において、本発明の代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、L U C A 1 5 および/またはK I A A 1 1 5 2 および/またはN Y - L u - 1 2 肺癌抗原 ( A F 0 4 2 8 5 7 ) に対する相同性を示す、8 4 P 2 A 9 の1つ以上の領域 ( これらは、ジンクフィンガーモチーフおよびRNA結合モチーフを示す ) をコードし得る ( 例えば、G e r e ら、C a n c e r R e s . 5 8 ( 5 ) : 1 0 3 4 - 1 0 4 1 を参照のこと ) 。本発明の別の実施形態において、代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、本明細書中の8 4 P 2 A 9 タンパク質およびポリペプチドを議論する主題において、より詳細に開示されるような、以下の1つ以上をコードし得る：8 4 P 2 A 9 N グリコシル化部位、c A M P およびc C M P 依存性タンパク質キナーゼリン酸化部位、カゼインキナーゼIリン酸化部位またはN - ミリストイル化部位およびアミド化部位。本発明のなお別の実施形態において、代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、1つ以上の8 4 P 2 A 9 選択的スプライシング改変体 ( 例えば、図4に示されるような前立腺癌において過剰発現される4 . 5 k B 転写物を生成するスプライス改変体 ) に独特である配列をコードし得る。

#### 【0050】

前記の段落のポリヌクレオチドは、多数の異なる特定の用途を有する。例えば、染色体1 q 3 2 . 3 に対するヒト8 4 P 2 A 9 遺伝子マッピングによって、8 4 P 2 A 9 タンパク質の異なる領域をコードするポリヌクレオチドを用いて、染色体1バンドq 3 2 ( 種々の癌と関連して同定される ) 上の細胞発生異常が特徴づけされ得る。詳細には、1 q 3 2 における種々の染色体異常 ( 転座および欠失を含む ) が、多数の異なる癌における頻繁な細胞発生異常として同定された ( 例えば、B i e c h e ら、G e n e s C h r o m a s o m e s C a n c e r , 2 4 ( 3 ) : 2 5 5 ~ 2 6 3 ( 1 9 9 9 ) ; G o r u n o v a ら、G e n e s C h r o m o s o m e s C a n c e r , 2 6 ( 4 ) : 3 1 2 ~ 3 2 1 ( 1 9 9 9 ) ; R e i d ら、C a n c e r R e s . ( 2 2 ) : 5 4 1 5 ~ 5 4 2 3 ( 1 9 9 5 ) を参照のこと ) 。従って、8 4 P 2 A 9 タンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドは、新しいツールを提供し、このツールを用いて、以前に可能であったよりも正確に、染色体1のこの領域における細胞発生異常の特異的性質 ( 悪性の表現型に寄与し得る ) を描写し得る。この文脈では、これらのポリヌクレオチドは、よりわずかがかつ共通性が少ない染色体異常を同定するために、染色体スクリーニングの感度の増大に関して当該分野における必要性を満足する ( 例えば、E v a n s ら、A m . J . O b s t e t . G y n e c o l 1 7 1 ( 4 ) : 1 0 5 5 ~ 1 0 5 7 ( 1 9 9 4 ) を参照のこと ) 。

#### 【0051】

あるいは、8 4 P 2 A 9 は、前立腺癌において高度に発現されることが示されるので ( 図4 ) 、これらのポリヌクレオチドは、癌性組織に対する正常な組織における8 4 P 2 A 9 遺伝子産物の状態を評価する方法において使用され得る。代表的には、8 4 P 2 A 9 タンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドを使用して、8 4 P 2 A 9 遺伝子産物の特定の領域 ( 核局在化シグナルを含むような領域 ) において、混乱状態 ( 例えば、欠失、挿入、点変異、または変異 ( 抗原の消失を生じる ) など ) の存在を評価し得る。例示的なアッセイとしては、R T - P C R アッセイ、ならびに一本鎖高次構造多型 ( S S C P ) 分析 ( 例えば、M a r r o g i ら、J . C u t a n . P a t h o l . 2 6 ( 8 ) : 3 6 9 - 3 7 8 ( 1 9 9 9 ) を参照のこと ) の両方が挙げられ、これらの両方は、タンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドを利用して、タンパク質内のこれらの領域を試験する。

#### 【0052】

本明細書中で開示される本発明の他の具体的に意図された核酸に関連する実施形態は、ゲノムDNA、cDNA、リボザイムおよびアンチセンス分子、ならびに天然の供給源または合成由来にせよ、代替の骨格に基づくか、または代替の塩基を含む核酸分子である。例えば、アンチセンス分子は、RNA、あるいは他の分子 ( ペプチド核酸 ( PNA ) または塩基対依存様式でDNAもしくはRNAに特異的に結合する非核酸分子 ( 例えば、ホスホ

10

20

30

40

50

ロチオエート誘導体)を含む)であり得る。当業者は、本明細書中で開示される84P2A9のポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド配列を使用して、核酸分子のこれらのクラスを容易に獲得し得る。

#### 【0053】

アンチセンス技術は、細胞内部に位置する標的ポリヌクレオチドに結合する外因性オリゴヌクレオチドの投与を必然的に伴う。用語「アンチセンス」は、このようなオリゴヌクレオチドが、その細胞内標的(例えば、84P2A9)に相補的であるという事実をいう。例えば、Jack Cohen, OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; および Synthesis 1:1-5 (1988)を参照のこと。本発明の84P2A9アンチセンスオリゴヌクレオチドは、Sオリゴヌクレオチド(ホスホロチオエート誘導体またはS-オリゴ、Jack Cohen、前出を参照のこと)のような誘導体を含み、この誘導体は、癌細胞増殖阻害作用の増大を示す。S-オリゴ(ヌクレオシドホスホロチオエート)は、オリゴヌクレオチド(O-オリゴ)の等電子アナログであり、リン酸基の非架橋酸素原子は、硫酸原子で置換されている。本発明のS-オリゴは、3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン-1, 1-ジオキシド(これは、硫酸転移試薬である)での対応するO-オリゴの処理によって調製され得る。Iyer, R.P.ら、J. Org. Chem. 55:4693-4698 (1990); および Iyer, R.P.ら、J. Am. Chem. Soc. 112:1253-1254 (1990)を参照のこと。本発明のさらなる84P2A9アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該分野で公知のモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む(例えば、Partridgeら、1996、Antisense & Nucleic Acid Drug Development 6:169~175を参照のこと)。

#### 【0054】

本発明の84P2A9アンチセンスオリゴヌクレオチドは、代表的に、84P2A9ゲノム配列または対応するmRNAの最初の100N末端コドンまたは最後の100C末端コドンに相補的であり、そしてこれらのコドンと安定にハイブリダイズする、RNAまたはDNAであり得る。完全な相補性(コンプリメンタリティー)(complementarity)は必要ではないが、高い程度の相補性(コンプリメンタリティー)が好ましい。この領域に相補的なオリゴヌクレオチドの使用は、84P2A9 mRNAへの選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、そしてプロテインキナーゼの他の調節サブユニットを特定するmRNAへの選択的ハイブリダイゼーションを不可能にする。好ましくは、本発明の84P2A9アンチセンスオリゴヌクレオチドは、84P2A9 mRNAにハイブリダイズする配列を有するアンチセンスDNA分子の15~30マーのフラグメントである。必要に応じて、84P2A9アンチセンスオリゴヌクレオチドは、84P2A9の、最初の10のN末端コドンおよび最後の10のC末端コドンにおける領域に相補的な30マーオリゴヌクレオチドである。あるいは、アンチセンス分子は、84P2A9発現の阻害において、リボザイムを利用するように改変される。L.A. CoutureおよびD.T. Stinchcomb; Trends Genet 12:510-515 (1996)。

#### 【0055】

本発明のこの局面のさらなる特定の実施形態は、プライマーおよびプライマーペアを含み、これは、本発明のポリヌクレオチドまたはその任意の特定の部分の特異的増幅、および本発明の核酸分子またはその任意の部分に選択的もしくは特異的にハイブリダイズするプローブの特異的増幅を可能にする。プローブは、検出可能なマーカー(例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素のような)で標識され得る。このようなプローブおよびプライマーが、サンプルにおける84P2A9ポリヌクレオチドの存在を検出するために使用され得、そして84P2A9タンパク質を発現する細胞を検出するための手段として使用され得る。

#### 【0056】

10

20

30

40

50

このようなプローブの例としては、図2に示されるヒト84P2A9 cDNA配列の、すべてまたは一部分を含むポリペプチドが挙げられる。84P2A9 mRNAを特異的に増幅し得るプライマーペアの例はまた、以下の実施例において記載される。当業者に理解されるように、非常に多くの異なるプライマーおよびプローブが、本明細書中に提供される配列に基づいて調製され得、そして84P2A9 mRNAを、有効に増幅および/または検出するために使用され得る。

【0057】

本発明の84P2A9ポリヌクレオチドは、種々の目的に有用である。この目的としては、84P2A9遺伝子、mRNAまたはそのフラグメントの、増幅および/または検出のための、プローブおよびプライマーとしての使用；前立腺癌および他の癌の、診断および/または予後予測のための試薬としての使用；84P2A9ポリペプチドの発現を指向し得るコード配列としての使用；84P2A9遺伝子の発現および/または84P2A9転写物の翻訳を、調節または阻害するための手段としての使用；ならびに治療薬としての使用が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0058】

(84P2A9をコードする核酸分子の単離)

本明細書中に記載される84P2A9 cDNA配列は、84P2A9遺伝子産物をコードする他のポリヌクレオチドの単離、ならびに84P2A9の遺伝子産物のホモログ、選択的にスプライシングされたアイソフォーム、対立遺伝子改変体、および84P2A9遺伝子産物の変異体形態をコードするポリヌクレオチドの単離を可能にする。84P2A9遺伝子をコードする全長cDNAを単離するために利用され得る種々の分子クローニング方法は、周知である(例えば、Sambrook, J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubelら編、Wiley and Sons, 1995を参照のこと)。例えば、ファージクローニング方法論が、市販のクローニング系を使用して慣用的に利用され得る(例えば、Lambda ZAP Express, Stratagene)。84P2A9遺伝子cDNAを含むファージクローンは、標識された84P2A9 cDNAまたはそのフラグメントを用いて調べることにより同定され得る。例えば、一つの実施形態において、84P2A9 cDNA(図2)またはその一部分が、合成され、そしてプローブとして使用されて、84P2A9遺伝子に対応する重複するcDNAおよび84P2A9遺伝子に対応する全長cDNAを回収し得る。84P2A9遺伝子自体は、84P2A9 DNAプローブまたはプライマーを使用して、ゲノムDNAライブラリー、細菌人工染色体ライブラリー(BAC)、酵母人工染色体ライブラリー(YAC)などをスクリーニングすることによって単離され得る。

20

30

【0059】

(組換えDNA分子および宿主-ベクター系)

本発明はまた、84P2A9ポリヌクレオチドまたはそのフラグメントもしくはアナログもしくはホモログを含む組換えDNAまたはRNA分子(これには、当該分野において周知のファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、YAC、BAC、ならびに種々のウイルス性および非ウイルス性ベクターが含まれるが、これらに限定されない)、およびこのような組換えDNAまたはRNA分子で形質転換またはトランスフェクトされた細胞を提供する。本明細書中で使用される場合、組換えDNAまたはRNA分子は、インビトロでの分子操作に供されたDNAまたはRNA分子である。このような分子を生成するための方法は周知である(例えば、Sambrookら、1989(前出)を参照のこと)。

40

【0060】

本発明はさらに、適切な原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞において84P2A9ポリヌクレオチド、またはそのフラグメントもしくはアナログもしくはホモログを含む組

50

換えDNA分子を含む、宿主-ベクター系を提供する。適切な真核生物宿主細胞の例としては、酵母細胞、植物細胞、または動物細胞（例えば、哺乳動物細胞または昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス感染可能細胞（例えば、Sf9細胞またはHigh Five細胞）））が挙げられる。適切な哺乳動物細胞の例としては、種々の前立腺癌細胞株（例えば、DU145、TsuPr1、他のトランスフェクト可能であるかまたは形質導入可能な前立腺細胞株）、ならびに組換えタンパク質の発現のために慣用的に使用される多くの哺乳動物細胞（例えば、COS細胞、CHO細胞、293細胞、293T細胞）が挙げられる。より詳細には、84P2A9のコード配列を含むポリヌクレオチドまたはそのフラグメントもしくはアナログもしくはホモログを使用し、当該分野で慣用的に使用され、そして広く知られたかなり多数の宿主-ベクター系を用いて、84P2A9タンパク質またはそれらのフラグメントを生成し得る。

10

#### 【0061】

84P2A9タンパク質またはそれらのフラグメントの発現に適切な広範な宿主-ベクター系が利用可能である（例えば、Sambrookら、1989（前出）；Current Protocols in Molecular Biology、1995（前出）を参照のこと）。哺乳動物での発現に好ましいベクターとしては、pcDNA 3.1 myc-His-tag（Invitrogen）およびレトロウイルスベクターpSRtkneo（Mullerら、1991、MCB 11:1785）が挙げられるが、これらに限定されない。これらの発現ベクターを使用して、84P2A9は、好ましくは、いくつかの前立腺癌細胞株および非前立腺癌細胞株（例えば、293、293T、rat-1、NIH 3T3、およびTsuPr1を含む）において発現され得る。本発明の宿主-ベクター系は、84P2A9タンパク質またはそれらのフラグメントの産生のために有用である。このような宿主-ベクター系は、84P2A9および84P2A9の変異またはアナログの機能的特性を研究するために使用され得る。

20

#### 【0062】

組換えヒト84P2A9タンパク質またはそのアナログもしくはホモログもしくはフラグメントは、84P2A9をコードする構築物でトランスフェクトされた哺乳動物細胞によって産生され得る。実施例に記載した例示的な実施形態において、293T細胞は、84P2A9またはそのフラグメントもしくはアナログもしくはホモログをコードする発現プラスミドでトランスフェクトされ得、この84P2A9タンパク質またはその関連タンパク質は、293T細胞において発現され、そして組換え84P2A9タンパク質は、標準的な精製方法（例えば、抗84P2A9抗体を使用するアフィニティ精製）を使用して単離され得る。本明細書中の実施例において同様に記載される別の実施形態では、84P2A9コード配列は、レトロウイルスベクターpSRMSVtkneo中にサブクローニングされ、そして種々の哺乳動物細胞株（例えば、NIH 3T3、TsuPr1、293およびrat-1）に感染するために使用されて、84P2A9発現細胞株を樹立する。当該分野において周知の種々の他の発現系もまた使用され得る。84P2A9コード配列にインフレームで連結されたリーダーペプチドをコードする発現構築物は、組換え84P2A9タンパク質の分泌形態の産生のために使用され得る。

30

#### 【0063】

84P2A9遺伝子またはそのアナログもしくはホモログもしくはフラグメントによってコードされるタンパク質は、種々の用途を有する。これには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体の産生、および84P2A9遺伝子産物に結合する、リガンドおよび他の因子および細胞構成要素を同定するための方法において。84P2A9タンパク質またはそれらのフラグメントに対して惹起された抗体は、診断および予後アッセイにおいて、ならびに84P2A9タンパク質の発現によって特徴付けられるヒト癌（前立腺および精巣の癌を含むが、これに限定されない）の管理における画像化方法において有用であり得る。このような抗体は、細胞内で発現され得、そしてこのような癌を有する患者を処置する方法において使用され得る。84P2A9タンパク質の検出のために有用な種々の免疫学的アッセイが意図され、これには、種々の型のラジオイムノアッセイ、酵素結合

40

50

イムノソルベント検定法 (E L I S A)、酵素結合免疫蛍光アッセイ (E L I F A)、免疫細胞学的方法などが挙げられるが、これらに限定されない。このような抗体が、標識され得、そして 8 4 P 2 A 9 発現細胞を検出し得る免疫学的画像化試薬として使用され得る (例えば、ラジオシンチグラフィ (r a d i o s c i n t i g r a p h i c) 画像化方法において)。8 4 P 2 A 9 タンパク質はまた、以下にさらに記載されるように、癌ワクチンの生成において特に有用であり得る。

【 0 0 6 4 】

( 8 4 P 2 A 9 ポリペプチド )

本発明の別の局面は、8 4 P 2 A 9 関連タンパク質およびそのポリペプチドフラグメントを提供する。8 4 P 2 A 9 タンパク質の特定の実施形態は、図 2 に示されるようなヒト 8 4 P 2 A 9 のアミノ酸配列の全てまたは部分を有するポリペプチドを含む。あるいは、8 4 P 2 A 9 タンパク質の実施形態は、図 2 に示されるヒト 8 4 P 2 A 9 のアミノ酸配列における変異を有する改変体ポリペプチドを含む。

10

【 0 0 6 5 】

一般的に、ヒト 8 4 P 2 A 9 の天然に存在する対立遺伝子改変体は、高い程度の構造的同一性および相同性 (例えば、9 0 % 以上の同一性) を共有する。代表的に、8 4 P 2 A 9 関連タンパク質の対立遺伝子改変体は、本明細書中に記載される 8 4 P 2 A 9 配列内に保存的アミノ酸置換を含むか、または 8 4 P 2 A 9 ホモログにおいて対応する位置に由来するアミノ酸の置換を含む。8 4 P 2 A 9 対立遺伝子改変体の 1 つのクラスは、特定の 8 4 P 2 A 9 アミノ酸配列の少なくとも小さな領域と高い程度の相同性を共有するタンパク質 20 であるが、この配列とは根本的な背反 (例えば、非保存的置換、短縮化 (t r u n c a t i o n)、挿入、またはフレームシフト) をさらに含むタンパク質である。タンパク質配列の比較において、用語、類似性、同一性、および相同性は、各々異なる意味を有する。さらに、オーソロジー (O r t h o l o g y) およびパラロジー (P a r a l o g y) は、1 つの生物体における所定のタンパク質ファミリーのメンバーの、他の生物体の同じファミリーのメンバーに対する関係を記載する、重要な概念である。

20

【 0 0 6 6 】

保存的アミノ酸置換はしばしば、タンパク質のコンフォメーションも機能も変更することなく、タンパク質中でなされ得る。このような変化としては、以下が挙げられる：イソロイシン (I)、バリン (V)、およびロイシン (L) のいずれか、任意の他のこれらの疎水性アミノ酸についての置換；グルタミン酸 (E) に対するアスパラギン酸 (D)、およびその逆の置換；アスパラギン (N) に対するグルタミン (Q)、およびその逆の置換；ならびに、スレオニン (T) に対するセリン (S)、およびその逆の置換。他の置換はまた、タンパク質の三次元構造における特定のアミノ酸の環境およびその役割に依存して、保存的とみなされ得る。例えば、グリシン (G) およびアラニン (A) は、しばしば交換可能であり得、アラニン (A) およびバリン (V) も同様であり得る。比較的疎水性であるメチオニン (M) はしばしば、ロイシンおよびイソロイシンと交換可能であり得、そして時としてバリンと交換可能であり得る。リジン (K) およびアルギニン (R) はしばしば、そのアミノ酸残基の重要な特徴がその電荷であり、そしてこれら 2 つのアミノ酸残基の異なる p K が重要でない位置において、交換可能である。さらに他の変化が、特定の状況において、「保存的」とみなされ得る (本明細書における表 2 ; 頁 1 3 ~ 1 5 「B i o c h e m i s t r y」第 2 版。L u b e r t S t r y e r 編 (S t a n f o r d U n i v e r s i t y) ; H e n i k o f f r a . , P N A S 1 9 9 2 第 8 9 巻 1 0 9 1 5 ~ 1 0 9 1 9 ; L e i r a , J B i o l . C h e m 1 9 9 5 5 月 1 9 日 ; 2 7 0 ( 2 0 ) : 1 1 8 8 2 ~ 6 を参照のこと)。

30

40

【 0 0 6 7 】

本明細書中に開示される本発明の実施形態は、広範な種々の、当該分野で認められた 8 4 P 2 A 9 タンパク質の改変体 (例えば、アミノ酸の挿入、欠失および置換を有するポリペプチド) を含む。8 4 P 2 A 9 改変体は、当該分野において公知の方法 (例えば、部位特異的変異誘発、アラニンスキャニング (a l a n i n e s c a n n i n g)、および P

50

C R 変異誘発) を使用して作製され得る。部位特異的変異誘発 [Carterら、Nuc . Acids Res . 13 : 4331 (1986) ; Zollerら、Nuc . Acids Res . 10 : 6487 (1987) ]、カセット式変異誘発 [Wellら、Gene 34 : 315 (1985) ]、制限選択的変異誘発 [Wellsら、Philos . Trans . R . Soc . London Ser A 317 : 415 (1986) ] または他の公知技術を、クローン化されたDNAにおいて実施し、84P2A9 改変体DNA を産生し得る。

#### 【0068】

走査型アミノ酸分析もまた、タンパク質間の相互作用のような特定の生物学的活性に關与する、連続配列に沿った1以上のアミノ酸を同定するために使用され得る。とりわけ好ましい走査アミノ酸は、比較的小さい中性アミノ酸である。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが挙げられる。アラニンが、代表的に、この群の中で好ましい走査アミノ酸である。なぜなら、アラニンは、炭素を越えて側鎖を排除し、そして改変体の主鎖コンフォメーションを変更する可能性が低いからである。アラニンもまた、代表的に好ましい。なぜなら、アラニンは、最も一般的なアミノ酸であるからである。さらに、埋没位置および露出位置の両方において、頻繁に見出される [Creighton、The Proteins (W . H . Freeman & Co .、N . Y .) ; Chothia、J . Mol . Biol . 150 : 1 (1976) ]。アラニン置換が適切な量の改変体を生じない場合には、同配体アミノ酸が使用され得る。

#### 【0069】

上記で規定したように、84P2A9の改変体、アナログまたはホモログは、配列番号2のアミノ酸配列を有する84P2A9タンパク質と共通して少なくとも1つのエピトープを有するという特有の特徴を有する。この結果、84P2A9改変体に特異的に結合する抗体またはT細胞はまた、配列番号2のアミノ酸配列を有する84P2A9タンパク質に特異的に結合する。ポリペプチドが、84P2A9タンパク質に特異的に結合する抗体またはT細胞によって認識され得るエピトープをもはや含まない場合、このポリペプチドは、配列番号2に示されるタンパク質の改変体ではなくなる。当業者は、タンパク質を認識する抗体が、異なるサイズのエピトープに結合することを理解する。約4または5アミノ酸(連続してもしなくても)の数のグループ分けは、最小エピトープにおけるアミノ酸の代表的な数とみなされる。例えば、Nairら、J . Immunol . 2000 165 (12) : 6949 ~ 6955 ; Hebbesら、Mol Immunol (1989) 26 (9) : 865 ~ 73 ; Schwartzら、J . Immunol . (1985) 135 (4) : 2598 ~ 608を参照のこと。別の特定のクラスの84P2A9関連タンパク質改変体は、配列番号2のアミノ酸配列またはそのフラグメントと90%以上の同一性を共有する。別の特定のクラスの84P2A9タンパク質改変体またはアナログは、以下に記載されるか、または当該分野で以前に公知であった、84P2A9の生物学的モチーフの1つ以上を含む。従って、開始フラグメントに対して機能(例えば、免疫原性)特性が変化した84P2A9フラグメントのアナログ(核酸またはアミノ酸)は、本発明によって包含される。当該分野の技術範囲であるかそうになっているモチーフが図2の核酸またはアミノ酸配列に適用されることが理解される。

#### 【0070】

本明細書中で考察したように、特許請求された本発明の実施形態は、図2に示される84P2A9タンパク質の504未満のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。例えば、本発明の代表的な実施形態は、以下を含む: 図2(配列番号2)に示される84P2A9タンパク質のうち4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上連続するかのいずれかのアミノ酸を有するペプチド/タンパク質。さらに、本明細書に開示される本発明の例示的な実施形態としては、84P2A9配列の全体にわたって、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸1~約アミノ酸10からなるポリペプチド、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸10~約アミノ酸20からなるポリペプチド、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸20~約アミ

10

20

30

40

50

ノ酸30からなるポリペプチド、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸30～約アミノ酸40からなるポリペプチド、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸40～約アミノ酸50からなるポリペプチド、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸50～約アミノ酸60からなるポリペプチド、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸60～約アミノ酸70からなるポリペプチド、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸70～約アミノ酸80からなるポリペプチド、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸80～約アミノ酸90からなるポリペプチド、および図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸90～約アミノ酸100からなるポリペプチドなどが挙げられる。このスキームに従って、84P2A9タンパク質のアミノ酸100～504のアミノ酸配列の部分からなるポリペプチドが、本発明の代表的な実施形態である。84P2A9タンパク質のより大きな部分からなるポリペプチドもまた意図される。例えば、図2に示される84P2A9タンパク質の約アミノ酸1(または、20もしくは30もしくは40など)個～約アミノ酸20(または、30もしくは40もしくは50など)個からなるポリペプチドが、当該分野において周知の種々の技術によって生成され得る。この段落における開始位置および停止位置は、特定の位置およびその位置プラスマイナス(±)5残基をいうことが理解されるべきである。

#### 【0071】

本明細書中に開示される本発明のさらなる例示的な実施形態は、図2に示されるように、84P2A9関連タンパク質配列内に含まれる1以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む、84P2A9関連タンパク質を含む。1実施形態において、本発明のタンパク質は、1以上の84P2A9核局在配列(例えば、配列番号2の残基42-45のRKR R、配列番号2の残基47-50のRKR R、配列番号2の残基101-104のKR R P、配列番号2の残基135-139のRR R R K、および/または配列番号2の残基186-189のKK R K)を含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、1以上の84P2A9 N-グリコシル化部位(例えば、配列番号2の残基131-134のNRTL、配列番号2の残基212-215のNQT Nおよび/または配列番号2の残基394-397のNC S V)を含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、LUC A 15および/またはK I A A 1 1 5 2に対して相同性を示す84P2A9の1以上の領域を含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、1以上の84P2A9 cAMPおよびcGMP-依存性タンパク質キナーゼリン酸化部位(例えば、配列番号2の残基48-51のKR R Sおよび/または配列番号2の残基102-105のRR P S)を含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、1以上の84P2A9タンパク質キナーゼCリン酸化部位(例えば、配列番号2の残基133-135のTL R、配列番号2の残基152-154のSN K、配列番号2の残基171-173のSD R、配列番号2の残基214-216のTN K、配列番号2の残基313-315のSR R、配列番号2の残基328-330のSS Kおよび/または配列番号2の残基396-398のSV R)を含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、1以上の84P2A9カゼインキナーゼI Iリン酸化部位(例えば、配列番号2の残基10-13のSA LE、配列番号2の残基70-73のSS LE、配列番号2の残基71-74のSL EE、配列番号2の残基91-94のSD SD、配列番号2の残基214-217のTN KD、配列番号2の残基232-235のSE SD、配列番号2の残基240-243のSS TD、配列番号2の残基248-251のTN DE、配列番号2の残基287-290のTE LDおよび/または配列番号2の残基374-377のTE HD)を含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、1以上のN-ミリスチル化部位(例えば、配列番号2の残基67-72のGS D S S L、配列番号2の残基245-250のGL FT ND、配列番号2の残基269-274のGG AC GI、配列番号2の残基336-341のGG TP TS、配列番号2の残基337-342のGT PT SM、配列番号2の残基409-414のGS LC TG、配列番号2の残基459-464のGS GL GRおよび/または配列番号2の残基481-486のGL GL GF)を含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、1以上のアミド化部位(例えば、配列番号2の残基45-48のR

10

20

30

40

50

G R Kおよび/または配列番号2の残基113 - 116のR G K R)を含む。このようなポリペプチドの例示的な実施形態は、以下からなる群から選択される2以上の(配列番号2において、上で同定されるような)アミノ酸配列を含む: K K R K、N Q T N、N C S V、T N K、S R R、S S K、S V R、G L F T N D、G G A C G I、G G T P T S、G T P T S MおよびG S L C T G。好ましい実施形態において、このポリペプチドは、3または4または5または6またはそれより多くの以下の(配列番号2において、上で同定されるような)アミノ酸配列を含む: K K R K、N Q T N、N C S V、T N K、S R R、S S K、S V R、G L F T N D、G G A C G I、G G T P T S、G T P T S MおよびG S L C T G。

#### 【0072】

別の実施形態において、本発明のタンパク質は、例えば、表1に示されるような、本明細書中に記載されるプロセスによって同定される1以上の免疫活性エペトープを含む。HLA分子に対して親和性を有するペプチドおよびアナログ(これらは、免疫原性エペトープとして関連する)を同定するためのプロセスは、当該分野で周知である。免疫原性を調節するために、このようなエペトープのアナログを産生するための原理がまた、開示される。種々の参考文献は、このような分子の同定において有用である。例えば、以下を参照のこと: WO 9733602 (Chestnutら); Sette, Immunogenetics 1999 50(3-4): 201-212; Setteら, J. Immunol. 2001 166(2): 1389-1397; Alexanderら, Immunol. Res. 18(2): 79-92; Sidneyら, Hum. Immunol. 1997 58(1): 12-20; Kondoら, Immunogenetics 1997 45(4): 249-258; Sidneyら, J. Immunol. 1996 157(8): 3480-90; および Falkら, Nature 351: 290-6 (1991); Huntら, Science 255: 1261-3 (1992); Parkerら, J. Immunol. 149: 3580-7 (1992); Parkerら, J. Immunol. 152: 163-75 (1994); Kastら, 1994 152(8): 3904-12; Borrás-Cuestraら, Hum. Immunol. 2000 61(3): 266-278; Alexanderら, J. Immunol. 2000 164(3): 1625-1633; Alexanderら, PMID: 7895164, UI: 95202582; O'Sullivanら, J. Immunol. 1991 147(8): 2663-2669; Alexanderら, Immunity 1994 1(9): 751-761およびAlexanderら, Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92。これによって、これらの刊行物の開示は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

#### 【0073】

本発明の関連する実施形態は、本明細書中で議論される異なるモチーフの組み合わせを含むポリペプチドを含み、ここで、特定の実施形態は、これらのポリペプチドのモチーフまたは介在配列のいずれか内に、挿入、欠失または置換を含まない。さらに、これらのモチーフのいずれかの部位に、多数のN末端アミノ酸残基および/またはC末端アミノ酸残基のいずれかを含む、実施形態が、(例えば、このモチーフが配置されるポリペプチド構築物のより大きな部分を含むために)所望され得る。代表的に、モチーフのいずれかの部位における、N末端アミノ酸残基および/またはC末端アミノ酸残基の数は、約1~約100アミノ酸残基、好ましくは、5~約50アミノ酸残基である。

#### 【0074】

本発明の別の実施形態において、本発明のタンパク質は、1以上の84P2A9の選択的スプライシング改変体(例えば、前立腺癌で過剰発現される4.5KBの転写物によってコードされるスプライシング改変体(図4に示される)に対して固有であるアミノ酸配列を含む。84P2A9の選択的スプライシング改変体のモニタリングは、有用である。なぜなら、タンパク質の選択的スプライシングにおける変化は、癌の進行を導く一連の事象における1つの工程として示唆されるからである(例えば、Carstensら、Onc

10

20

30

40

50

ogene 15 (250:3059-3065 (1997)) を参照のこと)。結果として、84P2A9の選択的スプライシング改変体のモニタリングは、84P2A9遺伝子産物における摂動に関連する症候群(例えば、癌)を評価するためのさらなる手段を提供する。

#### 【0075】

本明細書中で議論された1以上の84P2A9モチーフを含むポリペプチドは、本明細書中で議論された84P2A9モチーフが増殖調節不全に関連するという観察の観点から、そして84P2A9が癌において過剰発現されるので(図4)、悪性疾患表現型の特異的特性の解明に有用である。従って、これらの酵素または分子に関連するモチーフのタンパク質の存在は、明らかである。例えば、カゼインキナーゼII、cAMPおよびcCMP依存性タンパク質キナーゼ、ならびにタンパク質キナーゼCは、例えば、悪性疾患表現型の発生に関連することが公知の酵素である(例えば、Chenら、Lab Invest., 78(2):165-174(1998); Gaiddonら、Endocrinology 136(10):4331-4338(1995); Hallら、Nucleic Acids Research 24(6):1119-1126(1996); Peterzielら、Oncogene 18(46):6322-6329(1999)およびO'Brianら、Oncol. Rep. 5(2):305-309(1998)を参照のこと)。さらに、グリコシル化およびミリスチル化の両方は、癌および癌進行にも関連するタンパク質修飾である(例えば、Dennisら、Biochim. Biophys. Acta 1473(1):21-34(1999); Rajuら、Exp. Cell Res. 235(1):145-154(1997)を参照のこと)。アミド化は、癌および癌進行に關与する別のタンパク質の改変である(例えば、Trestonら、J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (13):169-175(1992)を参照のこと)。さらに、核局在配列は、悪性の細胞の能力に影響を与えると考えられる(例えば、Mirskiら、Cancer Res. 55(10):2129-2134(1995)を参照のこと)。

#### 【0076】

本発明のタンパク質は、多くの異なる特異的用途を有する。84P2A9は、前立腺癌において高度に発現されることが示されるので(図4)、これらのペプチド/タンパク質は、正常組織対癌性組織における84P2A9遺伝子産物の状態を評価するための方法、および悪性疾患表現型を解明するための方法において使用され得る。代表的に、84P2A9タンパク質の特定の領域をコードするポリペプチドは、84P2A9遺伝子産物の特定の領域(例えば、核局在シグナルを含む領域)における摂動(例えば、欠失、挿入、点変異など)の存在を評価するために使用され得る。例示的アッセイは、84P2A9ポリペプチド配列内に含まれる1以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む84P2A9関連タンパク質を標的化する抗体またはT細胞を利用して、正常組織対癌性組織における、この領域の特性を評価し得る。あるいは、84P2A9タンパク質内に含まれる1以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む84P2A9ポリペプチドは、84P2A9のこの領域と相互作用する因子をスクリーニングするために使用され得る。

#### 【0077】

本明細書中で議論されるように、遺伝コードにおける縮重は、84P2A9遺伝子配列における変更を可能にする。特に、当業者は、特定の宿主種によって特定のコドンの好ましさを認識し、そして所望の宿主に好ましいように、開示された配列を適応させ得る。例えば、好ましいアナログコドン配列は、代表的に、希少コドン(すなわち、所望の宿主の公知の配列において、約20%未満の使用頻度を有するコドン)が、高頻度のコドンで置換されている。特定の種についてのコドンの好ましさは、例えば、以下のアドレスの、INTERNET上で利用可能なコドン使用表を利用することによって算出され得る：<http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html>。約20%未満の使用頻度を有する任意のコドンを置換することによって、特定の宿主種について最適化されたヌクレオチド配列は、本明細書中で「コドン最適化配列」

10

20

30

40

50

と呼ばれる。

【0078】

さらなる配列改変が、細胞宿主におけるタンパク質発現を増強するのに公知である。これらとしては、偽性のポリアデニル化シグナル、エキソン/イントロンスプライシング部位シグナル、トランスポゾン様反復、をコードする配列の排除、および/または遺伝子発現に有害である、他のこのような、よく特徴付けられた配列の排除が挙げられる。配列のGC含量は、所定の細胞宿主について、その宿主細胞において発現される公知の遺伝子を参照して算出されるように、平均レベルに調整され得る。可能な場合、この配列は、予測されるヘアピンmRNA二次構造を回避するように改変され得る。他の有用な改変としては、Kozak, Mol. Cell. Biol. 9: 5073 - 5080 (1989)に記載のように、オープンリーディングフレームの開始における、翻訳開始コンセンサス配列の付加が挙げられる。当業者は、排他的に5'近位AUGコドンにおいて、真核生物のリボソーム開始翻訳が希少条件下でのみ排除される一般法則を理解する(例えば、Kozak PNAS 92(7): 2662 - 2666、(1995)およびKozak NAR 15(20): 8125 - 8148 (1987)を参照のこと)。コドン最適化に加えて、偽性のポリアデニル化配列の排除、エキソン/イントロンスプライシングシグナルの排除、トランスポゾン様反復の排除、および/またはGC含量の最適化によって、所定の宿主種における発現を最適化されたヌクレオチド配列は、本明細書中で、「発現増強配列」と呼ばれる。

10

【0079】

84P2A9タンパク質は、多くの形態、好ましくは、単離された形態で具体化される。精製された84P2A9タンパク質分子は、84P2A9の抗体または他のリガンドへの結合を損なう、他のタンパク質または分子を実質的に含まない。単離および精製の性質および程度は、意図される用途に依存する。84P2A9タンパク質の実施形態として、精製された84P2A9タンパク質、および機能的な可溶性84P2A9タンパク質が挙げられる。1実施形態において、このような機能的な可溶性84P2A9タンパク質またはそのフラグメントは、抗体、T細胞または他のリガンドによって結合されるべき能力を保持する。

20

【0080】

本発明はまた、84P2A9アミノ酸配列の生物学的に活性なフラグメント(図2に示される84P2A9のアミノ酸配列の部分に対応する)を含む、84P2A9タンパク質を提供する。本発明のこのようなタンパク質は、84P2A9タンパク質の特性(例えば、84P2A9タンパク質に関連するエピトープと特異的に結合する抗体の産生を誘発する能力;このような抗体によって結合されるべき能力;HTLもしくはCTLの活性化を惹起する能力;および/またはHTLもしくはCTLによって認識されるべき能力)を示す。

30

【0081】

84P2A9関連タンパク質は、当該分野において周知の、標準的なペプチド合成技術または化学切断方法を使用して生成され得る。あるいは、組換え方法を使用して、84P2A9関連タンパク質をコードする核酸分子を生成し得る。1実施形態において、本明細書中に記載される84P2A9コード核酸分子は、84P2A9タンパク質の規定のフラグメントを生成するための手段を提供する。84P2A9タンパク質フラグメント/配列は、ドメイン特異的抗体(例えば、84P2A9タンパク質の細胞外エピトープまたは細胞内エピトープを認識する抗体)の生成および特徴付け、84P2A9またはその特定の構造ドメインに結合する薬剤または細胞因子の同定、ならびに種々の治療状況(癌ワクチンまたはこのようなワクチンを調製する方法を含むが、これらに限定されない)において、特に有用である。

40

【0082】

特定の興味深い構造を含む84P2A9ポリペプチドは、例えば、以下:Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisen

50

berg、Karpplus-SchultzまたはJameson-Wolf分析の方法を含む、当該分野で周知の種々の分析技術を使用するか、または免疫原性に基づいて、予測および/または同定され得る。このような構造を含むフラグメントは、サブユニット特異的抗84P2A9抗体もしくはT細胞の生成、または84P2A9に結合する細胞因子の同定において、特に有用である。

#### 【0083】

このことを例示する際に、84P2A9タンパク質からのペプチドのヒトMHCクラスI分子HLA-A2への結合を、予測した。具体的には、84P2A9タンパク質の完全なアミノ酸配列を、BioinformaticsおよびMolecular Analysis Section (BIMAS) Webサイト (<http://bimas.dcrt.nih.gov/>) において見出されるHLA Peptide Motif Searchアルゴリズムに入力した。このHLA Peptide Motif Searchアルゴリズムは、HLAクラスI分子および特にHLA-A2の溝における特定のペプチド配列の結合に基づいて、Dr. Ken Parkerによって開発された(例えば、Falckら、Nature 351:290-6 (1991); Huntら、Science 255:1261-3 (1992); Parkerら、J. Immunol. 149:3580-7 (1992); Parkerら、J. Immunol. 152:163-75 (1994))を参照のこと)。このアルゴリズムは、HLA-A2および多数の他のHLAクラスI分子との予測された結合に関して、完全なタンパク質配列の8量体、9量体、および10量体ペプチドの配置および順位付け(ranking)を可能にする。多くのHLAクラスI結合ペプチドは、8量体、9量体、10量体または11量体である。例えば、クラスI HLA-A2に関して、このエピトープは、好ましくは、2の位置にロイシン(L)またはメチオニン(M)およびC末端にバリン(V)またはロイシン(L)を含む(例えば、Parkerら、J. Immunol. 149:3580-7 (1992))を参照のこと)。ペプチドと結合すると予測された84P2A9の選択された結果は、以下の表1に示される。DIMASサイトによって予測されるか、または適用されるべき当該分野で適用可能なHLAクラスIまたはクラスIモチーフ(例えば、視覚的もしくはコンピュータに基づいた方法、または関連分野の当業者によって理解される)によって特定されるか、または当該分野の一部となった、いずれのエピトープも、本発明の範囲内であることが理解されるべきである。表1において、各ファミリーメンバーの候補物に順位付けするトップ10は、それらの配置、各特定のペプチドのアミノ酸配列、および見積もられた結合スコアと共に示される。この結合スコアは、37、pH6.5でペプチドを含む複合体の分離に関する、見積もられた半減期に対応する。最も高い結合スコア(すなわち、63.04(84P2A9))を有するペプチドは、細胞表面上でHLAクラスIに最も長期間最も堅く結合すると予測され、従って、T細胞認識について最良の免疫原性標的を提示する。ペプチドのHLA対立遺伝子との実際の結合は、抗原処理欠損細胞株T2上でのHLA発現の安定化によって評価され得る(例えば、Xueら、Prostate 30:73-8 (1997)およびPeshwaら、Prostate 36:129-38 (1998))を参照のこと)。特定のペプチドの免疫原性は、樹状細胞のような細胞を提示する抗原の存在下で、CD8+細胞障害性Tリンパ球(CTL)の刺激によってインビトロで評価され得る。

#### 【0084】

以下の例において記載される実施形態において、84P2A9は、市販の発現ベクター(例えば、C末端6XHisおよびMYCタグを有する、84P2A9をコードするCMV駆動発現ベクター(pCDNA3.1/mycHis, InvitrogenまたはTag5, GenHunter Corporation, Nashville TN))を用いてトランスフェクトされた細胞(例えば、293T細胞)において、従来発現され得る。Tag5ベクターは、トランスフェクトされた細胞中で、分泌された84P2A9タンパク質の産生を容易にするために使用され得る、IgGK分泌シグナルを提供する。培養培地中で分泌されたHIS-標的84P2A9は、例えば、標準的な技術を使用する二

ツケルカラムを使用して、精製され得る。

【0085】

84P2A9 関連タンパク質の改変（例えば、共有結合性改変）は、本発明の範囲内に含まれる。1つの型の共有結合性改変としては、84P2A9の選択された側鎖あるいはN末端残基またはC末端残基と反応し得る有機誘導体化薬剤との、84P2A9ポリペプチドの標的化されたアミノ酸残基の反応が挙げられる。本発明の範囲内に含まれる84P2A9ポリペプチドの別の型の共有結合性改変としては、本発明のタンパク質のネイティブなグリコシル化パターンの変更が挙げられる。「ネイティブなグリコシル化パターンの変更」は、本明細書中の目的を意図し、ネイティブ配列84P2A9に見い出される1以上の炭水化物部分の欠失（基礎となるグリコシル化部位の除去、または化学的手段および/または酵素的手段によるグリコシル化の欠失のいずれかによって）、および/またはネイティブ配列84P2A9に存在しない、1以上のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この句は、存在する種々の炭水化物部分の性質および割合の変更を含む、ネイティブタンパク質のグリコシル化の質的变化を含む。84P2A9の別の型の共有結合性改変としては、米国特許第4,640,835号、同第4,496,689号、同第4,301,144号、同第4,670,417号、同第4,791,192号または同第4,179,337号に示されるような様式の、種々の非タンパク質様ポリマー（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またはポリオキシアルキレン）のうちの1つへの、84P2A9ポリペプチドの連結が挙げられる。

10

【0086】

本発明の84P2A9はまた、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合された84P2A9を含むキメラ分子を形成する様式で、改変され得る。このようなキメラ分子は、化学的または組換え的に合成され得る。キメラ分子は、別の腫瘍関連抗原またはそのフラグメントに融合された本発明のタンパク質を有し得るか、または84P2A9配列のフラグメントの融合体（アミノ酸または核酸）を含み得、図2（配列番号2）のアミノ酸配列または核酸配列のそれぞれに対して、その長さを通じて直接的に相同性でない分子が、産生され；このようなキメラ分子は、複数の84P2A9の同一の配列を含み得る。キメラ分子としては、ポリヒスチジンエピトープタグを有する84P2A9関連タンパク質の融合体が挙げられ得、このタグは、固定されたニッケルが選択的に結合し得るエピトープを提供する。このエピトープタグは、一般に、84P2A9のアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。代替的实施形態において、このキメラ分子は、84P2A9関連タンパク質の、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合体を含み得る。キメラ分子の二価形態（「免疫付着因子（immunoadhesion）」とも呼ばれる）について、このような融合体は、IgG分子のFc領域に対するものであり得る。このIg融合体は、好ましくは、Ig分子内の少なくとも1つの可変領域の代わりに、84P2A9ポリペプチドの可溶性（膜貫通ドメインを欠失または不活性化した）形態での置換を含む。特に好ましい実施形態において、免疫グロブリン融合体は、IgGI分子のヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域、またはヒンジ領域、CH1領域、CH2領域およびCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の産生については、米国特許第5,428,130号（1995年6月27日公布）もまた参照のこと。

20

30

40

【0087】

（84P2A9抗体）

本発明の別の局面は、84P2A9関連タンパク質およびポリペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、84P2A9関連タンパク質に特異的に結合し、そして非84P2A9タンパク質と結合しない（または、弱く結合する）。別の実施形態において、抗体は、84P2A9抗体関連タンパク質およびそのホモログと結合する。

【0088】

本発明の84P2A9抗体は、前立腺癌の診断アッセイおよび予後アッセイ、ならびに画像化方法において特に有用であり得る。同様に、このような抗体は、84P2A9が他の型の癌でもまた発現または過剰発現される限り、他の癌の処置、診断および/または予後

50

に有用である。さらに、細胞内で発現された抗体（例えば、単鎖抗体）は、84P2A9の発現に関与する癌（例えば、進行した前立腺癌および転位性前立腺癌）を処置する際に治療学的に有用である。

【0089】

本発明はまた、84P2A9および変異体84P2A9関連タンパク質の、検出および定量に有用な種々の免疫学的アッセイを提供する。このようなアッセイは、適切には、84P2A9または変異体84P2A9タンパク質を認識および結合し得る、1以上の84P2A9抗体を含み、そして、以下を含むが、これらに限定されない当該分野で周知の種々の免疫学的アッセイ形式で行われ得る：種々の型のラジオイムノアッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、酵素連結免疫蛍光アッセイ（ELIFA）など。

10

【0090】

本発明の、関連する免疫的だが非抗体性のアッセイはまた、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）および主要組織適合遺伝子複合体（MHC）結合アッセイを含む。さらに、84P2A9を発現する前立腺癌および他の癌を検出し得る画像化方法がまた、本発明によって提供され、この方法には、標識化84P2A9抗体を使用する、ラジオシンチグラフィ画像化方法が挙げられるが、これらに限定されない。このようなアッセイは、84P2A9を発現する癌（例えば、前立腺癌）の検出、モニタリングおよび予後において、臨床的に有用である。

【0091】

84P2A9抗体はまた、84P2A9および変異体84P2A9のタンパク質およびポリペプチドの精製、ならびに84P2A9ホモログおよび関連分子の単離のための方法において使用され得る。例えば、1つの実施形態において、84P2A9タンパク質を精製する方法は、84P2A9抗体（これは、固体マトリックスに結合されている）を、84P2A9を含有する溶解物または他の溶液と共に、この84P2A9抗体が84P2A9に結合するのを可能にする条件下でインキュベートする工程；固体マトリックスを洗浄して不純物を除去する工程；および84P2A9をその結合された抗体から溶出する工程を包含する。本発明の84P2A9抗体の他の用途としては、84P2A9タンパク質を模倣する抗イディオタイプ抗体の産生が挙げられる。

20

【0092】

抗体の調製のための種々の方法が、当該分野で周知である。例えば、抗体は、単離または免疫結合体化された形態の、84P2A9関連タンパク質、ペプチドまたはフラグメントを使用して、適切な哺乳動物宿主を免疫することによって調製され得る（Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press 編、HarlowおよびLane（1988）；Harlow、Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY（1989））。さらに、84P2A9の融合タンパク質（例えば、84P2A9 GST融合タンパク質）もまた使用され得る。特定の実施形態において、図2のオープンリーディングフレームアミノ酸配列の全てまたはほとんどを含むGST融合タンパク質が産生され、そして適切な抗体を産生するための免疫原として使用される。別の実施形態において、84P2A9ペプチドが合成され、そして免疫原として使用される。

30

40

【0093】

さらに、当該分野で公知の裸のDNA免疫技術を（精製された84P2A9タンパク質または84P2A9発現細胞を用いるか、または用いずに）使用して、そのコードされる免疫原に対する免疫応答を産生し得る（概要については、Donnellyら、1997、Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648を参照のこと）。

【0094】

図2に示されるような84P2A9のアミノ酸配列を使用して、抗体を産生するために84P2A9タンパク質の特定の領域を選択し得る。例えば、84P2A9アミノ酸配列の疎水性および親水性分析を使用して、84P2A9構造の親水性領域を同定し得る。免疫原性構造を示す84P2A9タンパク質の領域、ならびに他の領域およびドメインは、以

50

下のような当該分野で公知の種々の他の方法を使用して容易に同定され得る：例えば、Chou - Fasman、Garnier - Robson、Kyte - Doolittle、Eisenberg、Karplus - SchultzまたはJameson - Wolf分析。従って、これらのプログラム/方法のいずれかによって同定された領域は、本発明の範囲内にある。84P2A9抗体の産生のための方法はさらに、本明細書中に提供される実施例によって例示される。

【0095】

免疫原としての使用のためのタンパク質またはポリペプチドを調製するための方法、およびキャリア（例えば、BSA、KLHまたは他のキャリアタンパク質）とのタンパク質の免疫原性結合体を調製するための方法は、当該分野で周知である。いくつかの状況下で、例えば、カルボジイミド試薬を使用する直接的な結合体化が使用され；他の例において、連結試薬（例えば、Pierce Chemical Co., Rockford, ILによって供給される連結試薬）が、効果的である。84P2A9免疫原の投与は一般に、当該分野で一般に理解されるように、適切な期間にわたって、適切なアジュバントの使用を用いた注射によって行われ得る。免疫スケジュールの間、抗体の力価は、抗体形成の能力（adequacy）を決定することによって理解され得る。

【0096】

84P2A9モノクローナル抗体は、当該分野で周知の種々の手段によって産生され得る。例えば、所望のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株が、一般に公知のように、KohlerおよびMilsteinの標準的なハイブリドーマ技術、または産生性（producing）B細胞を不死化する改変を使用して調製される。所望の抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原が84P2A9関連タンパク質である免疫アッセイによってスクリーニングされる。所望の抗体を分泌する適切な不死化細胞培養物が同定された場合、これらの細胞を拡大してインビトロ培養物または腹水のいずれかから抗体が産生され得る。

【0097】

抗体またはフラグメントはまた、現在の技術を使用する、組換え手段によって産生され得る。84P2A9タンパク質の所望の領域に特異的に結合する領域はまた、複数の種の起源のキメラ抗体または相補性決定領域（CDR）移植化（grafted）抗体の状況下で産生され得る。ヒト化84P2A9抗体またはヒト84P2A9抗体もまた産生され得、そして治療的状況下での使用のために好ましい。1以上の非ヒト抗体CDRを、対応するヒト抗体配列と置換することによる、マウス抗体および他の非ヒト抗体をヒト化するための方法は、周知である（例えば、Jonesら、1986、Nature 321:522-525；Riechmannら、1988、Nature 332:323-327；Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-1536を参照のこと）。Carterら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285、およびSimsら、1993、J. Immunol. 151:2296もまた参照のこと。完全なヒトモノクローナル抗体を産生するための方法としては、ファージディスプレイ法およびトランスジェニック法が挙げられる（総説については、Vaughanら、1998、Nature Biotechnology 16:535-539を参照のこと）。

【0098】

完全なヒト84P2A9モノクローナル抗体は、大きいヒトIg遺伝子コンビナトリアルライブラリー（すなわち、ファージディスプレイ）を使用するクローニング技術を使用して産生され得る（Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications (Man. Clark, M. (編)、Nottingham Academic、45-64頁(1993)のGriffithsおよびHoo genboom、Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries；BurtonおよびBarbas、Human Antibodie

10

20

30

40

50

s from combinatorial libraries (同書) 65 - 82 頁)。完全なヒト 84P2A9 モノクローナル抗体はまた、PCT 特許出願 WO 98/24893 (Kucherlapati および Jakobovits ら、1997 年 12 月 3 日公開) に記載されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作されたトランスジェニックマウスを使用して産生され得る (Jakobovits、1998、Exp. Opin. Invest. Drugs 7 (4) : 607 - 614 もまた参照のこと)。この方法は、ファージディスプレイ技術に必要とされるインビトロ操作を回避し、そして高親和性の真正ヒト抗体を効率的に産生する。

#### 【0099】

84P2A9 抗体の 84P2A9 関連タンパク質との反応性は、適切には、84P2A9 関連タンパク質、84P2A9 ペプチド、84P2A9 発現細胞またはその抽出物を使用する、多数の周知の手段 (ウエスタンブロット、免疫沈降、ELISA および FACS 分析を含む) によって確認され得る。

#### 【0100】

本発明の 84P2A9 抗体またはそのフラグメントは、検出可能なマーカーで標識されるか、または第 2 の分子に結合体化され得る。適切な検出可能なマーカーとしては、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、2 以上の 84P2A9 エピトープに特異的な二重特異性の抗体が、当該分野で一般に公知の方法を使用して産生され得る。ホモダイマー性の抗体もまた、当該分野で公知の架橋技術によって産生され得る (例えば、Wolf ら、Cancer Res. 53 : 2560 - 2565)。

#### 【0101】

(84P2A9 トランスジェニック動物)

84P2A9 またはその改変形態をコードする核酸はまた、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物のいずれかを生成するために使用され得、これらの動物は、次いで、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である。確立された技術に従って、84P2A9 をコードする cDNA は、84P2A9 コードするゲノム DNA をクローニングするために使用され得、そしてそのゲノム配列は、84P2A9 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生成するために使用され得る。トランスジェニック動物 (特に、マウスまたはラットのような動物) を生成するための方法は、当該分野で慣用的となり、そして例えば、米国特許第 4,736,866 号および米国特許第 4,870,009 号に記載される。代表的に、特定の細胞が、組織特異的エンハンサーと共に 84P2A9 導入遺伝子の組み込みのために標的化される。

#### 【0102】

84P2A9 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を使用して、84P2A9 をコードする DNA の発現の増大の効果を試験し得る。このような動物は、例えば、その過剰発現と関連する病理学的状態からの防御を付与すると考えられる試薬についての、試験動物として使用され得る。本発明のこの局面に従って、動物を試薬で処置し、そしてこの導入遺伝子を保有する処置していない動物と比較した、その病理学的状態の発生率の減少は、その病理学的状態についての潜在的な治療的介入を示す。

#### 【0103】

あるいは、84P2A9 の非ヒトホモログを使用して、84P2A9 「ノックアウト」動物を構築し得、この動物は、84P2A9 をコードする内因性遺伝子とその動物の胚細胞に導入された 84P2A9 をコードする改変ゲノム DNA と間の相同組換えの結果として、84P2A9 をコードする欠損性または 84P2A9 をコードする改変遺伝子を有する。例えば、84P2A9 をコードする cDNA を使用して、確立された技術に従って、84P2A9 をコードするゲノム DNA をクローニングし得る。84P2A9 をコードするゲノム DNA の一部は、欠失され得るか、または別の遺伝子 (例えば、組み込みをモニターするために使用され得る、選択マーカーをコードする遺伝子) で置換され得る。代表的に、数千ベースの変更されていない隣接 DNA (5' 末端および 3' 末端の両方) が、

10

20

30

40

50

そのベクターに含まれる（相同組換えベクターの記載については、例えば、Thomas および Capocchi、Cell、51：503（1987）を参照のこと）。このベクターは、胚性幹細胞株に（例えば、エレクトロポレーションによって）導入され、そして導入されたDNAが内因性のDNAと相同組換えした細胞が、選択される（例えば、Lira、Cell、69：915（1992）を参照のこと）。次いで、この選択された細胞を、動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞に注射し、凝集キメラを形成させる（例えば、Bradley、Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells：A Practical Approach、E. J. Robertson編（IRL、Oxford、1987）、113-152頁を参照のこと）。次いで、キメラ性の胚を、適切な偽妊娠雌性養母動物に移植し、そしてその胚は、満期まで育成させて、「ロックアウト」動物を作製し得る。生殖細胞中に相同組換えされたDNAを有する子孫は、標準的な技術によって同定され得、そしてその子孫を用いて、全ての細胞が相同組換えDNAを含む動物を育種し得る。ロックアウト動物は、例えば、84P2A9ポリペプチドの非存在に起因する、特定の病理学的状態に対して防御する能力および病理学的状態の発生について、特徴付けられ得る。

10

#### 【0104】

（84P2A9の検出のための方法）

本発明の別の局面は、84P2A9ポリヌクレオチド、ならびに84P2A9関連タンパク質およびその改変体を検出するための方法、そして84P2A9を発現する細胞を同定するための方法に関する。84P2A9は、前立腺癌のリンパ節転移および骨転移に由来するLAPC異種移植片において発現されるようである。84P2A9の発現プロファイルは、それを転移された疾患についての潜在的な診断マーカーにする。この状況において、84P2A9遺伝子産物の状態は、進行した段階の疾患に対する感受性、進行速度および/または腫瘍の凝集性を含む、種々の因子を予測するために有用な情報を提供する。以下で詳細に議論されるように、患者サンプル中の84P2A9遺伝子産物の状態は、以下を含む当該分野で周知の種々のプロトコルによって分析され得る：免疫組織化学分析、インサイチュハイブリダイゼーションを含む種々のノザンプロット技術、RT-PCR分析（例えば、レーザ捕捉微小分析サンプルに対して）、ウエスタンプロット分析および組織アレイ分析。

20

#### 【0105】

より詳細には、本発明は、生物学的サンプル（例えば、血清、骨、前立腺および他の組織、尿、精液、細胞調製物など）中の84P2A9ポリヌクレオチドの検出のためのアッセイを提供する。検出可能な84P2A9ポリヌクレオチドとしては、例えば、84P2A9遺伝子またはそのフラグメント、84P2A9 mRNA、選択的スプライシング改変体84P2A9 mRNA、および84P2A9ポリヌクレオチドを含む組換えDNAもしくはRNA分子が挙げられる。84P2A9ポリヌクレオチドを増幅し、そして/または84P2A9ポリヌクレオチドの存在を検出するための多くの方法は、当該分野において周知であり、そして本発明のこの局面の実施に用いられ得る。

30

#### 【0106】

1つの実施形態において、生物学的サンプル中の84P2A9 mRNAを検出するための方法は、少なくとも1つのプライマーを使用して、逆転写によってサンプルからcDNAを産生する工程；その中の84P2A9 cDNAを増幅するために、センスおよびアンチセンスのプライマーとして84P2A9ポリヌクレオチドを使用して、そのように産生されたcDNAを増幅する工程；ならびに増幅された84P2A9 cDNAの存在を検出する工程、を包含する。必要に応じて、増幅された84P2A9 cDNAの配列が、決定され得る。

40

#### 【0107】

別の実施形態において、生物学的サンプル中の84P2A9遺伝子を検出する方法は、サンプルからゲノムDNAを最初に単離する工程；その中の84P2A9遺伝子を増幅するために、センスおよびアンチセンスのプライマーとして84P2A9ポリヌクレオチドを

50

使用して単離されたゲノムDNAを増幅する工程；ならびに増幅された84P2A9遺伝子の存在を検出する工程、を包含する。任意の多くの適切なセンスプローブおよびアンチセンスプローブの組合せが、84P2A9について提供されるヌクレオチド配列（図2）から設計され、そしてこの目的のために使用され得る。

**【0108】**

本発明はまた、組織または他の生物学的サンプル（例えば、血清、骨、前立腺、および他の組織、尿、細胞調製物など）中の84P2A9関連タンパク質の存在を検出するためのアッセイを提供する。84P2A9関連タンパク質を検出するための方法もまた、周知であり、そして例えば、免疫沈降、免疫組織化学分析、ウエスタンブロット分析、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFAなどが挙げられる。例えば、1つの実施形態において、生物学的サンプル中の84P2A9タンパク質の存在を検出する方法は、84P2A9抗体、その84P2A9反応性フラグメント、または84P2A9抗体の抗原結合領域を含む組換えタンパク質と、サンプルとを最初に接触させる工程；ならびに次いで、それに対するサンプル中の84P2A9タンパク質の結合を検出する工程、を包含する。

10

**【0109】**

84P2A9を発現する細胞を同定するための方法もまた、提供される。1つの実施形態において、84P2A9遺伝子を発現する細胞を同定するためのアッセイは、細胞中の84P2A9 mRNAの存在を検出する工程を包含する。細胞中の特定のmRNAを検出するための方法は、周知であり、そして例えば、相補DNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、標識された84P2A9リボプローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーション、ノザンブロットおよび関連技術）ならびに種々の核酸増幅アッセイ（例えば、84P2A9に特異的な相補プライマーを使用するRT-PCR、および例えば、分岐DNA、SISBA、TMAなどのような他の増幅型検出方法）が挙げられる。あるいは、84P2A9遺伝子を発現する細胞を同定するためのアッセイは、細胞中の84P2A9タンパク質または細胞によって分泌された84P2A9タンパク質の存在を検出する工程を包含する。タンパク質を検出するための種々の方法が、当該分野において周知であり、そして84P2A9関連タンパク質および84P2A9発現細胞の検出のために用いられる。

20

**【0110】**

84P2A9発現分析はまた、84P2A9遺伝子発現を調節する薬剤を同定かつ評価するためにツールとして有用であり得る。例えば、84P2A9発現は、前立腺癌で有意に上方制御され、そしてまた、他の癌（前立腺癌、精巣癌、腎臓癌、脳腫瘍、骨肉腫、皮膚癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、結腸癌、リンパ性癌および肺癌を含む）において発現される。癌細胞での84P2A9発現または過剰発現を阻害し得る分子または生物学的薬剤の同定は、治療上の価値がある。例えば、このような薬剤は、RT-PCR、核酸ハイブリダイゼーションまたは抗体結合によって84P2A9発現を定量するスクリーニングを使用して、同定され得る。

30

**【0111】**

（84P2A9およびその産物の状態のモニタリング）  
個体における84P2A9遺伝子および84P2A9遺伝子産物の状態を評価するアッセイは、この個体に由来する生物学的サンプルの増殖または腫瘍形成能力に関する情報を提供し得る。例えば、84P2A9 mRNAは、正常前立腺組織に比べて前立腺癌（ならびに、例えば図4～8に示される他の癌組織）においてかなり多く発現されるので、生物学的サンプル中の84P2A9 mRNA転写物または84P2A9タンパク質の相対レベルを評価するアッセイは、84P2A9調節不全と関連する疾患（例えば、癌）を診断するために使用され得、そして適切な治療選択肢を規定するに有用である予後情報を提供し得る。

40

**【0112】**

84P2A9は、例えば種々の前立腺癌異種移植組織および癌細胞株、および癌患者サンプル中で発現するので、84P2A9の発現状態は、形成異常細胞、前癌性細胞および癌

50

性細胞の存在、段階および位置を含む情報を決定するため、種々段階に対する疾患の感受性を予測するため、および/または腫瘍攻撃性を判断するために有用な情報を提供する。さらに、この発現プロファイルは、転移した疾患の画像化試薬として有用にする。従って、本発明の重要な局面は、生物学的サンプル（例えば、癌のような調節不能の細胞増殖によって特徴付けられる病理に罹患しているか、または罹患していると疑われる個体由来のもの）における 8 4 P 2 A 9 の状態を試験するための種々の分子予後方法および診断方法に関する。

#### 【 0 1 1 3 】

腫瘍形成は、細胞増殖が次第に調節不能になり、そして細胞が正常な病理状態から前癌状態、次いで癌状態に進行する、複数段階プロセスであることが公知である（例えば、A l e r s ら、L a b I n v e s t . 7 7 ( 5 ) : 4 3 7 ~ 4 3 8 ( 1 9 9 7 ) および I s a a c s ら、C a n c e r S u r v . 2 3 : 1 9 ~ 3 2 ( 1 9 9 5 ) を参照のこと）。この状況において、調節不能な細胞増殖（例えば、前立腺癌における異常な 8 4 P 2 A 9 発現）の証拠について生物学的サンプルの試験をすることは、癌のような病理が治療選択肢がより限定される段階に進行する前の、このような異常な細胞病理の早期検出を可能にし得る。このような試験において、目的の生物学的サンプル（例えば、調節不能な細胞増殖を有することを疑われるヒト）における 8 4 P 2 A 9 の状態は、例えば、対応する正常サンプル（例えば、病理によって影響されていない個体（またあるいは別の個体）（例えば、調節不能な細胞増殖を有すると疑われない人）由来のサンプル）における 8 4 P 2 A 9 の状態と比較され得る。目的の生物学的サンプル中の 8 4 P 2 A 9 の状態における変化（正常サンプルと比較して）は、調節不能な細胞増殖の証拠を提供する。正常サンプルとして、病理によって影響されていない生物学的サンプルを使用することに加えて、所定の基準値（例えば、mRNA 発現の、所定の正常レベル（例えば、G r e v e r ら、J . C o m p . N e u r o l . 1 9 9 6 D e c 9 , 3 7 6 ( 2 ) : 3 0 6 ~ 1 4 および米国特許第 5 , 8 3 7 , 5 0 1 号を参照のこと）もまた使用して、正常サンプルにおける 8 4 P 2 A 9 と対比して疑わしいサンプルにおける 8 4 P 2 A 9 を比較し得る。

#### 【 0 1 1 4 】

この文脈における用語「状態」とは、その分野で許容される意味に従って使用され、そして遺伝子およびその産物の状況または状態をいう。代表的に、当業者は、遺伝子およびその産物の状況または状態を評価するための多くのパラメーターを使用する。これらには、発現される遺伝子産物の位置（8 4 P 2 A 9 発現細胞の位置を含む）、ならびに発現される遺伝子産物（例えば、8 4 P 2 A 9 mRNA ポリヌクレオチドおよびポリペプチド）のレベルおよび生物学的活性が挙げられるがこれらに限定されない。8 4 P 2 A 9 の状態における変化は、当該分野で周知の、多種多様な方法論（代表的に本明細書中に記載されるもの）によって評価され得る。代表的に、8 4 P 2 A 9 の状態における変化は、8 4 P 2 A 9 および/または 8 4 P 2 A 9 発現細胞の位置、ならびに/あるいは 8 4 P 2 A 9 mRNA 発現における上昇および/またはタンパク質発現における上昇を含む。

#### 【 0 1 1 5 】

本明細書中で詳細に議論されるように、調節不能な細胞増殖に関連した状況または現象を同定する目的で、生物学的サンプルにおける 8 4 P 2 A 9 の状態が、当業者によって利用される多くの方法（ゲノムサザン分析（例えば、8 4 P 2 A 9 遺伝子における摂動（p e r t u r b a t i o n）を検査するため）、8 4 P 2 A 9 mRNA のノーザン分析および/または PCR 分析（例えば、8 4 P 2 A 9 mRNA のポリヌクレオチド配列または発現レベルの変化を検査するため）、およびウエスタン分析および/または免疫組織化学分析（例えば、ポリペプチド配列、サンプル中のポリペプチド位置の変化、8 4 P 2 A 9 タンパク質の発現レベルの変化および/または 8 4 P 2 A 9 タンパク質とポリペプチド結合パートナーとの関連を検査するため）が挙げられるがこれらに限定されない）によって評価される。検出可能な 8 4 P 2 A 9 ポリヌクレオチドには、例えば、8 4 P 2 A 9 遺伝子またはそのフラグメント、8 4 P 2 A 9 mRNA、選択的スプライス変異体 8 4 P 2 A 9 mRNA、および 8 4 P 2 A 9 ポリヌクレオチドを含む組換え DNA 分子または R

10

20

30

40

50

NA分子が挙げられる。

【0116】

84P2A9の発現プロフィールは、84P2A9を局所的疾患および/または転移した疾患についての診断マーカーにする。特に、84P2A9の発現状態は、特定の疾患の状態、進行および/または腫瘍攻撃性に対する感受性を推定するために有用な情報を提供する。本発明は、84P2A9状態を決定し、そして84P2A9を発現する癌(例えば、前立腺癌、膀胱癌、精巣癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、結腸癌および肺癌)を診断するための方法およびアッセイを提供する。患者サンプルにおける84P2A9状態は、当該分野で周知の多数の手段(免疫組織化学的分析、インサイチュハイブリダイゼーション、レーザー捕捉マイクロ精査(micro-dessected)サンプルに対するRT-PCR分析、臨床サンプルおよび細胞株のウエスタンブロット分析、ならびに組織アレイ分析が挙げられるがこれらに限定されない)によって分析され得る。84P2A9遺伝子および遺伝子産物の状態を評価するための代表的なプロトコルは、例えば、Ausubulら編、1995、Current Protocols In Molecular Biology, Units 2[Northern Blotting], 4[Southern Blotting], 15[Immunoblotting]および18[PCR Analysis]に見出され得る。

10

【0117】

上記に記載されるように、生物学的サンプルにおける84P2A9の状態は、当該分野における多くの周知の手順によって検査され得る。例えば、身体の特定の部位から採取した生物学的サンプルにおける84P2A9の状態は、84P2A9発現細胞(例えば、84P2A9のmRNAまたはタンパク質を発現する細胞)の存在または非存在を、サンプルを評価することによって検査され得る。この検査は、例えば、84P2A9発現細胞が、通常はこのような細胞を含まない生物学的サンプル(例えば、リンパ節)において見出された場合、調節不能な細胞増殖の証拠を提供し得る。生物学的サンプルにおける84P2A9の状態のこのような変化は、しばしば調節不能な細胞増殖に関係する。詳細には、調節不能な細胞増殖の1つの指標が、起源の器官(例えば、精巣または前立腺)から身体の異なる領域(例えば、リンパ節)への癌細胞の転移である。この状況において、調節不能な細胞増殖の証拠は、重要である。なぜなら、例えば潜在的なリンパ節の転移が、前立腺癌の患者のかなりの割合において検出され得、そしてこのような転移は、疾患進行の既知の予測物と関連があるからである(例えば、Murphyら、Prostate 42(4):315~317(2000); Suら、Semin. Surg. Oncol. 18(1):17~28(2000)およびFreemanら、J Urol Aug, 154(2 Pt 1):474~8を参照のこと)。

20

30

【0118】

1つの局面において、本発明は、細胞増殖の調節不全と関連する疾患(例えば、過形成または癌)を有すると疑われる個体に由来する試験組織サンプル中の細胞によって発現される84P2A9遺伝子産物の状態を決定して、次いでそのように決定された状態を、対応する正常サンプル中の84P2A9遺伝子産物の状態に対して比較することによって84P2A9遺伝子産物をモニターする方法であって、正常サンプルと比較して試験サンプルにおける異常な84P2A9遺伝子産物の存在は、この個体の細胞において細胞増殖の調節不全の存在を指標を提供する、方法を提供する。

40

【0119】

別の局面において、本発明は、個体における癌の存在の決定に有用なアッセイを提供する。このアッセイは、対応する正常細胞または組織における発現レベルと比べて、試験細胞サンプルまたは組織サンプルにおける84P2A9 mRNAまたはタンパク質の発現における有意な増加を検出する工程を包含する。84P2A9の存在は例えば、前立腺組織、精巣組織、腎臓組織、脳組織、骨組織、皮膚組織、卵巣組織、乳組織、膵臓組織、結腸組織、リンパ組織および肺組織を含むがこれに限定されない中で評価され得る(例えば、図4~8を参照のこと)。これらの任意の組織における84P2A9の有意な発現の存在

50

は、癌の発生、存在および/または重篤度を示すために有用である。なぜなら対応する正常組織は 84P2A9 mRNA を発現しないか、またはより低いレベルで発現するからである。

#### 【0120】

関連する実施形態において、84P2A9 状態は、核酸レベルではなくタンパク質レベルで決定される。例えば、このような方法またはアッセイは、試験組織サンプル中の細胞によって発現される 84P2A9 タンパク質のレベルを決定する工程、およびそのように決定されたレベルを、対応する正常サンプルにおいて発現される 84P2A9 のレベルに対して比較する工程を包含する。1つの実施形態において、84P2A9 タンパク質の存在は、例えば、免疫組織化学方法を使用して評価される。84P2A9 タンパク質発現を検出し得る 84P2A9 抗体または結合パートナーが、この目的のために、当該分野で周知の種々のアッセイ形式において使用される。

10

#### 【0121】

他の関連する実施形態において、これらの分子の構造における摂動 (perturbation) (例えば、挿入、欠失、置換など) を同定するために、生物学的サンプル中の 84P2A9 ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の状態を評価し得る。このような実施形態は、有用である。なぜなら、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列における摂動は、増殖調節不全の表現型と関連する多くのタンパク質で観察されるからである (例えば、Marrongolaら、1999、J. Cutan. Pathol. 26(8): 369~378を参照のこと)。例えば、84P2A9 の配列における変異は、腫瘍の存在または促進の指標であり得る。従って、このようなアッセイは、84P2A9 における変異が機能の潜在的損失または腫瘍増殖の増加を閉める、診断的および予測的価値を有する。

20

#### 【0122】

ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における摂動を観察するための広範な種々のアッセイが、当該分野において周知である。例えば、84P2A9 遺伝子産物の核酸配列またはアミノ酸配列のサイズおよび構造は、本明細書中で議論されるノーザン、サザン、ウエスタン、PCR および DNA 配列決定プロトコルによって観察され得る。さらに、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における摂動を観察するための他の方法 (例えば、一本鎖高次構造多型分析) が、当該分野で周知である (例えば、米国特許第 5,382,510 号および同第 5,952,170 号を参照のこと)。

30

#### 【0123】

別の実施形態において、生物学的サンプル中における 84P2A9 遺伝子のメチル化状態を試験し得る。遺伝子の 5' 調節領域における CpG 島の異常な脱メチル化および/または過メチル化は、不死化細胞および形質転換細胞において頻繁に起こり、そして種々の遺伝子の変化した発現を生じ得る。例えば、p16-INK4a (正常前立腺において発現するが前立腺癌腫の 90% より多くで発現しないタンパク質) のプロモーターの過メチル化は、この遺伝子の転写を永続的に止めるようであり、そしてこれは前立腺癌腫におけるもっとも頻繁に検出されるゲノム変異である (De Marzoら、Am. J. Pathol. 155(6): 1985~1992(1999))。さらに、この変化は、高悪性度の前立腺上皮内新生物 (PIN) の症例の少なくとも 70% において存在する (Brooksら、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998、7: 531~536)。別の実施形態において、LAG-1 腫瘍特異的遺伝子の発現 (これは正常前立腺において発現しないが、前立腺癌の 20~25% において発現する) は、デオキシ-アザシチジンによってリンパ芽球様細胞において誘導され、これは腫瘍の発現が脱メチル化に起因することを示唆する (Lethersら、Int. J. Cancer 76(6): 903~908(1998))。この状況において、遺伝子のメチル化状態を試験するための種々のアッセイは、当該分野で周知である。例えば、サザンハイブリダイゼーションアプローチにおいて、CpG 島の全体的なメチル化状態を評価する目的で、メチル化 CpG 部位を含む配列を切断できないメチル化感受性制限酵素を利用し得る。さらに、MSP (メチル化特異的 PCR) は、所定の

40

50

遺伝子の CpG 島に存在する全ての CpG 部位のメチル化状態を容易に概略描写し得る。この手順は、亜硫酸水素ナトリウム（これは全ての非メチル化シトシンをウラシルに変更する）による DNA の最初の修飾、それに続くメチル化 DNA 対非メチル化 DNA に特異的なプライマーを使用した増幅を包含する。メチル化法を包含するプロトコールはまた、例えば *Current Protocols In Molecular Biology*、Unit 12、Frederick M. Ausubul 編、1995 において見出され得る。

#### 【0124】

遺伝子増幅は、84P2A9 (1q32.3 (種々の癌において摂動が示される領域) にマッピングされる遺伝子座、) の状態を評価するさらなる方法を提供する。遺伝子増幅は、サンプルにおいて、例えば、本明細書中に提供される配列に基づいて、適切な標識プローブを使用して、従来のサザンブロットティング、または mRNA の転写を定量するノーザンブロットティング (Thomas、1980、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、77: 5201~5205)、ドットブロットティング (DNA 分析)、またはインサイチュハイブリダイゼーションによって直接的に測定される。あるいは、特定の二重鎖 (DNA 二重鎖、RNA 二重鎖、および DNA-RNA ハイブリッド二重鎖または DNA-タンパク質二重鎖を含む) を認識する抗体が用いられる。次いで、この抗体が、標識され、そして二重鎖が表面に結合され、その結果、この表面上での二重鎖の形成により、二重鎖に結合した抗体の存在が検出され得るアッセイが、行われ得る。

#### 【0125】

上記で議論される組織に加えて、生検組織または末梢血が、84P2A9 発現を検出するために例えば、ノーザン分析、ドットプロット分析または RT-PCR 分析を使用して、癌細胞 (前立腺癌、精巣癌、腎臓癌、脳癌、骨癌、皮膚癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、結腸癌、リンパ癌および肺癌を含むがこれに限定されない) の存在について従来通りにアッセイされ得る (図 4~8 を参照のこと)。RT-PCR により増幅可能な 84P2A9 mRNA の存在は、癌の存在の指標を提供する。末梢血中の腫瘍細胞についての RT-PCR 検出アッセイは、多数のヒト固形腫瘍の診断および管理における使用について現在評価されている。前立腺癌の分野において、これらは、PSA および PSM を発現する細胞の検出のための RT-PCR アッセイを含む (Verkaikら、1997、*Urol. Res.* 25: 373~384; Ghosseinら、1995、*J. Clin. Oncol.* 13: 1195~2000; Hestonら、1995、*Clin. Chem.* 41: 1687~1688)。RT-PCR アッセイは、当該分野で周知である。

#### 【0126】

本発明の関連する局面は、個体における癌の発症の感受性の推定に関する。1つの実施形態において、癌に対する感受性を推定するための方法は、組織サンプル中の 84P2A9 mRNA または 84P2A9 タンパク質を検出する工程であって、その存在が、癌に対する感受性を示し、ここで存在する 84P2A9 mRNA 発現の程度が感受性の程度に相関する、工程を包含する。特定の実施形態において、前立腺組織または他の組織中の 84P2A9 の存在が、試験され、ここでこのサンプル中の 84P2A9 の存在は、前立腺癌の感受性 (または前立腺腫瘍の発生もしくは存在) の指標を提供する。密接に関連する実施形態において、これらの分子の構造における摂動 (例えば、挿入、欠失、置換など) を同定するために、生物学的サンプルにおける 84P2A9 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性を評価し得、ここでサンプル中の 84P2A9 遺伝子産物における 1 以上の摂動の存在が、癌の感受性 (または腫瘍の発生もしくは存在) の指標を提供する。

#### 【0127】

本発明の別の関連する局面は、腫瘍攻撃性を測定するための方法に関する。1つの実施形態において、腫瘍の攻撃性を測定するための方法は、腫瘍サンプル中の細胞によって発現される 84P2A9 mRNA または 84P2A9 タンパク質のレベルを決定する工程、そのように決定されたレベルを、同じ個体から採取された対応する正常組織または正常組織参照サンプル中に発現される 84P2A9 mRNA または 84P2A9 タンパク質の

10

20

30

40

50

レベルに対して比較する工程であって、ここで正常サンプルに対する腫瘍サンプルにおける 84P2A9 mRNA または 84P2A9 タンパク質発現の程度が、攻撃性の程度を示す、工程を包含する。特定の実施形態において、腫瘍の攻撃性は、84P2A9 が腫瘍細胞中に発現される程度を決定することによって評価され、ここでより高い発現レベルは、より攻撃性の腫瘍を示す。密接に関連する実施形態において、これらの分子の構造における挿動（例えば、挿入、欠失、置換など）を同定するために、生物学的サンプルにおける 84P2A9 ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性を評価し得、ここで1以上の挿動の存在は、より攻撃性の腫瘍を示す。

#### 【0128】

本発明のなお別の関連する局面は、個体の悪性疾患の進行を経時的に観察するための方法に関する。1つの実施形態において、個体における悪性疾患の進行を経時的に観察するための方法は、腫瘍サンプル中の細胞によって発現される 84P2A9 mRNA または 84P2A9 タンパク質のレベルを決定する工程、そのように決定されたレベルを、同じ個体から異なる時間に採取された等価な組織サンプル中に発現される 84P2A9 mRNA または 84P2A9 タンパク質のレベルに対して比較する工程であって、ここで腫瘍サンプルにおける経時的な 84P2A9 mRNA または 84P2A9 タンパク質発現の程度が、癌の進行に関する情報を提供する、工程を包含する。特定の実施形態において、癌の進行は、腫瘍細胞における 84P2A9 発現が経時的に変化する程度を決定することによって評価され、ここでより高い発現レベルは、癌の進行を示す。また、これらの分子の構造における挿動（例えば、挿入、欠失、置換など）を同定するために、生物学的サンプル中の 84P2A9 ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性を評価し得、ここで1以上の挿動の存在は、癌の進行を示す。

#### 【0129】

上記の診断アプローチは、当該分野で公知の種々多様な予後プロトコルおよび診断プロトコルのいずれか1つと組み合わせられ得る。例えば、本明細書中に開示される本発明の別の実施形態は、組織サンプルの状態を診断し、かつ予後を判定する手段として、84P2A9 遺伝子および84P2A9 遺伝子産物の発現（または84P2A9 遺伝子および84P2A9 遺伝子産物における挿動）と、悪性疾患に関連する因子との間の一致を観察するための方法に関する。この状況において、悪性疾患に関連する種々多様な因子（例えば、悪性疾患と関連する遺伝子の発現（例えば、前立腺癌などについてのPSA、PSCAおよびPSMの発現））および肉眼的細胞学的観察（例えば、Bockingら、1984、Anal Quant Cytol. 6(2): 74~88; Eptsein、1995、Hum Pathol. 26(2): 223~9; Thorsonら、1998、Mod Pathol. 11(6): 543~51; Baisdenら、1999、Am. J. Surg. Pathol. 23(8): 918~24を参照のこと）が、利用され得る。84P2A9 遺伝子および84P2A9 遺伝子産物の発現（または84P2A9 遺伝子および84P2A9 遺伝子産物における挿動）と、悪性疾患に関連するさらなる因子との間の一致を観察するための方法が有用である。なぜなら、例えば、疾患と一致する一組の特定の因子の存在は、組織サンプルの状態を診断し、かつ予後を判定するために重要な情報を提供するからである。

#### 【0130】

代表的な実施形態において、84P2A9 遺伝子および84P2A9 遺伝子産物の発現（または84P2A9 遺伝子および84P2A9 遺伝子産物における挿動）と、悪性疾患に関連する因子との間の一致を観察するための方法は、組織サンプルにおいて、84P2A9 のmRNA またはタンパク質の過剰発現を検出する工程、組織サンプルにおいてPSA のmRNA またはタンパク質の過剰発現を検出する工程、ならびに84P2A9 のmRNA またはタンパク質の過剰発現とPSA のmRNA またはタンパク質の過剰発現との一致を観察する工程を包含する。特定の実施形態において、前立腺組織における84P2A9 mRNA およびPSA mRNA の発現が、試験される。好ましい実施形態において、サンプルにおける84P2A9 mRNA 過剰発現とPSA mRNA 過剰発現との一致

10

20

30

40

50

は、前立腺癌、前立腺癌感受性、または前立腺腫瘍の発生もしくは状態の指標を提供する。

【0131】

84P2A9のmRNAまたはタンパク質の発現を検出および定量するための方法が、本明細書中に記載され、そして標準的な核酸およびタンパク質の検出技術および定量技術の使用が、当該分野において周知である。84P2A9 mRNAの検出および定量のための標準的な方法としては、標識された84P2A9リボプローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーション、84P2A9ポリヌクレオチドプローブを使用するノーザンブロットおよび関連する技術、84P2A9に特異的なプライマーを使用するRT-PCR分析、ならびに他の増幅型検出方法（例えば、分岐DNA、SISBA、TMAなど）が挙げられる。特定の実施形態において、半定量的RT-PCRが、以下の実施例に記載されるように、84P2A9 mRNA発現を検出および定量するために使用され得る。84P2A9を増幅し得る任意の数のプライマー（本明細書中に詳細に記載される種々のプライマーセットを含むがこれらに限定されない）が、この目的のために使用され得る。タンパク質の検出および定量のための標準的な方法が、この目的のために使用される。特定の実施形態において、野生型84P2A9タンパク質と特異的に反応するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が、生検組織の免疫組織化学的アッセイにおいて使用され得る。

10

【0132】

（84P2A9と相互作用する分子の同定）

20

本明細書中に開示される84P2A9タンパク質配列により、当業者は、当該分野で受け入れられた種々のプロトコルのいずれか1つを通じて、84P2A9と相互作用するタンパク質、小分子および他の因子、ならびに84P2A9によって活性化される経路を同定し得る。例えば、種々のいわゆる相互作用捕捉系（「ツーハイブリッドアッセイ」ともいわれる）のうちの1つを利用し得る。このような系において、相互作用する分子は、レポーター遺伝子の発現を指向する転写因子を再構成し、次いで、そのレポーター遺伝子の発現をアッセイする。代表的な系は、真核生物転写アクチベーターの再構成を通じて、インピボでタンパク質-タンパク質相互作用を同定し、そしてこれは例えば、米国特許第5,955,280号、同第5,925,523号、同第5,846,722号および同第6,004,746号に開示されている。

30

【0133】

あるいは、ペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって、84P2A9タンパク質配列と相互作用する分子を同定し得る。このような方法において、選択されたレセプター分子（例えば、84P2A9）に結合するペプチドが、アミノ酸の無作為収集物または制御された収集物をコードするライブラリーをスクリーニングすることによって同定される。このライブラリーによってコードされるペプチドは、バクテリオファージコートタンパク質の融合タンパク質として発現され、次いで、バクテリオファージ粒子が、目的のレセプターに対してスクリーニングされる。

【0134】

従って、種々多様な使用（例えば、治療用試薬または診断用試薬）を有するペプチドが、予期されるリガンド分子またはレセプター分子の構造に関するいかなる予備情報も必要することなく同定され得る。84P2A9タンパク質配列と相互作用する分子を同定するために使用され得る代表的なペプチドライブラリーおよびスクリーニング方法が、例えば、米国特許第5,723,286号および同第5,773,731号に開示されている。

40

【0135】

あるいは、84P2A9を発現する細胞株が、84P2A9によって媒介されるタンパク質-タンパク質相互作用を同定するために使用される。このような相互作用は、他の研究者によって示されるような免疫沈降技術（Hamilton BJら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 261: 646~51）を使用して試験され得る。代表的には、84P2A9タンパク質は、抗84P2A9抗体を使用して

50

、84P2A9を発現している前立腺癌細胞株から免疫沈降され得る。あるいは、Hisタグに対する抗体が、(上記のベクターを使用して)84P2A9を発現するように操作された細胞株において使用され得る。免疫沈降した複合体は、ウエスタンブロッティング、タンパク質の<sup>35</sup>S-メチオニン標識、タンパク質微量配列決定、銀染色および2次元ゲル電気泳動のような手順によってタンパク質の会合に対して試験され得る。

【0136】

このようなスクリーニングアッセイの関連する実施形態を介して、84P2A9と相互作用する低分子が同定され得る。例えば、リン酸化および脱リン酸化、第2メッセンジャーのシグナル伝達ならびに腫瘍形成を媒介する84P2A9の能力と干渉する分子を含む、タンパク質の機能と干渉する低分子が同定され得る。代表的な方法には、例えば、米国特許第5,928,868号に議論されており、そして少なくとも1つのリガンドが低分子であるハイブリッドリガンドを形成するための方法が挙げられる。例示的な実施形態において、このハイブリッドリガンドは、細胞中に導入され、次いでこの細胞は、第1および第2の発現ベクターを含む。各発現ベクターは、転写モジュールについてのコード配列に連結された標的タンパク質をコードするハイブリッドタンパク質を発現するためのDNAを含む。細胞は、レポーター遺伝子をさらに含み、その発現は、第1および第2のハイブリッドタンパク質の互いに対する近接性に依存し、ハイブリッドリガンドが、両方のハイブリッドタンパク質上の標的部位に結合する場合のみに、この事象が生じる。レポーター遺伝子を発現するこれらの細胞が選択され、そして未知の低分子または未知のハイブリッドタンパク質が、同定される。

10

20

【0137】

本発明の代表的な実施形態は、図1(配列番号2)に示される84P2A9アミノ酸配列と相互作用する分子についてスクリーニングする方法からなる。この方法は、分子集団と84P2A9アミノ酸配列とを接触させる工程、相互作用を促進する条件下で、分子集団と84P2A9アミノ酸配列とを相互作用させる工程、84P2A9アミノ酸配列と相互作用する分子の存在を決定する工程、次いで84P2A9アミノ酸配列と相互作用する分子から84P2A9アミノ酸配列と相互作用しない分子を分離する工程を包含する。特定の実施形態において、この方法はさらに、84P2A9アミノ酸配列と相互作用する分子を精製する工程を包含する。好ましい実施形態において、84P2A9アミノ酸配列は、ペプチドのライブラリーと接触される。

30

【0138】

(治療方法および組成物)

通常前立腺および精巣関連のタンパク質であり、そして、また、前立腺の癌(および他の癌)において発現される84P2A9の同定は、このような癌の処置に対する多くの治療アプローチを展開する。本明細書中で議論されるように、転写因子としての84P2A9の機能は、腫瘍促進遺伝子を活性化すること、または腫瘍形成をブロックする遺伝子を抑制することに関与する可能性がある。

【0139】

84P2A9の発現プロフィールは、癌-精巣(CT)抗原またはMAGE抗原を連想させ、これらは、黒色腫および他の癌にてアップレギュレートされる、精巣関連遺伝子である(Van de EyndeおよびBoon、Int J Clin Lab Res. 27:81~86、1997)。癌におけるそれらの組織特異的発現および高発現レベルに起因して、MAGE抗原は、癌ワクチンについての標的として現在調査されている(Durrant、Anticancer Drugs 8:727~733、1997; Reynoldsら、Int J Cancer 72:972~976、1997)。84P2A9の発現パターンは、84P2A9が同様に、前立腺癌に対する癌ワクチンアプローチのための理想的な標的であるという証拠を提供する。その構造的特徴は、84P2A9が転写因子であり得ることを示し、そして84P2A9が、低分子標的であることの証拠を提供する。

40

【0140】

50

従って、84P2A9タンパク質の活性を阻害することを目指す治療アプローチが、前立腺癌、精巣癌、および84P2A9を発現する他の癌に罹患する患者に有用であることが予期される。これらの治療アプローチは、一般的に、2つの種類に分類される。1つの種類は、その結合パートナーまたは他のタンパク質との、84P2A9タンパク質の結合または会合を阻害するための、種々の方法を包含する。別の種類は、84P2A9遺伝子の転写または84P2A9 mRNAの翻訳を阻害するための、種々の方法を包含する。

【0141】

(抗体に基づく治療のための標的としての84P2A9)

84P2A9の構造的特徴は、この分子が、抗体に基づく治療戦略のための魅力的な標的であることを示す。細胞外および細胞内分子の両方を標的化するための多数の典型的な抗体戦略(例えば、補体およびADCC媒介死滅ならびに本明細書中で議論される内部抗体の使用)が当該分野で公知である。84P2A9は対応する正常細胞によってではなく、種々の系統の癌細胞によって発現されるので、84P2A9免疫反応性組成物の全身投与は、非標的器官および非標的組織に対して、その免疫治療分子の結合により引き起こされる、毒性効果、非特異的効果および/または非標的効果なしで、優れた感受性を示すことが予期される。84P2A9のドメインと特異的に反応性である抗体は、毒素または治療薬剤との結合体、あるいは細胞の増殖または機能を阻害し得る裸の抗体のいずれかとして、84P2A9を発現する癌を全身的に処置するために有用であり得る。

10

【0142】

84P2A9抗体は患者に導入され得、その結果、抗体が84P2A9に結合し、そして結合パートナーとの相互作用のような機能を調節または阻害し、結果として、腫瘍細胞の増殖阻害および/または破壊を媒介しそして/または腫瘍細胞の増殖を阻害する。このような抗体が治療効果を発揮する機構は、補体媒介性細胞溶解、抗体依存性細胞の細胞傷害、84P2A9の生理学的機能を調節すること、リガンド結合またはシグナル伝達経路を阻害すること、腫瘍細胞分化を調節すること、腫瘍脈管形成因子プロフィールを変化させること、および/またはアポトーシスを誘導することを包含し得る。

20

【0143】

当業者は、抗体を使用して、図1に示される84P2A9配列の免疫原性領域のような免疫抗原分子を特異的に標的化および結合し得ることを理解する。さらに、当業者は、抗体を細胞傷害性薬剤に結合体化することが日常的であることを理解する。この状況において、細胞毒性薬剤および/または治療剤が、その細胞(例えば、84P2A9)によって発現される分子に特異的な抗体にそれらを結合体化することによって直接細胞に送達される場合、細胞傷害性薬剤は、これらの細胞に対して、その既知の生物学的効果(例えば、細胞傷害性)を発揮することを予期することが妥当であることを、当業者は理解する。

30

【0144】

広範な種々の組成物および細胞を死滅するための細胞傷害性薬剤に結合体化された抗体を使用するための方法が、当該分野で公知である。癌の状況においては、代表的な方法は、細胞表面上への結合または局在化に利用可能な発現されたマーカー(例えば、84P2A9)に結合する標的化薬剤(例えば、抗84P2A9抗体)に連結した、選択された細胞傷害性および/または治療剤を含む結合体の生物学的に有効な量を、腫瘍を有する動物に投与する工程を包含する。代表的な実施形態は、細胞傷害性および/または治療剤を84P2A9を発現する細胞に送達する方法からなり、この方法は、84P2A9エピトープに免疫特異的に結合する抗体に細胞傷害性薬剤を結合体化する工程および抗体-薬剤結合体に細胞を曝露する工程を包含する。別の特定の例示的な実施形態は、転移した癌に罹患することが疑われる個体を処置する方法からなり、この方法は、細胞傷害性薬剤および/または治療剤に結合体化した抗体の治療的有効量を含む薬学的組成物を上記患者に非経口的に投与する工程を包含する。

40

【0145】

抗84P2A9抗体を使用する癌免疫治療法は、以下を含むがこれらに限定されない、他

50

の型の癌の処置にて首尾良く使用されている種々のアプローチから得られた教示に従い得る：結腸癌 (Arlénら、1998、Crit. Rev. Immunol. 18: 133~138)、多発性骨髄腫 (Ozakiら、1997、Blood 90: 3179~3186; Tsunenariら、1997、Blood 90: 2437~2444)、胃癌 (Kasprzykら、1992、Cancer Res. 52: 2771~2776)、B細胞リンパ腫 (Funakoshiら、1996、J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19: 93~101)、白血病 (Zhongら、1996、Leuk. Res. 20: 581~589)、結腸直腸癌 (Mounら、1994、Cancer Res. 54: 6160~6166; Veldersら、1995、Cancer Res. 55: 4398~4403)、および乳癌 (Shepardら、1991、J. Clin. Immunol. 11: 117~127)。いくつかの治療アプローチは、毒素への裸の抗体の結合 (例えば、抗CD20抗体への<sup>131</sup>Iの結合 (例えば、Rituxan<sup>TM</sup>、IDEC Pharmaceuticals Corp.) を含むが、一方他のアプローチは、抗体と他の治療薬剤との (例えば、Herceptin<sup>TM</sup> (トラスツズマブ (trastuzumab) とパクリタキセル (Genentech, Inc.) との) 同時投与を含む。前立腺癌の処置のために、例えば、84P2A9抗体が、照射、化学療法またはホルモン除去と組み合わせて、投与され得る。

10

#### 【0146】

84P2A9抗体治療は癌のすべての病期について有用であり得るが、抗体治療は、進行性または転移性の癌にて特に適切であり得る。本発明の抗体療法を用いる処置は、1回以上の化学療法を受けたことのある患者に示され得、一方、化学療法レジメンまたは照射レジメンと本発明の抗体療法を組み合わせることが、化学療法処置を受けていない患者に好ましい。さらに、抗体療法は、特に、化学療法薬剤の毒性を許容しない患者にとって、非常に良好に併用する化学療法の減少した投薬量の使用を可能にし得る。

20

#### 【0147】

好ましくは、腫瘍組織の免疫組織化学的評価、定量的84P2A9画像化、または84P2A9発現の存在および程度を確実に示し得る他の技術を使用して、何人かの癌患者が84P2A9発現の存在およびレベルについて評価されることは、望ましい。腫瘍生検または外科的検体の免疫組織化学分析が、この目的について好ましい。腫瘍組織の免疫組織化学的分析のための方法が、当該分野で周知である。

30

#### 【0148】

前立腺癌および他の癌を処置する際に有用な抗84P2A9モノクローナル抗体としては、その腫瘍に対する強力な免疫応答を開始し得る抗体、または直接細胞傷害性である抗体が挙げられる。これに関して、抗84P2A9モノクローナル抗体 (mAb) は、補体媒介性細胞傷害または抗体依存性細胞傷害 (ADCC) のいずれかの機構によって、腫瘍細胞溶解を惹起し得、これらの機構の両方が、エフェクター細胞Fcレセプター部位または補体タンパク質との相互作用のために、その免疫グロブリン分子のインタクトなFc部分を必要とする。さらに、腫瘍増殖に対する直接の生物学的効果を発揮する抗84P2A9 mAbが、本発明の実施にて有用である。このような直接的な細胞傷害性のmAbが作用し得る可能な機構としては、細胞増殖の阻害、細胞分化の調節、腫瘍脈管形成因子プロファイルの調節、およびアポトーシスの誘導が、挙げられる。特定の抗84P2A9 mAbが抗腫瘍効果を発揮する機構は、当該分野で一般的に知られているように、ADCC、ASMC、補体媒介性細胞溶解、その他のような細胞死を決定するように設計された多くのインビトロアッセイを使用して、評価される。

40

#### 【0149】

マウスまたは他の非ヒトモノクローナル抗体の使用、あるいはヒト/マウスキメラmAbの使用が、何人かの患者で、中程度の免疫応答から強力な免疫応答を誘導し得る。いくつかの場合において、これは、循環からの抗体のクリアランスおよび減少した効力をもたらす。最も重症な場合において、このような免疫応答は、潜在的に腎不全を引き起こし得る

50

、免疫複合体の大規模な形成をもたらす得る。従って、本発明の治療法の実施にて使用される好ましいモノクローナル抗体は、高い親和性で標的 8 4 P 2 A 9 抗原に特異的に結合するが、患者において低い抗原性を示すかまたは全く抗原性を示さない、完全にヒトであるかまたはヒト化されているかのいずれかである抗体である。

#### 【 0 1 5 0 】

本発明の治療法は、単一の抗 8 4 P 2 A 9 m A b の投与、ならびに異なる m A b の組み合わせまたはカクテルの投与を意図する。このような m A b カクテルは、それらが、異なるエピトープを標的とする m A b を含むか、異なるエフェクター機構を利用するか、または免疫エフェクター機能性に依存する m A b と直接細胞傷害性 m A b を組み合わせると同じ程度に、特定の利点を有し得る。組み合わせたこのような m A b は、相乗的治療効果を示し得る。さらに、抗 8 4 P 2 A 9 m A b の投与は、種々の化学療法薬剤、アンドロゲン遮断薬、および免疫モジュレーター（例えば、I L - 2、G M - C S F）を含むがこれらに限定されない、他の治療薬剤と組み合わせ得る。抗 8 4 P 2 A 9 m A b は、それらの「裸」の形態または非結合体化形態で投与されるか、またはそれらに結合体化した治療薬剤を有し得る。

10

#### 【 0 1 5 1 】

抗 8 4 P 2 A 9 抗体処方物は、腫瘍部位にその抗体を送達し得る任意の経路を介して投与される。投与の潜在的に有効な経路としては、静脈内経路、腹腔内経路、筋肉内経路、腫瘍内経路、皮内経路などが挙げられるが、これらに限定されない。処置は一般的に、受容可能な投与経路（例えば、静脈注射（I V））を介する、代表的には約 0 . 1 ~ 約 1 0 m g / k g 体重の範囲の用量での、抗 8 4 P 2 A 9 抗体調製物の反復投与を包含する。1 0 ~ 5 0 0 m g m A b / 週の範囲の用量が、効果的であり得かつ十分に許容され得る。

20

#### 【 0 1 5 2 】

転移性乳癌の処置において H e r c e p t i n m A b を用いる臨床実験に基づいて、抗 8 4 P 2 A 9 m A b 調製物の初回負荷用量約 4 m g / k g 患者体重の I V に引き続く、毎週の用量約 2 m g / k g の I V が、受容可能な投薬レジメンを示し得る。好ましくは、この初回負荷量が、9 0 分以上の注入として投与される。周期的維持用量は、3 0 分以上の注入として投与されるが、ただし、その初回量が十分に許容される場合に限る。しかし、当業者が理解するように、種々の因子が、特定の場における理想的な用量レジメンに影響する。このような因子としては、例えば、使用される A b または m A b の結合親和性および半減期、患者における 8 4 P 2 A 9 発現の程度、循環する放出された（s h e d）8 4 P 2 A 9 抗原の程度、所望される安定状態の抗体濃度レベル、処置の頻度、および本発明の処置方法と組み合わせ使用される化学療法薬剤の影響ならびに特定の患者の健康状態が、挙げられ得る。

30

#### 【 0 1 5 3 】

必要に応じて、患者は、最も有効な投薬レジメンおよび関連因子の決定を補助するために、所定のサンプル中の 8 4 P 2 A 9 のレベル（例えば、循環する 8 4 P 2 A 9 および / または 8 4 P 2 A 9 発現細胞のレベル）について評価されるべきである。このような評価はまた、治療を通じモニターする目的のために使用され、そして他のパラメーター（例えば、前立腺癌治療における血清 P S A レベル）を評価することと組み合わせ、治療の成功を判断するために有用である。

40

#### 【 0 1 5 4 】

（ 8 4 P 2 A 9 タンパク質機能の阻害）

第 1 の種類の治療アプローチ内で、本発明は、その結合パートナーへの 8 4 P 2 A 9 の結合または他のタンパク質との 8 4 P 2 A 9 の結合を阻害するための、種々の方法および組成物、ならびに 8 4 P 2 A 9 機能を阻害するための方法を包含する。

#### 【 0 1 5 5 】

（細胞内抗体を用いる 8 4 P 2 A 9 の阻害）

1 つのアプローチにおいて、8 4 P 2 A 9 に特異的に結合する単鎖抗体をコードする組換えベクターが、8 4 P 2 A 9 を発現する細胞中へと遺伝子移入技術を介して導入され得、

50

その遺伝子移入技術において、そのコードされる単鎖抗 8 4 P 2 A 9 抗体が細胞内発現され、8 4 P 2 A 9 タンパク質に結合し、そしてそれにより 8 4 P 2 A 9 タンパク質の機能を阻害する。このような細胞内単鎖抗体を操作するための方法は周知である。このような細胞内抗体（「内部抗体 ( i n t r a b o d y ) 」としても公知)は、その細胞内の特定の区画に特異的に標的化され得、その処置の阻害活性が焦点となる制御を提供する。この技術は、当該分野で首尾良く適用されている（概説として、Richardsonおよび Marasco、1995、T I B T E C H、第 13 巻を参照のこと）。内部抗体は、別の豊富な細胞表面レセプターの発現を事実上除去することが示されている。例えば、Richardsonら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 3137 ~ 3141 ; Beerliら、1994、J. Biol. Chem. 289 : 23931 ~ 23936 ; Deshaneら、1994、Gene Ther. 1 : 332 ~ 337 を参照のこと。

10

## 【 0 1 5 6 】

単鎖抗体は、可撓性のリンカーポリペプチドにより結合された、重鎖および軽鎖の可変ドメインを含み、そして単一のポリペプチドとして発現される。必要に応じて、単鎖抗体は、その軽鎖定常領域に結合された単鎖可変領域フラグメントとして発現される。周知の細胞内輸送シグナルが、発現される内部抗体を所望の細胞内区画に対して正確に標的化するために、このような単鎖抗体をコードする組換えポリヌクレオチドベクター中に操作され得る。例えば、小胞体 ( E R ) に標的化された内部抗体は、リーダーペプチドを組み込むように、そして必要に応じて C 末端 E R 保持シグナル (例えば、K D E L アミノ酸モチーフ) を組み込むように、操作され得る。核において活性を発揮することが意図される内部抗体は、核局在化シグナルを含むように操作され得る。脂質部分が、原形質膜の細胞質ゾル側に内部抗体をつなぐために、その内部抗体に結合される。内部抗体はまた、細胞質ゾルにおいて機能を発揮するように標的化される。例えば、細胞質内部抗体を使用して、細胞質ゾル内に因子を隔離し得、それによりそれらの因子がその天然での細胞での終着点に輸送されることを防ぎ得る。

20

## 【 0 1 5 7 】

1 つの実施形態において、内部抗体を使用して、核中で 8 4 P 2 A 9 を捕捉し、それにより核内でその活性を阻害する。核標的化シグナルは、所望の標的化を達成するために、8 4 P 2 A 9 のような内部抗体に操作される。このような 8 4 P 2 A 9 内部抗体は、特定の 8 4 P 2 A 9 ドメインを特異的に結合するように設計される。別の実施形態において、8 4 P 2 A 9 タンパク質に特異的に結合する細胞質ゾル内部抗体を使用して、8 4 P 2 A 9 が核へのアクセスを得ることを妨げ、それにより、核内での任意の生物学的活性を発揮することを妨げる (例えば、8 4 P 2 A 9 が他の因子と転写複合体を形成するのを妨げる)。

30

## 【 0 1 5 8 】

このような内部抗体の発現を特定の腫瘍細胞に特異的に指向するために、その内部抗体の転写は、適切な腫瘍特異的プロモーターおよび / またはエンハンサーの調節制御下に配置される。内部抗体発現を前立腺に特異的に標的化するために、例えば、P S A プロモーターおよび / またはプロモーター / エンハンサーが、利用され得る (例えば、米国特許第 5 , 9 1 9 , 6 5 2 号を参照のこと)。

40

## 【 0 1 5 9 】

(組換えタンパク質を用いる 8 4 P 2 A 9 の阻害)  
別のアプローチにおいて、8 4 P 2 A 9 に結合し、それにより 8 4 P 2 A 9 がその結合パートナーに接近 / 結合することまたは他のタンパク質と結合することを妨げる、組換え分子が、8 4 P 2 A 9 機能を阻害するために使用される。このような組換え分子は、例えば、8 4 P 2 A 9 特異的抗体分子の反応性部分を含み得る。特定の実施形態において、8 4 P 2 A 9 結合パートナーの 8 4 P 2 A 9 結合ドメインが、ヒト I g G (例えば、ヒト I g G 1) の F c 部分に連結された 2 つの 8 4 P 2 A 9 リガンド結合ドメインを含む、二量体融合タンパク質へと操作される。このような I g G 部分は、例えば、G<sub>H</sub> 2 ドメインおよ

50

びG<sub>H</sub> 3ドメインならびにヒンジ領域を含み得るが、G<sub>H</sub> 1ドメインは含み得ない。このような二量体融合タンパク質は、可溶性形態で、84P2A9の発現と関係する癌（前立腺癌および精巣癌を含むがこれらに限定されない）に罹患する患者に投与され得、ここでこの二量体融合タンパク質は84P2A9に特異的に結合し、それにより84P2A9の結合パートナーとの相互作用をブロックする。このような二量体融合タンパク質は、公知の抗体連結技術を使用してさらに組み合わされて、多量体タンパク質に合わされる。

【0160】

（84P2A9の転写または翻訳の阻害）

第2の種類の治療アプローチにおいて、本発明は、84P2A9遺伝子の転写を阻害するための、種々の方法および組成物を提供する。同様に、本発明はまた、84P2A9 mRNAからタンパク質への翻訳を阻害するための、方法および組成物も提供する。

【0161】

1つのアプローチにおいて、84P2A9遺伝子の転写を阻害する方法は、84P2A9遺伝子を84P2A9アンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程を包含する。別のアプローチにおいて、84P2A9 mRNAの翻訳を阻害する方法は、84P2A9 mRNAをアンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程を包含する。別のアプローチにおいて、84P2A9特異的リボザイムが、84P2A9メッセージを切断するために使用され、それにより翻訳を阻害する。このようなアンチセンスに基づく方法およびリボザイムに基づく方法はまた、84P2A9遺伝子の調節領域（例えば、84P2A9プロモーターエレメントおよび/またはエンハンサーエレメント）に関し得る。同様に、84P2A9遺伝子転写因子を阻害し得るタンパク質が、84P2A9 mRNA転写を阻害するために使用され得る。上述の方法において有用な種々のポリヌクレオチドおよび組成物が、上記されている。転写および翻訳を阻害するためのアンチセンス分子およびリボザイム分子の使用は、当該分野で周知である。

【0162】

84P2A9転写活性化を妨害することを介して84P2A9の転写を阻害する他の因子もまた、84P2A9を発現する癌の処置に有用であり得る。同様に、84P2A9のプロセッシングと干渉し得る因子は、84P2A9を発現する癌の処置に有用である。このような因子を利用する癌の処置方法もまた、本発明の範囲内にある。

【0163】

（治療ストラテジーについての一般的な考慮）

遺伝子移入および遺伝子治療の技術は、84P2A9を合成している腫瘍細胞に、治療用ポリヌクレオチド分子（すなわち、アンチセンス、リボザイム、内部抗体をコードするポリヌクレオチドおよび他の84P2A9阻害分子）を送達するために使用され得る。多数の遺伝子治療アプローチが、当該分野で公知である。84P2A9アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、84P2A9転写と干渉し得る因子などをコードする組換えベクターは、このような遺伝子治療アプローチを使用して標的腫瘍細胞に送達され得る。

【0164】

上記の治療アプローチは、広範な種々の外科的化学療法または放射線療法のレジメンのいずれか1つと組み合わせられ得る。これらの治療アプローチは、全ての患者、特に、化学療法剤の毒性に十分に耐性ではない患者についての利点である、化学療法の投薬量の減少、および/またはより低頻度の投与の使用を可能にし得る。

【0165】

特定の組成物（例えば、アンチセンス、リボザイム、内部抗体）、またはこのような組成物の組合せの抗腫瘍活性は、種々のインビトロおよびインビボアッセイ系を使用して評価され得る。治療の可能性を評価するためのインビトロアッセイとしては、細胞増殖アッセイ、軟寒天アッセイおよび腫瘍促進活性を示す他のアッセイ、治療用組成物が結合パートナーへの84P2A9の結合を阻害する程度を決定し得る結合アッセイなどが挙げられる。

【0166】

10

20

30

40

50

インビボでは、84P2A9治療用組成物の効果は、適切な動物モデルにおいて評価され得る。例えば、異種間前立腺癌モデル（ここで、ヒト前立腺癌の外植片または継代された異種移植組織が、免疫無防備動物（例えば、ヌードマウスまたはSCIDマウス）に導入される）は、前立腺癌に関して適切であり、そして記載されている（Kleinら、1997, *Nature Medicine* 3:402~408）。例えば、PCT特許出願WO98/16628, Sawyersら（1998年4月23日公開）は、原発性腫瘍の発生、微小転移、および後期段階の疾患の骨芽細胞性転移の形成特性を再現し得るヒト前立腺癌の種々の異種移植モデルを記載する。効力は、腫瘍形成、腫瘍後退または転移などの阻害を測定するアッセイを使用して推定され得る。以下の実施例もまた参照のこと。

10

## 【0167】

アポトーシスの促進を評価するインビボアッセイが、治療用組成物の評価において有用である。1つの実施形態において、治療用組成物で処置された腫瘍保有マウス由来の異種移植片は、アポトーシス病巣の存在について試験され得、そして未処置のコントロール異種移植片保有マウスと比較され得る。アポトーシス病巣が処置マウスの腫瘍に見出される程度は、この組成物の治療効力の指標を提供する。

## 【0168】

前述の方法の実施において使用される治療用組成物は、所望の送達方法に適切なキャリアを含む薬学的組成物に処方され得る。適切なキャリアとしては、治療用組成物と組み合わせられる場合に、治療用組成物の抗腫瘍機能を保持し、かつ患者の免疫系と一般に非反応性である、任意の物質が挙げられる。例としては、任意の多数の標準的な薬学的キャリア（例えば、滅菌リン酸緩衝化生理食塩水溶液、静菌水など）が挙げられるがこれらに限定されない（一般には、Remington's Pharmaceutical Sciences（第16版）、A. Osal. 編、1980を参照のこと）。

20

## 【0169】

治療用処方物は、可溶化され得、そして腫瘍部位に治療用組成物を送達し得る任意の経路を通じて投与され得る。潜在的に効果的な投与経路としては、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内、器官内、眼内などが挙げられるがこれらに限定されない。静脈内注射に好ましい処方物は、保存静菌水、滅菌非保存水の治療用組成物溶液を含み、そして/または注射用0.9%滅菌塩化ナトリウム（USP）を含むポリビニルクロリドまたはポリエチレンバッグに希釈される。治療用タンパク質調製物は、凍結乾燥され得、そして滅菌粉末として、好ましくは減圧下で貯蔵され得、次いで注射する前に、例えば、ベンジルアルコール保存剤を含む静菌水中に、または滅菌水中に再溶解され得る。

30

## 【0170】

前述の方法を使用する癌の処置についての投薬量および投与プロトコルは、方法および標的の癌とともに変化し、そして一般に、当該分野で理解される多数の他の因子に依存する。

## 【0171】

（癌ワクチン）

上記のように、84P2A9の発現プロフィールにより、84P2A9が、進行した前立腺癌および転移した前立腺癌で高度に発現されることが示される。この発現パターンは、癌-精巣（Cancer-Testis）（CT）抗原またはMAGE抗原（黒色腫および他の癌において上方制御される、精巣特異的遺伝子である）を連想させる（Van den EyndeおよびBoon, *Int J Clin Lab Res.* 27:81~86, 1997）。84P2A9の組織特異的発現および癌での高い発現レベルに起因して、MAGE抗原は、現在癌ワクチンの標的として検討されている（Durrant, *Anticancer Drugs* 8:727~733, 1997; Reynoldsら, *Int J Cancer* 72:972~976, 1997）。

40

## 【0172】

本発明はさらに、84P2A9関連タンパク質またはそのフラグメントを含む癌ワクチン

50

、およびDNAベースのワクチンを提供する。84P2A9の発現を考慮すると、癌ワクチンは、非標的組織に対して非特異的効果を生じることなく、84P2A9を発現している癌の特異的な予防および/または処置に効果的である。抗癌療法での使用について、液性免疫および細胞媒介性免疫を生成するワクチンにおける腫瘍抗原の使用は、当該分野で周知であり、そしてヒトPSMAおよびげっ歯類PAP免疫原を使用して、前立腺癌に使用されている(Hodgerson, 1995, Int. J. Cancer 63:231~237; Fongら, 1997, J. Immunol. 159:3113~3117)。

#### 【0173】

このような方法は、84P2A9タンパク質もしくはそのフラグメント、または84P2A9をコードする核酸分子、および84P2A9免疫原(これは、代表的に多数の体液性またはT細胞エピトープ免疫反応性エピトープを含む)を発現し、かつ適切に提示し得る組換えベクターを用いることによって容易に実施され得る。この文脈において、当業者は、免疫反応性エピトープの送達のための広範な種々の異なるワクチンシステムが公知であることを理解する(例えば、Herylinら, Ann Med 1999 Feb; 31(1)66~78; Maruyamaら, Cancer Immunol Immunother 2000 Jun; 49(3):123~32)。要するに、このような技術は、哺乳動物において免疫応答(例えば、体液および/または細胞媒介性応答)を生じる方法から構成され、哺乳動物の免疫系を免疫反応性エピトープ(例えば、配列番号2に示される84P2A9タンパク質のエピトープ)に曝露する工程を包含する。これにより、哺乳動物は、そのエピトープに特異的な免疫応答を生じる(例えば、そのエピトープを特異的に認識する抗体を生成する)。好ましい方法において、84P2A9免疫原は、生物学的モチーフを含む。非常に好ましい実施形態では、84P2A9免疫原は、当該分野で周知の適切な分析技術の1つを用いて同定された1つ以上のアミノ酸配列(例えば、表1に示される配列)を含む。

#### 【0174】

哺乳動物において免疫応答を生成するための広範な種々の方法が、当該分野で周知である(例えば、ハイブリドーマの生成における第一工程として)。哺乳動物において免疫応答を生成する方法は、哺乳動物の免疫系をタンパク質上の外因性免疫原性エピトープ(例えば、配列番号2の84P2A9タンパク質)に曝露し、それによって免疫応答を生じる工程を包含する。代表的な実施形態は、宿主を十分な量の84P2A9またはB細胞もしくは細胞傷害性T細胞が惹起したエピトープまたはそのアナログと接触させて;そしてその後少なくとも一定の間隔でこの宿主をさらなる84P2A9またはB細胞もしくは細胞傷害性T細胞が惹起したエピトープまたはそのアナログと接触させることによって、宿主における84P2A9に対する免疫応答を生成する方法からなる。特定の実施形態は、84P2A9タンパク質またはマルチエピトープペプチドに対する免疫応答を生じる方法からなる。この方法は、ワクチン調製物中の84P2A9免疫原(例えば、84P2A9タンパク質またはそのペプチドフラグメント、84P2A9融合タンパク質など)をヒトまたは動物に投与する工程を包含する。代表的には、このようなワクチン調製物は、さらに適切なアジュバントを含む。(例えば、米国特許第6,146,635号を参照のこと)。これらの方法における代表的な改変は、84P2A9免疫原に対して、個体中で免疫応答を生成する方法からなる。この方法は、インビボで個体の体の筋肉または皮膚に対して、以下からなる群より選択されるような遺伝子ワクチン促進因子(facilitator)を投与する工程を包含する:陰イオン性脂質;サポニン;レクチン;エストロゲン化合物;ヒドロキシル化低級アルキル;ジメチルスルホキシド;および尿素;ならびにDNA分子(感染性因子から解離し、そして84P2A9免疫原をコードするDNA配列を含む)。このDNA配列は、このDNAの発現を制御する調節配列に作動可能に連結されており;ここでこのDNA分子は、細胞に取り込まれ、このDNA配列は、細胞中で発現され、そして免疫応答がこの免疫原に対して生成される。(例えば、米国特許第5,962,428号を参照のこと)。

#### 【0175】

免疫応答を生成するための特定のの方法の例示的な例において、ウイルス遺伝子送達系が、84P2A9をコードする核酸分子を送達するために用いられ得る。本発明のこの局面の実施において使用され得る種々のウイルス遺伝子送達系は、以下を包含するが、これらに限定されない：ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、およびシンドビスウイルス (Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663)。非ウイルス送達系もまた使用され、84P2A9タンパク質またはそのフラグメントをコードする裸のDNAを用いて、抗腫瘍応答を誘導するために患者に導入され得る (例えば筋内または皮内に)。1つの実施形態において、全長ヒト84P2A9 cDNAを用いる。別の実施形態では、特定の細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) エピトープをコードする84P2A9核酸分子が用いられ得る。CTLエピトープは、特定化されたHLA対立遺伝子に最適に結合し得る、84P2A9タンパク質内のペプチドを同定するための特定のアルゴリズム (例えば、Epimer, Brown University) を用いて決定され得る。

#### 【0176】

種々のエキソピボストラテジーが、用いられ得る。1つのアプローチは、患者の免疫系に84P2A9抗原を呈示するための樹状細胞の使用を包含する。樹状細胞は、MHCクラスIおよびII分子、B7共同刺激因子 (co-stimulator)、およびIL-12を発現し、そして従って、高度に分化された (specialized) 抗原提示細胞である。前立腺癌では、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) のペプチドでパルスされた自己樹状細胞が、第I相臨床試験において、前立腺癌患者の免疫系を刺激するために使用されつつある (Tjoaら、1996, Prostate 28: 65-69; Murphyら、1996, Prostate 29: 371-380)。従って、樹状細胞は、MHCクラスIおよびII分子の場合において、T細胞に対して84P2A9ペプチドを提示するために使用され得る。1つの実施形態では、自己樹状細胞は、MHCクラスIおよび/またはクラスII分子に結合し得る84P2A9ペプチドでパルスされる。別の実施形態では、樹状細胞は、完全84P2A9タンパク質でパルスされる。なお別の実施形態は、当該分野で公知の種々の実行ベクター (例えば、アデノウイルス (Arthurら、1997, Cancer Gene Ther. 4: 17-25)、レトロウイルス (Hendersonら、1996, Cancer Res. 56: 3763-3770)、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、DNAトランスフェクション (Ribasら、1997, Cancer Res. 57: 2865-2869)、および腫瘍由来RNAトランスフェクション (Ashleyら、1997, J. Exp. Med. 186: 1177-1182)) を用いて樹状細胞における84P2A9遺伝子の過剰発現を操作することを包含する。84P2A9を発現する細胞は、免疫調節因子 (例えば、GM-CSF) を発現するように操作され得、そして免疫剤として使用され得る。

#### 【0177】

抗イディオタイプ抗84P2A9抗体もまた、抗癌療法において、84P2A9タンパク質を発現する細胞に対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして使用され得る。詳細には、抗イディオタイプ抗体の生成は、当該分野で周知であり、そして84P2A9タンパク質上のエピトープを模倣する抗イディオタイプ抗84P2A9抗体を生成するように容易に適合され得る (例えば、Wagnerら、1997, Hybridoma 16: 33-40; Foonら、1995, J Clin Invest 96: 334-342; Herlynら、1996, Cancer Immunol Immunother 43: 65-76を参照のこと)。このような抗イディオタイプ抗体は、癌ワクチンストラテジーにおいて使用され得る。

#### 【0178】

遺伝子免疫法は、84P2A9を発現する癌細胞に対する予防的または治療的な体液性免疫応答および細胞性免疫応答を生成するために使用され得る。84P2A9関連タンパク質/免疫原をコードするDNAおよび適切な調節配列を含む構築物は、個体の筋肉または

10

20

30

40

50

皮膚に直接的に注射され得、それにより、筋肉または皮膚の細胞が、この構築物を取り込み、そしてコードされた84P2A9タンパク質/免疫原を発現する。あるいは、ワクチンは84P2A9関連タンパク質を含む。84P2A9タンパク質免疫原の発現は、骨癌、結腸癌、膵臓癌、精巣癌、子宮頸癌および卵巣癌に対する予防的または治療的な体液性免疫および細胞性免疫の生成を生じる。当該分野で公知の種々の予防的および治療的遺伝子免疫技術が使用され得る（概説については、インターネットアドレスwww.genweb.comで公開されている情報および参考文献を参照のこと）。

【0179】

（キット）

上記で記載された診断適用および治療適用において使用するために、本発明によって、キットもまた提供される。このようなキットは、1つ以上のコンテナ（容器）（例えば、バイアル、チューブなど）を厳重に閉じ込めて受容するように区画化されるキャリアを備え得る。コンテナ手段のそれぞれは、本方法において、使用されるべき別々の要素の1つを含む。例えば、コンテナは、検出可能に標識された、または検出可能に標識され得るプローブを含み得る。このようなプローブは、それぞれ84P2A9関連タンパク質または84P2A9遺伝子またはメッセージに特異的な抗体またはポリヌクレオチドであり得る。キットが、標的核酸配列を検出するために核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合、キットはまた、標的核酸配列の増幅用のヌクレオチドを含むコンテナ、および/またはレポーター分子（例えば、酵素標識、蛍光標識、または放射性同位体標識）に結合されるレポーター手段（例えば、ビオチン結合タンパク質（例えば、アビジンまたはストレプトアビジン）を含むコンテナを有し得る。

【0180】

本発明のキットは、代表的には、上記コンテナ、および使用説明書と共に、市販および使用者の観点で所望の物質（緩衝液、希釈剤、フィルター、ニードル、シリンジ、およびパッケージ挿入物を含む）を含む1つ以上の他のコンテナを含む。表示は、組成物が、特定の治療または非治療適用について使用されることを示し、そしてまたインビボまたはインビトロのいずれかの使用（例えば、上記の使用）についての説明を示し得るために、コンテナ上に存在し得る。

【0181】

p84P2A9-1は、ブダペスト条約の要件の下でアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC; 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 USA)に、2000年1月6日に寄託され、そしてATCC受託番号PTA-1151が確定されている。

【0182】

（実施例）

本発明の種々の局面を、以下に続くいくつかの実施例によってさらに記載および例示する。これらはいずれも、本発明の範囲の制限を意図するものではない。

【0183】

（実施例1：84P2A9遺伝子のcDNAフラグメントのSSH生成単離）

（材料および方法）

（LAPC異種移植片およびヒト組織）

LAPC異種移植片を、Cheales Sawyers博士(UCLA)から入手し、記載のように生成した(Kleinら、1997、Nature Med. 3: 402-408)。アンドロゲン依存性LAPC-4異種移植片およびアンドロゲン非依存性LAPC-4異種移植片（それぞれLAPC-4 ADおよびAI）ならびにLAPC-9 ADおよびAI異種移植片を雄性SCIDマウスにおいて増殖させ、そしてレシピエント雄に小組織塊として継代させた。LAPC-4 AIおよびLAPC-9 AI異種移植片は、LAPC-4 AD腫瘍またはLACD-9腫瘍からそれぞれ誘導した。AD腫瘍を有する雄性マウスを去勢し、そして2~3ヶ月間飼育した。腫瘍が再増殖した後、この腫瘍を採集し、そして去勢雄SCIDマウスにおいてまたは雌性SCIDマウスにおいて

10

20

30

40

50

継代させた。RNAおよびタンパク質の分析のためのヒト組織をUCLA (Los Angeles, CA)のヒト組織リソースセンター(Human Tissue Resource Center)(HTRC)およびQualTek, Inc. (Santa Barbara, CA)から得た。良性の前立腺過形成組織サンプルは患者由来であった。

【0184】

(細胞株)

ヒト細胞株(例えば、HeLa)を、ATCCから入手し、そして5%ウシ胎児血清を有するDMEM中で維持した。

【0185】

(RNA単離)

腫瘍組織および細胞株を、10ml/g組織または10ml/10<sup>8</sup>細胞を用いてTrizol試薬(Life Technologies, Gibco BRL)においてホモジナイズし、総RNAを単離した。ポリA RNAを、QiagenのOligotex mRNA MiniキットおよびMidikitを用いて総RNAから精製した。総RNAおよびmRNAを、分光光度計分析(O.D. 260/280nm)によって定量し、そしてゲル電気泳動によって分析した。

【0186】

(オリゴヌクレオチド)

以下のHPLC精製オリゴヌクレオチドを使用した。

【0187】

DPNCDN(cDNA合成プライマー)：

5' TTTT GATCAAGCTT<sub>3</sub> 0 3' (配列番号7) (ここで、GATCは太文字表記)

アダプター1：

5' CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGG  
GCAG3' (配列番号8)

3' GGCCCGTCTCTAG5' (配列番号9) (ここで、CTAGは太文字表記)

アダプター2：

5' GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCG  
AG3' (配列番号10)

3' CGGCTCTCTAG5' (ここで、CTAGは太文字表記) (配列番号11)

PCRプライマー1：

5' CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (配列番号12)

ネスト化プライマー(NP)1：

5' TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGA3' (配列番号13) (ここで3'末端のGAは太文字表記)

ネスト化プライマー(NP)2：

5' AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3' (配列番号14) (ここで、3'末端のGAは太文字表記)。

【0188】

(抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション)

抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション(SSH)を使用して、前立腺癌で示差的に発現され得る遺伝子に対応するcDNAを同定した。SSH反応は2つのLAPC-4 AD異種移植片からのcDNAを利用した。詳細には、84P2A9 SSH配列を差引き(subtraction)から同定した。ここで、LAPC-4 AD腫瘍(去勢後3日)由来のcDNAを、インタクテナ雄で増殖したLAPC-4 AD腫瘍由来のcDNAから差引き(サブトラクト)した。インタクテナ雄において増殖したLAPC-4 AD異種移植片腫瘍を「テスター」cDNAの供給源として使用し、一方、LAPC-4 AD腫瘍(去勢後3日)由来のcDNAを、「ドライバー」cDNAの供給源とし

10

20

30

40

50

て使用した。

【0189】

テスター cDNA およびドライバー cDNA に対応する二本鎖 cDNA を、CLONTECH の PCR - Select cDNA Subtraction Kit、およびプライマーとして 1 ng のオリゴヌクレオチド DPNC DN を使用して、上記のように、関連の異種移植片組織から単離された 2 µg のポリ(A)<sup>+</sup> RNA から合成した。第一鎖および第二鎖合成を、キットの使用者マニュアルプロトコル (CLONTECH Protocol No. PT1117-1、Catalog No. K1804-1) に記載のように実施した。得られた cDNA を Dpn I I で 37 °C で 3 時間消化した。消化した cDNA をフェノール/クロロホルム (1:1) で抽出し、そしてエタノール沈殿した。

10

【0190】

ドライバー cDNA を、1:1 比で、関連の異種移植片供給源からの Dpn I I 消化 cDNA (上述を参照のこと) と、ヒト良性前立腺肥大 (BPH)、ヒト細胞株 HeLa、293、A431、Colo205、およびマウス肝臓由来の消化 cDNA の混合物とを組み合わせることにより生成した。

【0191】

テスター cDNA を、5 µl の水中に関連の異種移植片供給源 (上記を参照のこと) からの 1 µl の Dpn I I 消化 cDNA (400 ng) を希釈することにより生成した。次いで、希釈した cDNA (2 µl、160 ng) を、総容量 10 µl で 16 °C で一晩、400 u の T4 DNA リガーゼ (CLONTECH) を用いて、別の連結反応中で、2 µl のアダプター 1 およびアダプター 2 (10 µM) に連結した。連結を、1 µl の 0.2 M EDTA で、そして 72 °C で 5 分間加熱して終結させた。

20

【0192】

第一のハイブリダイゼーションは、1.5 µl (600 ng) のドライバー cDNA を、1.5 µl (20 ng) のアダプター 1 連結のおよびアダプター 2 連結のテスター cDNA を含む 2 つの各チューブに添加することにより実施した。4 µl の最終容量で、サンプルに鉱油を重層し、MJ Research サーマルサイクラー中で、98 °C で 1.5 分間変性し、次いで、68 °C で 8 時間ハイブリダイズさせた。次いで、2 つのハイブリダイゼーションを、さらなる 1 µl の新鮮な変性ドライバー cDNA と一緒に混合し、そして 68 °C で一晩ハイブリダイズさせた。次いで、第二のハイブリダイゼーションを、200 µl の 20 mM HEPES、pH 8.3、50 mM NaCl、0.2 mM EDTA 中で希釈し、70 °C で 7 分間加熱し、そして -20 °C で貯蔵した。

30

【0193】

(SSH から生成した遺伝子フラグメントの PCR 増幅、クローニング、および配列決定)

SSH 反応から生じる遺伝子フラグメントを増幅するために、2 つの PCR 増幅を行った。第一の PCR 反応において、1 µl の希釈最終ハイブリダイゼーション混合物を、最終容量 25 µl の 1 µl の PCR プライマー 1 (10 µM)、0.5 µl dNTP 混合物 (10 µM)、2.5 µl の 10 × 反応緩衝液 (CLONTECH)、および 0.5 µl の 50 × Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH) に添加した。PCR 1 を、以下の条件を用いて実施した: 75 °C で 5 分、94 °C で 25 秒、次いで 27 サイクルの以下: 94 °C で 10 秒、66 °C で 30 秒、72 °C で 1.5 分。5 つの別の第一の PCR 反応を各実験について行った。産物をプールし、そして水で 1:10 に希釈した。第二の PCR 反応については、プールし、そして希釈した第一の PCR 反応物からの 1 µl を、プライマー NP1 および NP2 (10 µM) を PCR プライマー 1 の代わりに使用したことを除き、PCR 1 について用いたものと同じ反応混合物に添加した。PCR 2 を、10 ~ 12 サイクルの以下: 94 °C で 10 秒、68 °C で 30 秒、72 °C で 1.5 分を用いて実施した。PCR 産物を、2% アガロースゲル電気泳動を用いて分析した。

40

【0194】

50

PCR産物を、T/Aベクタークロニングキット (Invitrogen) を用いて PCR 2.1 に挿入した。形質転換 E. coli を青/白選択およびアンピシリン選択に供した。白色コロニーを釣り上げ、96ウェルプレート中に並べ、そして液体培養中で一晚増殖させた。挿入物を同定するために、PCR増幅をPCR1の条件ならびにプライマーとしてNP1およびNP2を用いて1mlの細菌培養物において実施した。PCR産物を2%アガロースゲル電気泳動を用いて分析した。

#### 【0195】

96ウェルフォーマットで20%グリセロール中に細菌クローンを貯蔵した。プラスミドDNAを調製し、配列決定し、そしてGenBank、dBest、およびNCI-CGAPデータベースの核酸相同性検索に供した。

10

#### 【0196】

(RT-PCR発現分析)

第一鎖cDNAを、Gibco-BRL Superscript Preamplificationシステムを用いるオリゴ(dT)12~18プライミングによって1μgのmRNAから生成した。製造者プロトコルを使用し、そしてこれは、42で50分間の逆転写酵素とのインキュベーション、続いて37で20分間のRNase H処理を包含した。反応を完了した後、この容積を、標準化の前に水で200μlに増大させた。16の異なる正常ヒト組織由来の第一鎖cDNAを、Clontechから入手した。

#### 【0197】

複数の組織由来の第一鎖cDNAの標準化を、プライマー5'atatacgccgctctcgctcgtcggacaa3'(配列番号15)および5'agccacacgcagctcattgtagaagg3'(配列番号16)を用いてアクチンを増幅することにより実施した。第一鎖cDNA(5μl)を、0.4μMプライマー、0.2μM各dNTP、1×PCR緩衝液(Clontech、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、pH8.3)、および1×Klentaq DNAポリメラーゼ(Clontech)を含む総容量50μlで増幅した。18サイクル、20サイクルおよび22サイクルで、5μlのPCR反応物を取り出し、そしてアガロース電気泳動のために使用した。PCRを、以下の条件下で、MJ Researchサーマルサイクラーを用いて実施した：初期変性は94で15秒間であり、続いて18サイクル、20サイクル、および22サイクルの以下：94で15、65で2分、72で5秒、である。72での最終伸長を2分間行った。アガロースゲル電気泳動後、複数の組織からの283bpのアクチンバンドのバンド強度を可視検査によって比較した。22サイクルのPCR後に全ての組織において等しいアクチンバンド強度を生じるように、第一鎖cDNAの希釈因数を算定した。22サイクルのPCR後に全ての組織において等しいバンド強度を達成するには、3ラウンドの標準化が必要であった。

20

30

#### 【0198】

84P2A9遺伝子の発現レベルを決定するために、5μlの標準化された第一鎖cDNAを、以下のプライマー対を用いる25、30、および35サイクルの増幅を用いるPCRによって分析し得る。これらプライマーは、(MIT; 詳細については、www.genome.wi.mit.eduを参照のこと)の補助により設計し得る。

40

#### 【0199】

半定量発現分析を、軽度のバンド強度を与えるサイクル数でPCR産物を比較することにより達成し得る。

#### 【0200】

(結果)

上述の材料および方法に記載の2つのSSH実験は、多数の候補遺伝子フラグメントクローン(SSHクローン)の単離に至った。全ての候補クローンを配列決定し、そして、対応する遺伝子の正体に関する情報を提供し、そして示差的な発現について特定の遺伝子进行分析するための決定を導くのを補助するために、主な公的な遺伝子およびESTデータベース中の全配列に対する相同性分析に供した。一般に、検索したデータベースのいずれか

50

においていかなる公知の配列とも相同性を有さず、従って新規な遺伝子を表すと考えられる遺伝子フラグメント、ならびに以前に配列決定された発現配列タグ (EST) に対して相同性を示す遺伝子フラグメントを、RT-PCRおよび/またはノーザン分析によってディファレンシャル (示差的) 発現分析に供した。

【0201】

約425bpを含む、SHHクローンの1つは、いくつかの精巣由来のESTに有意な相同性を示すが、既知の遺伝子のいずれに対しても相同性は示さなかった、そして84P2A9と名づけられた。

【0202】

16の正常な組織由来の第一鎖cDNAのノーザン発現分析は、生体組織における高度な前立腺および精巣の関連発現パターンを示した (図4)。

10

【0203】

(実施例2: 全長84P2A9cDNAのクローニング)

2347塩基対 (bp) の全長84P2A9 cDNAクローン (クローン1) を、LAPC-4 AD cDNAライブラリー (Lambda ZAP Express, Stratagene) からクローニングした (図2)。このcDNAは、504アミノ酸のオープンリーディングフレーム (ORF) をコードする。配列分析によって、6つの可能性のある核局在化シグナルの存在が示され、そしてPSORTプログラム (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/form.html>) を用いて核であることが予測される。タンパク質配列は、ヒト脳タンパク質KIAA1152 (337アミノ酸領域にわたって39.5%同一性) と相同であり、そしてLUCA15腫瘍サプレッサータンパク質と相同であるドメインを示す (42アミノ酸領域にわたって64.3%同一性) (GenBank登録番号#P52756) (図3)。84P2A9 cDNAは、プラスミドp84P2A9-1として、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC; Manassas, VA) に2000年1月5日に寄託され、そして登録番号PTA-1151を割り当てられた。

20

【0204】

84P2A9タンパク質は、いずれの公知のタンパク質とも相同性を有さないが、この配列は、精巣由来のいくつかのESTと重複する。

【0205】

(実施例3: 84P2A9遺伝子発現分析)

正常ヒト組織における84P2A9 mRNA発現を、プローブとして標識された84P2A9 SSHフラグメント (実施例1) を用いる、全部で16の異なる正常ヒト組織を含む、2つの多重組織プロット (Clontech; Palo Alto, California) のノーザンプロットングによって分析した。RNAサンプルを、アクチンプローブを用いて定量的に標準化した。この結果は、正常精巣および前立腺における、2.4kbおよび4.5kbの転写物の発現を実証した (図4)。

30

【0206】

前立腺癌組織における84P2A9発現を分析するために、ノーザンプロットングを、LAPC異種移植片由来のRNAにおいて実施した。結果は、全ての異種移植片において高いレベルの84P2A9発現を示し、LAPC-9 AD、LAPC-9 AIにおいて最高レベルが検出された (図4および5)。これらの結果は、84P2A9が、前立腺癌において上方制御されることの証拠を提供する。

40

【0207】

さらに、最高レベルの発現が、脳 (PFSK-1、T98G)、骨 (HOS、U2-OS)、肺 (CALU-1、NCI-H82、NCI-H146)、および腎臓 (769-P、A498、CAKI-1、SW839) の癌細胞株において検出された (図5)。中度の発現レベルが、いくつかの膵臓 (PANC-1、BxPC-3、HAPC、CAPAN-1)、結腸 (SK-CO-1、CACO-2、LOVO、COLO-205)、骨 (SK-ES-1、RD-ES)、乳房 (MCF-7、MDA-MB-435s) および精巣

50

癌 (NCCIT) の細胞株で検出された (図5)。

【0208】

さらに、前立腺癌患者サンプルは、前立腺組織の正常部分および腫瘍部分の両方における 84P2A9 の発現を示す (図6)。これらの結果は、84P2A9 が、前立腺癌および可能性としては他の癌で上方制御される、非常に精巢特異的な遺伝子であることを示唆する。MAGE 抗原と同様に、このように 84P2A9 は、癌 - 精巢抗原としてみなされ得る (Van den Eynde および Boon, Int J Clin Lab Res. 27: 81 ~ 86, 1997)。

【0209】

正常組織における 84P2A9 の発現は、異なるサンプル (主に正常組織および数個の癌細胞株を代表する) を含むマルチ組織 RNA ドットプロットを用いてさらに分析され得る。

【0210】

(実施例4: 84P2A9 ポリクローナル抗体の生成)

ポリクローナル抗体は、例えば、免疫剤および所望の場合アジュバントの1回以上の注射によって、哺乳動物中で惹起できる。代表的には、免疫剤および/またはアジュバントは、複数の物質または腹膜注射によって哺乳動物に注射される。代表的に、ペプチドは、84P2A9 のコード領域から設計され得る。代替的に (あるいは)、免疫剤は、84P2A9 タンパク質の全てもしくは一部、またはそれらの融合タンパク質を含み得る。例えば、84P2A9 アミノ酸配列は、当該分野で周知の種々の公知の融合タンパク質パートナーのいずれか1つ (例えば、マルトース結合タンパク質、LacZ、チオレドキシンまたは免疫グロブリン定常領域) に融合され得る (例えば、Current Protocols In Molecular Biology, 第2巻、16ユニット、Frederick M. Ausubulら、編., 1995; Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L, Damle, N., および Ledbetter, L. (1991) J. Exp. Med. 174: 561 - 566)。他のこのような組換え細菌タンパク質としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、および 84P2A9 の HIS タグ化融合タンパク質 (適切なアフィニティマトリックスを用いて誘導細菌から精製され得る) が挙げられる。

【0211】

免疫されている哺乳動物において免疫原性であることが公知のタンパク質に対して免疫剤を結合体化することは有用であり得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、およびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるがこれらに限定されない。使用され得るアジュバントの例としては、フロイント完全アジュバントおよび MPL - TDM アジュバント (モノホスホリル Lipid A、合成トレハロースジコリノマイコレート) が挙げられる。

【0212】

代表的なプロトコールでは、最初にウサギを完全フロイントのアジュバント中に混合した約 200 μg の融合タンパク質または K L H - ペプチドを用いて皮下に免疫した。次いで、約 200 μg の免疫原を含有する不完全フロイントアジュバントを2週間毎に皮下注射した。各免疫の後約 7 - 10 日に採血して、ELISA による抗血清の力価モニタリングに用いる。

【0213】

遺伝子操作した細胞または内因性 84P2A9 を発現する細胞の溶解物を用いて、ウェスタンブロット分析および免疫沈降分析によって、抗血清の特異性を試験する。84P2A9 を発現するために、細胞を遺伝子操作するために、全長 84P2A9 cDNA を発現ベクター (カルボキシ末端で 6 His タグを提供する) 中にクローニングし得る (pCDNA 3.1 myc-his, Invitrogen)。293T 細胞への構築物のトランスフェクション後、細胞溶解物を、免疫沈降し、そして抗-His または v5 抗エピトープ抗体 (Invitrogen) および抗 84P2A9 血清を用いてウェスタンブ

10

20

30

40

50

ットし得る（図11を参照のこと）。Hisタグ化タンパク質およびペプチドで免疫したウサギ由来の血清、ならびに枯渇したGSTおよびMBPタンパク質血清を、Affige1マトリックス（BioRad）に共有結合したそれぞれの免疫原からなるアフィニティカラムを通過させることによって、精製する。

#### 【0214】

（実施例5：細菌および哺乳動物系における組換え84P2A9の産生）

（細菌構築物）

（pGEX構築物を用いる組換え84P2A9の産生）

細菌細胞において、84P2A9を発現するために、84P2A9の一部を、pGEX-6P-1中にクローニングすることによって、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）遺伝子に、融合した（Amersham Pharmacia Biotech, NJ）。全ての構築物を作製してN末端で融合したGSTおよびC末端の6つのヒスチジンエピトープとともに組換え84P2A9タンパク質配列を精製した。ヒスチジンコドンORFの3'末端でクローニングプライマーに付加することによって、6つのヒスチジンエピトープタグを生成した。PreScission<sup>TM</sup> 認識部位によって、84P2A9からGSTタグの切断を可能にする。アンピシリン耐性遺伝子およびpBR322起点によってE. coli中でのプラスミドの選択および維持が可能になる。この構築物において、84P2A9のアミノ酸1~151を含有するフラグメントを、pGEX-6P-1にクローニングした。さらなる構築物を84P2A9タンパク質のpGEX-6P-1にまたがる領域（例えば、アミノ酸1~504およびアミノ酸151~504）中に作製し得る。

#### 【0215】

（哺乳動物構築物）

哺乳動物系において組換え84P2A9を発現するために、完全長の84P2A9 cDNAを、例えば、C末端に6Hisタグを提供する発現ベクター（pCDNA3.1 myc-his, Invitrogen）中にクローン化し得る。これらの構築物は、293T細胞中にトランスフェクトされ得る。トランスフェクトされた293T細胞溶解液は、ウェスタンブロットにおいて上記実施例4に記載された抗-84P2A9ポリクローナル血清でプローブされ得る。

#### 【0216】

84P2A9遺伝子をまた、レトロウイルス発現ベクターpSR MSVtkneo中にサブクローン化し得、そして以下のように84P2A9発現細胞株0確立するために用い得る。84P2A9コード配列（翻訳開始ATG~停止コドンまで）は、84P2A9 cDNAからds cDNAテンプレートを用いてPCRにより増幅される。PCR産物を、ベクター上のEcoR1（平滑末端化）およびXba1制限部位を介してpSR MSVtkneo中にサブクローン化し、そしてDH5 コンピテント細胞中に形質転換する。コロニーを釣り上げ、cDNA上の特有の内部制限部位をもつクローンをスクリーニングする。陽性のクローンは、このcDNA挿入片の配列決定により確認する。その後、レトロウイルスを、例えば、NIH3T3、Tsupr1、293またはrat-1細胞を用いる、種々の細胞株の感染および生成のために用い得る。

#### 【0217】

特定の哺乳動物系を本明細書において考察する。

#### 【0218】

（pcDNA3.1/V5-His-TOPO構築物を用いる組換え84P2A9の産生）

哺乳動物細胞において84P2A9を発現するため、1512bp（504アミノ酸）の84P2A9 ORFを、完全な翻訳開始Kozakコンセンサス配列をとともに、pcDNA3.1/V5-His-TOPO（Invitrogen, Carlsbad, CA）中にクローニングした。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターから駆動される。組換えタンパク質は、V5エピトープおよび6つのヒスチジン（

C末端に融合された)を有する。p c D N A 3 . 1 / V 5 - H i s - T O P Oベクターはまた、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルおよび転写終止配列(mRNAの安定性を強化する)を含み、そしてエピソーム複製のためのSV40起点およびラージT抗原を発現する細胞株中の単一ベクターレスキューを伴う。ネオマイシン耐性遺伝子が、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点が、E. coli中でのプラスミドの選択および維持を可能にする。

#### 【0219】

(pSRa構築物)

構成的に84P2A9を発現する哺乳動物細胞株を生成するために、1551bp(517アミノ酸)ORFをpSRa構築物中にクローニングする。pSRa構築物の293T-10A1パッケージング株へのトランスフェクション、または293細胞中のpSRaおよびヘルパープラスミド( )の同時トランスフェクションによって、それぞれ、アンホトロピックおよびエクトトロピックなレトロウイルスを生成する。このレトロウイルスを用いて、種々の哺乳動物細胞株を感染し得、これによってクローニングした遺伝子84P2A9の宿主細胞株への組み込みを生じる。タンパク質発現は、長末端反復配列(LTR)から駆動される。ネオマイシン耐性遺伝子が、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点が、E. coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にする。さらなるpSRa構築物を作製して、N末端およびC末端の両方のGFPおよび全長84P2A9タンパク質のmyc / 6HIS融合タンパク質を生成する。

#### 【0220】

(実施例6:バキュロウイルス系における組換え84P2A9の産生)

バキュロウイルス発現系における組換え84P2A9タンパク質を生成するために、84P2A9 cDNAを、N末端にHis-タグを提供する、バキュロウイルス転移ベクターpBlueBac4.5(Invitrogen)中にクローニングする。詳細には、pBlueBac-84P2A9を、ヘルパープラスミドpBac-N-Blue(Invitrogen)とともに、SF9(Spodoptera frugiperda)昆虫細胞中に同時トランスフェクトし、組換えバキュロウイルスを生成する(詳細についてはInvitrogenの指示マニュアルを参照のこと)。次いで、バキュロウイルスを細胞上清から収集し、そしてブランクアッセイにより精製する。

#### 【0221】

次いで、組換え84P2A9タンパク質を、精製バキュロウイルスを用いたHighFive昆虫細胞(Invitrogen)の感染により生成する。組換え84P2A9タンパク質は、抗-84P2A9抗体を用いて検出され得る。84P2A9タンパク質は、精製され、そして種々の細胞を基礎にしたアッセイにおいて、または84P2A9に特異的なポリクローナルおよびモノクローナル抗体を生成するための免疫原として用いられ得る。

#### 【0222】

(実施例7:84P2A9遺伝子の染色体マッピング)

GeneBridge4照射ハイブリッドパネル(Walterら、1994、Nat. Genetics 7:22)(Research Genetics, Huntsville AI)を用いて、84P2A9の染色体局在化を決定した。以下のPCRプライマーを用いて、94P2A9を局在化した:

84P2A9.1 g a c t t c a c t g a t g c g a t g g t a g g t (配列番号17)

84P2A9.2 g t c a a t a c t t t c c g a t g c t t t g c t (配列番号18)

93照射ハイブリッドパネルDNAについて得られたマッピングベクターは以下であった:

0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0  
 1 0 0 0 1 0 1 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0  
 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0。このベクターおよびマッピングプログラムは、<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>で、染色体1q32.3上の84P2A9に位置する(D1S1602-D1S217)。

#### 【0223】

(実施例8：潜在的なシグナル伝達経路の同定)

84P2A9が細胞中の既知のシグナル伝達経路を直接的または間接的に活性化するか否かを決定するために、ルシフェラーゼ(Luc)を基礎にした転写レポーターアッセイを、84P2A9を発現する細胞中で実施する。これらの転写レポーターは、良く特徴付けられたシグナル伝達経路の下流にある、既知の転写因子のためのコンセンサス結合部位を含む。これらのレポーターおよびそれらの関連転写因子、シグナル伝達経路、および活性化刺激物の例を、以下に列挙する。

1. NF- $\kappa$ B-Luc、NF- $\kappa$ B/Rel; Ik-キナーゼ/SAPK; 成長/アポトーシス/ストレス

2. SRE-Luc、SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; 成長/分化

3. AP-1-Luc、FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; 成長/アポトーシス/ストレス

4. ARE-Luc、アンドロゲンレセプター; ステロイド類/MAPK; 成長/分化/アポトーシス

5. p53-Luc、p53; SAPK; 成長/分化/アポトーシス

6. CRE-Luc、CREB/ATF2; PKA/p38; 成長/アポトーシス/ストレス

84P2A9媒介効果は、mRNA発現を示す細胞中でアッセイされ得る。ルシフェラーゼレポータープラスミドは、脂質媒介トランスフェクション(TFX-50、Promega)により導入され得る。相対的転写活性であるルシフェラーゼ活性の指標は、細胞抽出物のルシフェリン基質とのインキュベーションにより測定され、そして反応の化学発光がルミノメーター中でモニターされる。

#### 【0224】

(実施例9：84P2A9モノクローナル抗体の生成)

84P2A9にMAbを生成するために、代表的には、Balb/Cマウスを、完全フロイントアジュバント中に混合された、約10~50 $\mu$ gのタンパク質免疫原を用いて腹腔内に免疫する。タンパク質免疫原としては、細菌およびバキュロウイルスが産生した組換え84P2A9タンパク質および哺乳動物が発現したヒトIgG Fc融合タンパク質が挙げられる。次いでマウスに、フロイントの不完全アジュバント中に混合された10~50 $\mu$ gの抗原で2~4週間毎に、引き続いて免疫を行う。あるいは、Rib iアジュバントを最初の免疫に用いる。さらに、DNAベースの免疫プロトコルを用いる。このプロトコルでは、84P2A9 cDNA単独もしくはIgG Fc融合をコードするpCDNA3.1のような哺乳動物発現ベクターを用いて、プラスミドDNAの直接注射によってマウスを免疫する。このプロトコルを単独で、そしてタンパク質免疫原と組み合わせ用いる。免疫後7~10回採血をして、免疫応答の力価および特異性をモニタリングする。一旦、適切な反応性および特異性(ELISA、ウエスタンブロットおよび免疫沈降分析によって決定)を得ると、次いで、当該分野で周知の確立された手順で融合およびハイブリドーマ生成を行う(HarlowおよびLane, 1988)。

#### 【0225】

代表的な特定のプロトコルにおいて、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質(84P2A9タンパク質を包含する)を合成して、免疫原として用いる。Balb/Cマウスを、最初に、完全フロイントアジュバント中に混合された、10~50 $\mu$ gのGST-84P2A9融合タンパク質を用いて腹腔内に免疫する。引き続いて

10

20

30

40

50

、フロイントの不完全アジュバント中に混合された10～50 μgのGST-84P2A9タンパク質で2週間毎に、全部で3回マウスに免疫を行う。全長84P2A9タンパク質に対する、免疫マウス由来血清の反応性を、293T細胞から発現されたHISタグ化84P2A9タンパク質の部分的精製調製物を用いて、ELISAによってモニタリングする(実施例5)。最強の反応性を示すマウスを、3週間休息させ、そしてPBS中の融合タンパク質の最後の注射をし、次いで4日後に屠殺する。次いで屠殺マウスの脾臓を回収し、そして標準的な手順を用いてSPO/2ミエローマ細胞に融合する(HarlowおよびLane、1988)。HAT選択の後、増殖ウェルからの上清を、ELISAおよびウエスタンブロットによりスクリーニングし、84P2A9特異的抗体産生クローンを同定する。

10

## 【0226】

84P2A9モノクローナル抗体の結合親和性は、標準的な技術を用いて測定し得る。親和性測定は、エピトープ結合に対する抗体の強さを定量し、そしてどの84P2A9モノクローナル抗体が診断または治療使用に好適であるかを規定するのを補助するために用いられ得る。BIAcoreシステム(Uppsala、Sweden)は、結合親和性を決定するための好適な方法である。BIAcoreシステムは、生体分子相互作用をリアルタイムでモニターするために、表面プラスモン共鳴を用いる(SPR、Welford K、1991、Opt. Quant. Elect. 23:1; MortonおよびMyszka、1998、Methods in Enzymology 295:268)。BIAcore分析は、会合速度定数、解離速度定数、平衡解離定数、および親和性定数を首尾良く生成する。

20

## 【0227】

(実施例10:84P2A9機能のインビトロアッセイ)

前立腺癌における84P2A9の発現は、この遺伝子が腫瘍進行において機能的役割を有するという証拠を提供する。84P2A9は、腫瘍形成または腫瘍形成をブロックする遺伝子を抑制するのに関与する活性化合物遺伝子に関与する転写因子として機能する可能性がある。84P2A9機能は、インビトロアプローチを用いて哺乳動物細胞中で評価され得る。哺乳動物発現については、84P2A9は、pcDNA 3.1 myc-HISタグ(実施例5)およびレトロウイルスベクターpSR tkneo(Mullerら、1991、MCB 11:1785)を含む多くの適切なベクター中にクローン化され

30

得る。このような発現ベクターを用い、84P2A9は、NIH3T3、rat-1、Tsupr1および293Tを含むいくつかの細胞株で発現され得る。84P2A9の発現は、抗-84P2A9抗体を用いてモニターされ得る(実施例4および9を参照のこと)。

## 【0228】

84P2A9を発現する哺乳動物細胞株は、いくつかのインビトロおよびインビボアッセイで試験され得、これには、組織培養中の細胞増殖、アポトーシスシグナルの活性化、SCIDマウスにおける腫瘍形成、および膜侵襲培養系を用いるインビトロ侵襲(MICS)(Welchら、Int. J. Cancer 43:449-457)が含まれる。84P2A9細胞表現型を、84P2A9の発現を欠く細胞の表現型と比較する。84P2A9の転写効果は、遺伝子アレイ(Clontech)および転写レポーターアッセイ(Stratagene)を用いて遺伝子発現上の84P2A9の効果を評価することによって試験され得る。

40

## 【0229】

84P2A9を発現する細胞株はまた、マトリゲルでコートされた多孔性膜チャンバ(Becton Dickinson)を通る細胞の通過を測定することにより、侵襲および遊走性質の改変についてアッセイされ得る。対辺への膜を通じる細胞の通過は、カルセイン-Am(Molecular Probes)を負荷したインジケーター細胞を用いる蛍光アッセイ(Becton Dickinson Technical Bulletin #428)を用いてモニターされる。分析された細胞株は、親および84P2A9

50

過剰発現 PC3、NIH3T3ならびにLNCaP細胞を含む。84P2A9発現細胞が化学誘引物質の性質を有するか否かを決定するために、インジケータ細胞を、コントロール培地に比較して84P2A9馴化培地の勾配に向かう多孔性膜を通じる通過についてモニターする。このアッセイをまた使用して、候補の癌治療組成物による84P2A9で誘導される効果の特異的の中和を定性および定量し得る。

#### 【0230】

84P2A9の機能は、上記の種々の機能的アッセイ（例えば、成長、侵襲および移動）と連結された抗アンチセンスRNA技術を用いて評価され得る。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを、84P2A9発現細胞中に導入し得、それによって84P2A9の発現を防ぐ。コントロールおよびアンチセンス含有細胞を、増殖、侵襲、移動、アポトーシスおよび転写能力について分析し得る。84P2A9発現の損失の局所および全身効果が評価され得る。

10

#### 【0231】

（実施例11：84P2A9腫瘍成長促進に対するインビボアッセイ）

腫瘍細胞増殖に対する84P2A9タンパク質の影響は、腫瘍を保有するマウス中の遺伝子過剰発現によりインビボで評価され得る。例えば、SCIDマウスに、各脇腹上に、tkNeo空ベクターまたは84P2A9を含む、PC3、TSUPR1、またはDU145細胞のいずれかの $1 \times 10^6$ を皮下注射し得る。少なくとも以下の2つのストラテジーが用いられ得る：（1）ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（1989年7月5日に公開されたUK2, 211, 504）、（アデノウイルス2のような）アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、トリザルコーマウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス40（SV40）のようなウイルスのゲノムから、または例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター（このようなプロモーターが宿主細胞系と適合するという条件で）の異種哺乳動物プロモーターから得られた構成的プロモーターのようなプロモーターの調節下の、構成的84P2A9発現、ならびに（2）（このようなプロモーターが宿主細胞系と適合するという条件で）ecdysone、tetなどのような、誘導性ベクター系の制御下の調節発現。次いで、腫瘍容積を、触知可能な腫瘍の出現時にモニターし、そして、経時的に、84P2A9発現細胞が、より速い速度で成長するか否か、および84P2A9発現細胞により生成される腫瘍が、改変された病原性の特徴（例えば、増大した転移、血管形成、化学的治療薬物に対して減少した応答性）を示すか否かを決定する。さらに、マウスに、 $1 \times 10^5$ の同じ細胞を同所的に移植し得、84P2A9が、前立腺における局所成長に対する影響、または特に肺、リンパ節、および骨髄に特異的に転移する細胞の能力に対する影響を有するか否かを決定する。

20

30

#### 【0232】

このアッセイはまた、（例えば、84P2A9内部抗体、84P2A9アンチセンス分子およびリボザイムのような）候補治療組成物の84P2A9阻害効果を決定するために有用である。

#### 【0233】

（実施例12：細胞の小画分中の84P2A9発現のウェスタン分析）

84P2A9の配列分析は、核局在化シグナルの存在を示した。84P2A9の細胞位置は、細胞生物学で広く用いられる細胞下分画技法を用いて評価され得る（Storrieら、Methods Enzymol. 1990; 182: 203-25）。前立腺細胞株または精巢細胞株は、核、細胞質ゾルおよび膜画分に分離され得る。異なる画分中の84P2A9発現は、ウェスタンブロットティング技法を用いて試験され得る。

40

#### 【0234】

あるいは、84P2A9の細胞下局在化を決定するために、293T細胞を、HISタグ84P2A9をコードする発現ベクター（PCDNA3.1 MYC/HIS、Invitrogen）でトランスフェクトし得る。このトランスフェクト細胞を回収し、そして先に記載のように（Pemberton、P.A.ら、1997、J of Hist

50

o chemistry and Cytochemistry、45:1697-1706)、差示的細胞下分画プロトコルに供し得る。このプロトコルは、細胞を、核、重膜(リソソーム、ペルオキシソーム、およびミトコンドリア)、軽膜(原形質膜および小胞体)、および可溶性タンパク質について濃縮された画分に分割する。

【0235】

本出願を通じて、種々の刊行物が(例えば、括弧内に)参照されている。これらの刊行物の開示は、それらの全体が本明細書に参考として援用されている。

【0236】

本発明は、本明細書に開示の実施の形態により範囲を限定されるべきではなく、これらは、本発明の個々の局面の単なる例示として意図され、そして機能的に等価である任意のものは、本発明の範囲内にある。本明細書に記載のこれらに加えて、本発明のモデルおよび方法に対する種々の改変は、先行する記述および教示から当業者に明らかとなり、そして本発明の範囲内に同様に入ることが意図される。このような改変またはその他の実施の形態は、本発明の真の範囲および思想から逸脱することなく実施され得る。

10

【0237】

(表)

(表1: 84P2A9タンパク質由来のペプチドの、ヒトMHCクラスI分子HLA-A2に対する推定結合)

【0238】

【表1】

20

ランク	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(半分の解離時間) の予測
1	300	SILTGSFPL (SEQ ID NO: 19)	63.04
2	449	RMLQNMGWT (SEQ ID NO: 20)	33.75
3	4	LVHDLVSAL (SEQ ID NO: 21)	29.97
4	238	SLSSTDAGL (SEQ ID NO: 22)	21.36
5	198	KIQDEGVVL (SEQ ID NO: 23)	17.28
6	433	FVGENAQPI (SEQ ID NO: 24)	17.22
7	301	ILTGSFPLM (SEQ ID NO: 25)	16.05
8	218	KMCEEQKV (SEQ ID NO: 26)	11.25
9	480	KGLGLGFPL (SEQ ID NO: 27)	10.47
10	461	GLGRDGKGI (SEQ ID NO: 28)	10.43

30

表3~16は、84P2A9タンパク質由来のペプチドの、種々のHLA分子に対する推定結合のさらなる分析を提供する。

【0239】

(表2: アミノ酸置換マトリックス)

GCGソフトウェア 9.0 BLOSUM62アミノ酸置換マトリックス(ブロック置換マトリックス)から改作した。値が高いほど、置換は関連する天然のタンパク質中に見出される可能性が高い。

【0240】

40

【表2】

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
Y	-2	-2	-3	-2	3	-3	2	-1	-2	-1	-1	-2	-3	-1	-2	-2	-2	0	-3	-2
W	-3	-2	-4	-3	1	-2	-3	-3	-2	-2	-1	-4	-4	-2	-3	-3	-3	-1	11	7
V	0	-1	-3	-2	-1	-3	-3	-2	-2	1	1	-3	-2	-2	-2	-2	0	4		
T	0	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	0	0	-1	-1	-1	4	5			
S	1	-1	0	0	-2	0	0	-2	0	-1	1	1	0	0	5					
R	-1	-3	-2	0	-3	-2	0	-3	2	-2	-1	0	-2	1						
Q	-1	-3	0	2	-3	-2	0	-3	1	-2	0	0	-1	5						
P	-1	-3	-1	-1	-4	-2	-2	-3	-1	-3	-2	7								
N	-2	-3	1	0	-3	0	1	-3	0	-3	6									
M	-1	-1	-3	-2	0	-3	-2	1	0	5										
L	-1	-1	-4	-3	0	-4	-3	2	4											
K	-1	-3	-1	-3	1	-2	-1	-3	5											
I	-1	-1	-3	-3	0	-4	-3	4												
H	-2	-3	-1	0	-3	-2	8													
G	0	-3	-1	-2	-3	6														
F	-2	-2	-3	-3	6															
E	-1	-4	2	5																
D	-2	-3	6																	
C	0	9																		
A	4																			

10

20

30

【0241】

【表3】

### HLA ハフチドモチーフの検索結果

使用者のパラメーターおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A1
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	9
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフチド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	496
スコア付け出力表に戻って報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

40

(表3A)

【0242】

【表4】

スコア付けの結果

ランク	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	71	SLEEPSKDY	43.000
2	409	ISEPIQAMQ	27.000
3	283	KEDPTELDK	25.000
4	15	SSEORGGF	13.500
5	23	FAETGDHSR	9.000
6	441	IENNIGNR	9.000
7	241	STDAGLETN	6.250
8	72	LEEPSKDYR	4.500
9	233	ESDSSSLSS	3.750
10	92	QSDQMLVA	3.750
11	157	MTPPEGCR	2.500
12	413	TGDIKRRK	2.500
13	256	DDEQSDWFY	2.250
14	373	RTEHQHQL	2.250
15	309	MSHPSRRGF	1.500
16	207	ESEETQTN	1.350
17	231	MSESDSSL	1.350
18	64	LSEGSSSL	1.350
19	436	WTPCCLGR	1.250
20	375	EHQHQLLR	1.250
21	293	VDPVFESI	1.250
22	93	SDDQMLVAR	1.000
23	494	ATTTPNAGR	1.000
24	208	SEETQTNK	0.900
25	205	VLESEETNQ	0.900
26	79		0.900
27	11	ALESSEQA	0.900
28	226	VDELMSSE	0.750
29	31	RSISCPKRR	0.750
30	90	HSDDQML	0.750

同調した使用者の17441配列  
(長さ=504残基)

```

1 MEELVHDLVS ALESSEQA GGAETGDHS RSISCPKRR ARKRRGRKR
51 SYNVHPWET GHCLSEGSOS SLEEPSKDYR ENNNNNKKDH SDSDDQMLVA
101 KRPPSSMLNN NVRGKRPLNH ESDFAVDNG NRTLARRRKY KRMAVDLPQD
151 ISNKRIMTQF PEGCRDQMD SDRAYQYQEF TKNVVKRKL KIINQGPRIQ
201 DEGVVLESEE TNQTNKDKM CLEQKVSDEL MSESDSSLS STDAGLFTND
251 EGRQGDDEQS DWFYKESGG ACGITGVVFW WEKEDPTELD KNVDPVFES
301 ILTGSFFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGFVG
351 NKRNVHFSFD SHNDHWTFP GARTERDQHQ LLRDNNAERG HKNKNSVATA
401 SRQTSMLGSS LCTGDIKRRR KAAPLPGFTT AGFVGENAQP ILENNIGNRN
451 LQNMGWTPGS GLGRGKGIS EPIQAMQRRK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501 GKSA

```

(表 3 B)

【 0 2 4 3 】

【表 5】

## HLA ハフチドモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A1
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	10
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフチド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	495
スコア付け出力表に於て報告されたトピックのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表4A)

【0244】

【表6】

スコア付けの結果

ランク	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	469	ISEPIQAMQR	675.000
2	92	OSDDQMLVAK	30.000
3	207	ESEERNOTNK	27.000
4	168	IMDSdRAYQY	25.000
5	11	ALEE <sub>s</sub> SEQAR	9.000
6	71	SLEE <sub>p</sub> SKDYR	9.000
7	282	EKE <sub>Dp</sub> TELDK	4.500
8	166	QDMdSORAY	3.750
9	90	HSDS <sub>d</sub> DQMLV	3.750
10	177	KQEF <sub>k</sub> KNKVK	2.700
11	144	AVDL <sub>p</sub> QDISN	2.500
12	373	RTEH <sub>d</sub> QHQLL	2.250
13	33	ISCP <sub>l</sub> KRQAR	1.500
14	231	MSES <sub>d</sub> SSSLS	1.350
15	15	SSEQ <sub>a</sub> RGGF <sub>A</sub>	1.350
16	234	QGD <sub>d</sub> eQSDWF	1.250
17	255	GDE <sub>e</sub> qSDW <sub>F</sub> Y	1.250
18	293	VPDP <sub>v</sub> VFESIL	1.250
19	173	RAY <sub>Qy</sub> QEFTK	1.000
20	481	GLGL <sub>g</sub> FPLEK	1.000
21	205	VLES <sub>e</sub> ETNOT	0.900
22	79	YREN <sub>n</sub> NNNKK	0.900
23	441	ILEN <sub>n</sub> IGNRM	0.900
24	23	FAET <sub>g</sub> DHSRS	0.900
25	121	ESDF <sub>a</sub> VDNVC	0.750
26	233		0.750
27	409	GSLC <sub>l</sub> GDIKR	0.750
28	259	QSDW <sub>f</sub> YKES	0.750
29	70	SSLE <sub>e</sub> pSKDY	0.750
30	67	GSDS <sub>s</sub> LEEPS	0.750

同調した使用者の107041ド配列  
(長さ=504残基)

```

1 MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPlKRQ ARKRRCRKR
51 SYNVHHFWET GHCLSEGSDS SLEEPSKOYR EWHNNNKDR SDSDDQMLVA
101 KRRPSSNLNN NVNGKRFLWH ESDFAVDNVC NRTLRRRRRRKV KRMVDLPQ
151 ISNKRTMTQP PEGCRDQMD SRAYQTQEF TKNVKKRL KILRQGFKIQ
201 DEGVVLESEE TNQTNKDRME CEEQVSDEL MSESDSSSLS STDAGLFTND
251 EGRQGDEQS DWFYEKESGG ACCIGTGVVFM WEKEDPTELD KNVPDFVFS
301 ILTGSFPLMS HPSRRAGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIGPVG
351 NKRVHVFSPD SHHHDHWFSP GARTEDQHQ LLRONAAERG HKKNCSVRTA
401 SRQTSNHLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451 IQNHGWIFGS GLGRDGKGIS EPIQAMQREK GLGLGFPPLEK STSATTTTFNA
501 GKSA

```

(表4B)

【0245】

【表7】

# HLA ハフキドモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A-0201
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	9
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフキド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	496
スコア付け出力表に基いて報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

(表 5 A)  
 【 0 2 4 6 】  
 【表 8】

スコア付けの結果			
ランク	開始位置	部分配列残基の表	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	300	SILTGSFPL	63.035
2	449	RMLQNHGWT	32.748
3	4	LVHDLVSAI	29.965
4	238	SLSSTDAGL	21.362
5	198	KIQDEGVVL	17.282
6	433	FVGENAQPI	17.217
7	301	ILTGSFPLM	16.047
8	218	KMECEEQKV	11.252
9	480	KGLGLGFPL	10.474
10	461	GLGRDGGKI	10.433
11	341	SMVPIPGPV	6.530
12	468	GISEPIQAM	6.442
13	405	SMHLGSLCT	5.382
14	191	KIIRQGPKI	5.021
15	117	PLWHESDEA	2.445
16	177	VQEFTKNKV	2.076
17	454	MGWTPGSGL	1.968
18	156	INTOPFEGC	1.758
19	374	TEHDQHOLL	1.703
20	52	YNVHRPWET	1.678
21	474	QAMQRPAGL	1.098
22	240	SSTOAGLFT	1.097
23	438	AQFLENNI	1.038
24	269	GGACGITGV	1.044
25	143	MAVDLPQDI	1.010
26	206	LESEETNOT	1.010
27	173	RAYQYQFT	0.893
28	3	ELVHDLVSA	0.857
29	132	RTLRRRRKV	0.715
30	266	KESGCACGI	0.710

同調した使用者のハフキド配列  
 (長さ=504 残基)

```

1    MEELVHDLVS ALESSEQAR GGFAETGDHS RSISCFPKRQ ANKRGRKRR
51   SYNVRHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNHNKIDH SDSDDQMLVA
101  KRRPSSNLNV NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLARRRKY KRMAVDLPQD
151  ISNKRTHIQP FEGCRQQMD SDRAYQYQEF TKMEVKKRKL KIIRQGPKIQ
201  DEGVVLESEE TNGTINKDKME CEEOKVSDLE MSESDDSSLS STDAGLFTND
251  EGRQCDDEQS DWFYENKESGG ACGITGVVPM WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301  ILTGSFPLMS RPSRRGFQAR LSRLRGHSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPV
351  NKRMYHFSFD SHHHDHWFSF GARTERDQHQ LLRDNRAERG HKNKCSVRTA
401  SRQTSMLHGS LCTGDIKRRR KAARLPGETT ACFVGENAQP ILENNIGNRM
451  LQNMGWTFGS GLGRDGGKLS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501  GRSA
  
```

10  
20  
30  
40

(表5B)

【0247】

【表9】

**HLA** ハフクドモチーフの検索結果

使用者のパラメーターおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A_0201
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	10
入力配列について選択されたモード	Y
モード形式	番号付きの線
使用者の入力ハフクド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	495
スコア付け出力表に戻って報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表6A)

【0248】

【表10】

スコア付けの結果			
ランク	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	230	LMSEnDSSSL	107.536
2	63	CLSEqSDSSL	87.586
3	117	FLWHeSDFAV	73.661
4	453	NMGWLPSSGL	15.428
5	475	AMQRpKGLGL	15.428
6	433	FVGErAQFIL	14.454
7	323	RLHGmSSKNI	10.433
8	142	RMAYdLPQDI	7.535
9	483	GLGFpLPRST	7.452
10	300	STLTgSFFLM	4.802
11	3	ELVHdLVSAL	3.685
12	473	IQAMqRPKGL	3.682
13	292	NVPDqVFESI	3.485
14	124	FAVDnVGNRT	1.952
15	334	KSGGLPFSMV	1.589
16	445	NIGMfMLQNM	1.571
17	313	RGFOeRLSRL	1.187
18	268	SGGAGITGV	1.044
19	288	ELDKnVPDFV	1.022
20	486	FPLPkSTSAT	0.828
21	205	VLESeETNOT	0.811
22	402	RQTSnHLGSL	0.648
23	425	LPGFLTAGIV	0.552
24	441	ILENnIGNRM	0.541
25	237	SSLEsTDAGL	0.516
26	10	SALEeSSEQA	0.513
27	212	NQFNkDKMEC	0.504
28	301	ILTGsFELMS	0.481
29	239	LSSTdAGLFT	0.455
30	103	RPSSnLNNV	0.454

10

20

同調した使用者の1704ド配列  
(長さ=504残基)

```

1 MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPKLRQ ARKRRGRKRR
51 SYNVHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSNDYR ENHNNKXKH SOSDDQLVA
101 KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPD
151 ISNKRATMQP PEGCNDQDM SDRAYQYQEF TENKVKRRKL KIIRQGPRIQ
201 DEGVLESEE TNOTNDRME CEOKVSDLE HSESDSSLS STDAGLFTND
251 EGRQGDDEQS DMEYEKESG ACGITGVVW NEKEDPTELD KNPDPVFES
301 ILTGSFFLMS RPSRRGFQAR LSKLHGSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351 NKRMYHSPD SHRHDMFSP GARTHDQHQ LLRDNRARG HKNCVVRTA
401 SRQTSMLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451 LQNMGWTRGS GLGRDCKGLS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTFFNA
501 GKSA

```

30

(表6B)

【0249】

【表11】

## HLA ハフクドモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A3
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	9
入力配列について選択されたモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフクド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	496
スコア付け出力表に戻って報告されたハフクドスコア付けの部分配列の数	30

10

(表7A)

【0250】

【表12】

スコア付けの結果

ランク	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解凍時間の予測)
1	326	GMSKNLKK	120.000
2	245	GLFTNDEGR	60.000
3	133	FLRRRRKVK	10.000
4	146	GLPQDISNK	9.000
5	410	SLCTGDIKR	8.000
6	107	NLNNVVRGK	6.000
7	258	EQSDWVYEK	4.860
8	71	SLEEPSKDY	4.500
9	381	LLRDNRRAER	4.000
10	441	ILENNIGNR	1.800
11	494	ATTPNAGK	1.500
12	301	ILTGSFPLM	0.900
13	461	GLGRDGKGI	0.900
14	128	NUGNRTLRR	0.800
15	238	SLSTDAGL	0.600
16	307	FLMSHFSRR	0.600
17	456	WTFGSGLGR	0.600
18	218	RMECEEQKV	0.600
19	283	KEDPTELDK	0.540
20	409	GSLCTGDIK	0.450
21	273	GITGVVPHN	0.405
22	344	PIPGPVGNK	0.405
23	184	KVKRKLKI	0.360
24	156	TMTQPEGC	0.300
25	11	ALESSEQA	0.300
26	180	FTKNVYKER	0.300
27	35	CPLKROARK	0.300
28	459	GSGLGRGK	0.300
29	191	KIIRQGFKI	0.270
30	483	GLGFPLPKS	0.270

同調した使用者の1つ4ド配列  
(長さ=504残基)

```

1    MEELVHDLVS ALESSEQAR GGFAETGDHS RSISCFPKRQ ARKRGRKRKR
51   SYNVHPNET GHCLSEGS SLEEPSKDYR ENHNNKKNH SDDQDLVA
101  KRPFSSNLNN NVRGRPLNH ESDEAVDVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPDQ
151  ISNKRINTQP PEGCRDQMD SDRAYQYQEF TKNKVKRKL KIIRQGPKI
201  DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSESDSSLS STDAGLFTND
251  EGROGDDEQS DMFYEKESGG ACGITGVVPH WEKEDTELD KNVPDPVFES
301  ILTGSFPLMS HPSRRGFOAR LSRLHGMSSK NIKKSGGFTT SMVPIPGFVG
351  NKRNVHFSFD SHHHDWFSF GARTERDQHQ LLRDNRRAERG HKNKCSVRTA
401  SRQTSMLHGS ICTGDIKRRR KAAPLPGFTT AGFVGENAQF ILENNIGNRM
451  LQNMGTTFGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501  GKSA

```

(表7B)  
[0251]  
[表13]

10

20

30

## HLA ハフチドモチーフの検索結果

使用者のパラメーターおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A3
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	10
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフチド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	495
スコア付け出力表に基づいて報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表 8 A)

【 0 2 5 2 】

【表 1 4】

スコア付けの結果

ランク	開始位置	部分配列残基の表	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	481	GLGLGFFLEPK	360.000
2	189	KLKIIRQGFPK	18.000
3	71	SLEEPSKDYR	6.000
4	11	ALEESSEQAR	6.000
5	380	QLLECNRAER	6.000
6	175	YQYQeFTKWK	4.500
7	274	ITGVVFWWEK	4.500
8	133	TLRRrRKVKR	4.000
9	168	DHDSdRAYQY	3.600
10	173	RAYQYQeFTK	3.000
11	410	SLCTGdIKRR	3.000
12	156	TMTQpFEGCR	1.800
13	146	DLFQdISNKR	1.800
14	107	MLNNnVRGKR	1.800
15	475	AMORpKGLGL	1.200
16	63	CLSEqSOSL	0.900
17	453	NMGWlPGSGL	0.900
18	230	LMSEsDSSL	0.900
19	3	ELVHdLVSAL	0.810
20	132	RTLrRRKVK	0.750
21	180	FTKkVKKRK	0.750
22	343	VPIpPVGNK	0.608
23	238	SLSSdDAGLF	0.600
24	142	RNAVGLPQDI	0.600
25	257	DEQSDnFYEK	0.486
26	323	RLHGeSSKNI	0.450
27	301	ILTGsFFLMS	0.360
28	117	PLNHsDFAV	0.300
29	493	SATTeFNAGK	0.300
30	177	YQeFEKKNVK	0.300

10

20

同調した使用者の17704ド配列  
(長さ=504残基)

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS	RSISCPLEKQ	ARKRRGRKRR
51	SYNVHHEWET	GHCLSEGSOS	SLEEPSKDYR	ENHNNKKDH	SDSQQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRPLWR	ESDFAYDNVG	NRTLRRRRKV	KRMAVDLPQD
151	ISNKRTMTQF	FEGCRDQDM	SDRAYQYQEF	TKNKVKRKL	KTIROGPKIQ
201	DEGVVLESEE	INQTNKDRME	CEEQKYSDEL	MSESOSLSL	STDAGLFTND
251	EGRQGDDEQS	DWFYEKESGG	ACGITGVVPM	WEKEDPTELD	KNVEDPVFEZ
301	ILTGsFFLMS	HPSRAGFQAR	LSRLHGMSK	NIKKSGGTFT	SMVPIPGVPG
351	NKRMVHFSFD	SHRHdHWFSF	GARTEHDQHQ	LLRDNRARG	HKKNCsVRTA
401	SRQTSMLLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGPTT	AGFVGENAQP	ILENNIGNRM
451	LQNMGTWPGS	GLGRDGKGIS	EPIQAMQRPK	GLGLGFLEPK	STSATTTPNA
501	GKSA				

30

(表 8 B)

【 0 2 5 3 】

【表 1 5】

## HLA ハフコードモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A*1101
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	9
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフコード配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	496
右ア付出力表に戻って報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表9A)

【0254】

【表16】

スコア付けの結果

ランク	開始位置	部分配列残基の表	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	326	GMSKNIKK	2.400
2	174	AYQYQETK	1.200
3	494	ATTTPNAGK	1.000
4	128	NVGNATLRR	0.800
5	245	GLFTNDEGR	0.480
6	456	WTPGSGLGR	0.400
7	258	EQSDWFYER	0.360
8	283	KEDPTELOK	0.360
9	35	CPLKRQARK	0.300
10	133	TLRRRRKVK	0.200
11	176	QYQYFKNK	0.200
12	157	MTQPPEGCR	0.200
13	40	QARKRRGRK	0.200
14	80	RENHNNKK	0.180
15	410	SLCTGDIKA	0.160
16	210	ETNQTNDK	0.150
17	146	DLPODISNK	0.120
18	184	KVKRRLKI	0.120
19	180	FTKRVKRR	0.100
20	409	GSLSCTGDIK	0.090
21	381	LLRDNRAER	0.080
22	441	ILENNIGNR	0.080
23	482	LGLGFPLPK	0.060
24	459	GSGLGROCK	0.060
25	275	IGVVPWEK	0.060
26	139	KVKRMAVDL	0.060
27	208	SEETMOTRK	0.060
28	306	FPLMSHPSR	0.060
29	178	QFTKRVK	0.060
30	179	EFTKRVKK	0.060

10

20

同調した使用者の1704ド配列  
(長さ=504残基)

```

1 MEELVHDLVS ALEESSTQAR GFAETGDRS RSISCFPKRQ ARKRRGRKRR
51 SYNVHHPNET GHCLSEGSDS SLEEPSKOYR ENHNNNKKDH SDSDDQLVA
101 KRRPSSNLNM NVRGKRPLWR ESDFAVONVG NRTLRRRRKV KRMVADLPQ
151 ISNKRMTIQP PEGCRDQMD SDRAYQYQEF TANKVKKRL KIRQGFKIQ
201 DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSESDDSSLS STDAGLETND
251 EGRQGDDEQS DWFYKESGG ACGITGVVPP WEKEDPTELD KNVEDPVFES
301 ILTGSFPPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSK NIKKSGTPT SMVPIPGVFG
351 NKKMVFSPD SHRHDFWSP GARTEHDQHQ LLRDNRAERG RKKNCVVRTA
401 SRQTSMLGGS LCTGDIKRRR KAAPLPGFTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451 LQNHQWTPGS GLGRDGGKIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501 GKSA

```

30

(表9B)

【0255】

【表17】

## HLA ハフマンコードモジュールの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A=1101
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	10
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフマンコード配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	495
スコア付出力表に基いて報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表10A)

【0256】

【表18】

スコア付けの結果			
ランク	開始位置	部分配列残基の長さ	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	173	RAYQ <sup>v</sup> QEFTK	3.600
2	481	GLGL <sup>g</sup> FPLPK	2.400
3	132	RTLR <sup>r</sup> RRKVK	2.250
4	274	ITGV <sup>v</sup> PPWVK	2.000
5	39	ROAR <sup>k</sup> RRGRK	1.800
6	189	KLKI <sup>r</sup> ROGPK	1.200
7	175	YQYQ <sup>e</sup> FTKVK	0.600
8	180	FTKN <sup>k</sup> VKRRK	0.500
9	177	YQET <sup>k</sup> KNVKK	0.300
10	343	VPI <sup>p</sup> PGFVGNK	0.300
11	493	SATT <sup>t</sup> FPNAGK	0.200
12	34	SCPL <sup>k</sup> RQARK	0.200
13	178	QEFT <sup>k</sup> KNVKK	0.120
14	78	DYER <sup>n</sup> HNNS	0.120
15	380	QLLR <sup>n</sup> RAER	0.120
16	22	GFAE <sup>c</sup> GDHSR	0.120
17	412	CTGO <sup>i</sup> KRRRK	0.100
18	133	TLRR <sup>r</sup> RKVKR	0.080
19	71	SLEE <sup>p</sup> SKDYR	0.080
20	325	HCMS <sup>a</sup> KNIKK	0.080
21	107	NLNN <sup>n</sup> VRGKR	0.080
22	11	ALEE <sup>s</sup> SEQAR	0.080
23	156	TMTQ <sup>p</sup> PECCR	0.080
24	182	KNKV <sup>k</sup> KRKLK	0.060
25	216	KOKM <sup>e</sup> CEEQK	0.060
26	383	RDNR <sup>a</sup> ENGSK	0.060
27	306	FPLM <sup>s</sup> HPFRR	0.060
28	128	NVGN <sup>r</sup> TLRRR	0.040
29	111	NVRCK <sup>r</sup> RPLNH	0.040
30	311	KPSR <sup>r</sup> GFOAR	0.040

10

20

同調した使用者の17041配列  
(長さ=504残基)

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS	RSISCPLNKQ	AAKRRGRKRR	
51	SYNVRRFNET	GHCLSEGS	SDS SLEEPSKDYR	ENNNNNKKDR	SDSDOQMLVA	
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRPLNH	ESDFAVDNVG	NRTLARRRKY	KRMAVDLPQD	
151	ISNKRKMTQP	PEGCRDQDMO	SDRAYQYQEF	TKNKVKRKL	KIIRQGPKIQ	
201	DEGVVLESEZ	INQTNKOKME	CEEQKVSDEL	MSES	DSSLS STDAGLFTND	
251	EGRQGDDEQS	DWIFYEKESGG	ACGITGVVPW	WEXEDPTELD	KNVPDPVFE	
301	ILTGSFPLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGMSSK	NLKRSGGTYT	SMVPIPGFVG	
351	NKRMVHESPO	SHRHQHWESP	GARTEDQEQO	LLADNRAERG	HKKNC	SVRTA
401	SRQTSMRLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLFGPTT	AGFVGENAQF	I	LENNIGNRM
451	LQNMGWTFPS	GLGRDQKGIS	EPIQAMORPK	GLGLGFFLEK	STSATTTPNA	
501	GKSA					

30

(表10B)

【0257】

【表19】

# HLA パワポ4ドモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A24
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	9
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力パワポ4ドモチーフ配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	496
スコア付け出力表に戻って報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表11A)

【0258】

【表20】

スコア付けの結果			
ランク	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(この部分配列を含む分子の平均の解離時間の予測)
1	316	GFQARLSRL	30.000
2	480	KCLGLGFPL	14.400
3	198	KIQDEGVVL	14.400
4	373	RTEHDQHQ	12.000
5	182	KNKVKRRL	8.800
6	139	KVKRMVAVL	8.000
7	263	FYKESGGA	7.500
8	78	DYRENHNN	7.200
9	300	SILTGSFPL	6.000
10	474	QAMQRFKGL	6.000
11	116	RPLMHESDF	6.000
12	110	NNVRGKRPL	6.000
13	231	MSESDSSL	6.000
14	434	VGENAQFPL	6.000
15	64	LSEGSDDL	6.000
16	443	ENNIGNRML	6.000
17	4	LVHDLVSL	5.760
18	29	HSRSTSCPL	5.600
19	56	HPWETGHCL	4.800
20	90	HSDDQML	4.800
21	478	RPKGLGLGF	4.800
22	476	MQRPKGLGL	4.800
23	400	ASRQTSML	4.000
24	454	MGWTFGSGL	4.000
25	238	SLSSTDAGL	4.000
26	403	QISMHLGSL	4.000
27	191	KIIRQGPKI	3.300
28	349	VGNKRMVHF	3.000
29	15	SSEQARGGF	3.000
30	143	HAVOLFQDI	2.592

10

20

同調した使用者の1074ド配列  
(長さ=504残基)

1	MELVHDLVS	ALESSEOR	GGFAETGHS	RSISCPKRLQ	ARKRRGKRR
51	SYNVRHPWET	GHCLSESDS	SLEEPSKDYR	ENHNNKDKH	SDSDQMLVA
101	KRPFSSNLNN	NVRGKRPLWH	ESDFAVONVG	NATLARRRKY	KRMVAVLPO
151	ISNKRMTQF	PEGCAQDMD	SDRAYQYQEF	TKNKVKRRL	KIIRQGPKI
201	DEGVVLESZE	TNQTNRKHE	CEEQKVSDEL	MSESDSSL	STDAGLFTND
251	EGRQGDDEQS	DWYKESGG	ACGITGVVPH	WEKOPTELD	KNVDPVFES
301	ILTGSFPLMS	HPSRRGFOAR	LSRLHGMSSK	NIKSGGTYT	SHVPIPGFVG
351	NKRMVHFSPD	SHHHRNFSP	CARTEHDQHQ	LLRDNRAERG	HKKNCVVRTA
401	SRQTSNHLGS	LCTGDIKRR	KAAPLPGPTT	AGFVGENAQP	IENNIGNRM
451	LQNMWTFGS	GLGRDGGIS	EFIQAMQRPK	GLGLGFPLEK	STSATTTPNA
501	CKSA				

30

(表11B)

【0259】

【表21】

## HLA パロチドモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	A24
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	10
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力パロチド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	495
スコア付け出力表に戻って報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表12A)

【0260】

【表22】

スコア付けの結果

ランク	開始位置	部分配列残基の表	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	297	VFESiLIGSF	18.000
2	373	RTEHqQHQLL	14.400
3	176	QYQELTRNKV	11.880
4	174	AVQYqEFTKN	9.900
5	432	GFVGeNAQPI	9.000
6	31	SYNVhHPWET	8.250
7	402	RQTSmHLGSL	8.000
8	315	RGFOeRLSRL	8.000
9	263	FYEKeSGGAC	7.500
10	3	ELVHdLVSAL	7.200
11	280	WNEKeDPTeL	6.600
12	237	SSLSsTDAGL	6.000
13	299	ESILcGSFPL	6.000
14	475	AMQRpKELGL	6.000
15	109	NNNVrGKRPL	6.000
16	230	LMSEsDSSSL	4.800
17	293	VPDFvVFESIL	4.800
18	433	FVGErAQFIL	4.800
19	63	CLSEqSDSSL	4.800
20	125	AVDNwGNRTL	4.000
21	99	VAKRrFSSML	4.000
22	473	IQAMqRPRGL	4.000
23	453	NMGWcFGSGL	4.000
24	399	TASRqTSMHL	4.000
25	292	NVPDpVFESI	3.024
26	142	RNAVdLPQDI	2.880
27	437	NAQPILENNI	2.592
28	254	QGDeqQDWF	2.400
29	14	ESSEqARGGF	2.400
30	323	RLRCmSSKNI	2.000

10

20

同調した使用者の1744ド配列  
(長さ=504残基)

1	MEELVHDLVS	ALZESSEQAR	GGFAETGDAS	RSISCPKLRQ	ARRRGRKRR
51	SYNVHHPWET	GHCLSEGGDS	SLEEPSKDYR	ENRNNKNDH	SDSDQMLVA
101	KRRPSSHLNN	NVRGKRYLNI	ESDFAVDNG	NATLRRRKV	KRMVDLPQD
151	ISNKRTMTQP	PEGCRDQDM	SDRAYQYQEF	TKNKVKRKL	KIIRGPFKI
201	DEGVVLESEE	TNQTNKORME	CEEQVSDLE	MSESDDSSLS	STDAGLFTND
251	EGRQGDDEQS	DWfyEKESGG	ACGITGVVFW	WEKEOPTELD	KNVPDPVFES
301	LLTGSFFPLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGSSK	NIKKSGGTP	SMVPIPGFVG
351	NKRNVHFSFD	SHHHDHWFSP	GARTENDQHQ	LLRONRAERG	HKNKCSVRTA
401	SRQTSMHLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGIT	AGFVGENAQ	ILENNIGNRM
451	LQNMGWTFGS	GLGRDGKGIS	EPIQAMQRPK	GLGLGFPLPK	STSATTTFNA
501	GKSA				

30

(表12B)

【0261】

【表23】

## HLA パワポチドモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	B7
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	9
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力パワポチド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	496
スコア付出力表に戻って報告されたトピックのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表13A)

【0262】

【表24】

スコア付けの結果			
ランク	開始位置	部分配列残基の長さ	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解凍時間の予測)
1	400	ASRQTSMHL	120.000
2	56	HPWETGCHL	80.000
3	476	MQRPKGLGL	40.000
4	29	HSRSISCFPL	40.000
5	474	QANQRPKGL	36.000
6	4	LVHDLVSAL	20.000
7	139	KVKRMAVDL	20.000
8	100	AKRRPSSNL	18.000
9	423	APLPGPTTA	6.000
10	454	MGWTPGSGL	6.000
11	396	SVRTASRQT	5.000
12	196	GPRIQDEGV	4.000
13	182	KNKVKRKL	4.000
14	110	NNVRGKRPL	4.000
15	198	KIQDEGVVL	4.000
16	403	QTSMLGSL	4.000
17	238	SLSSTDAGL	4.000
18	285	DPTELDKNV	4.000
19	300	SILTGSFPL	4.000
20	347	GPVGNKRMV	4.000
21	480	KGLGUGFPL	4.000
22	417	KRRRQAFL	4.000
23	443	ENNIGNRML	4.000
24	313	SRRGFQARL	4.000
25	18	QARGGTAET	3.000
26	293	VDPVFLESI	2.400
27	295	DPVFESILT	2.000
28	311	HPSRAGFOA	2.000
29	433	FVGENAQPI	2.000
30	486	FPLPKSTSA	2.000

10

20

同調した使用者の1704ド配列  
(長さ=504残基)

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS	RSISCFLKRQ	ARKRGRKRK
51	SYNVHFWET	GHCLSEGSDS	SLEEPSKDYR	ENHNMMKDKH	SDSDQMLVA
101	KRRPSSLNH	NVRGKRPLWH	ESDFAVDNVG	NRTLRRRKRK	KRMAVDLPQD
151	ISNKRITQF	PEGCRDQDMD	SORAYQYQEF	TKNKVKRKL	KIIRQGPQIQ
201	DEGVVLESE	INQTNKDKME	CEEQRVSDLE	MSESDSSSL	STDAGLITND
251	EGRQCDEQS	DWFYEKESGG	ACGITGVVFN	WEKEDPTELD	KNVPOPVFES
301	ILTGSFPLMS	HPSRAGFOAR	LSRLHGMSK	NIKKSGGPT	SMVPIGPFVG
351	NKRNVHFSFD	SHHHDHWFSP	GARTLHQHQ	LLRDNRAERG	HKKNCVVRTA
401	SRQTSMLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGPTT	AGFVGENAQF	IENNIGNRNM
451	LQNHGWTGGS	GLGRDGGKIS	EPIQANRQEK	GLGLGFPLPK	SFSATTIPNA
501	GKSA				

30

(表13B)

【0263】

【表25】

## HLA ハフチドモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	B7
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	10
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフチド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	495
スコア付け出力表に戻って報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表14A)

【0264】

【表26】

スコア付けの結果

ランク	開始位置	部分配列残基の表	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	318	QARLsRLNGM	30.000
2	293	VPDvVFESIL	24.000
3	343	IFCPvGNRRM	20.000
4	433	FVGENAQPTL	20.000
5	125	AVDNvGNRTL	18.000
6	99	VAKRvPSSNL	18.000
7	399	TASRqTSMHL	12.000
8	475	AMQRpKGLGL	12.000
9	453	NMGWtPGSGL	6.000
10	230	LMSEsDSSSL	4.000
11	473	IQAMqRFGKL	4.000
12	312	FSRRgFQARL	4.000
13	423	LPGPtTAGFV	4.000
14	103	RFSSnLNNNV	4.000
15	109	NNVrGKRPL	4.000
16	63	CLSEgSDSSSL	4.000
17	315	RCFQqRLSRL	4.000
18	237	SSLSsTDAGL	4.000
19	416	IKRRrKAAPL	4.000
20	196	GPKIqDEGVV	4.000
21	299	ESILtGSFFL	4.000
22	402	RQTSmHLGSL	4.000
23	3	ELVhdLVSAL	4.000
24	147	LPQDiSNKRT	2.000
25	116	RPLWheSDFa	2.000
26	278	VPMwvKEDPT	2.000
27	488	LPKStSATT	2.000
28	292	NVPDpVFESI	2.000
29	45	RGKRrSYNV	2.000
30	486	FPLEkSTSAT	2.000

10

20

同調した使用者の1704ド配列  
(長さ=504残基)

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGQHS	RSISCFLEKQ	ARKRRGRKRR
51	SYNVHFWET	GHCLSEGSOS	SLEEPSKDYR	ENHNHKKKH	SOSDQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRFLNH	ESDFAVDVG	NRTLRARXV	KMAVDLPQD
151	ISNKRTMTQP	PEGCRDQMD	SDRAYOYQEF	TKNKVKRKL	KIIRQGPKIQ
201	DEGVVLESEE	TNQTNRKME	CEEQRVSDLE	MSESOSSELS	STQAGLFTND
251	EGRQGDDEQS	DWPKESGG	ACGITGVVPM	WEKEDTELD	KNVDFVPFES
301	ILTGSFFLMS	HPSRRGTFAR	LSRLHGMSK	NIKKSGGTPT	SMVPLGPPVG
351	NKRMVHESPD	SHHNDHWFSF	GARTEHDQHQ	LLRDNRAERG	HKNKCSVRTA
401	SRQTSMLGSS	LCTGDIKRRR	KAAPLFGFTT	AGFVGENAQP	ILENNIGNRM
451	LQNMGWTEGS	GLGRDGGKIS	EPIQAMQRFK	GLGLGFPLPK	STSATTTPNA
501	GKSA				

30

(表14B)

【0265】

【表27】

## HLA ハフチドモチーフの検索結果

使用者のパラメータおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	B*3501
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	9
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフチド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	496
スコア付け出力表に戻って報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表15A)

【0266】

【表28】

スコア付けの結果			
ランク	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(この部分配列を含む分子の半分の解離時間の予測)
1	478	RPKGLGLGF	120.000
2	56	HPWETGCL	40.000
3	116	RPLMHESDF	40.000
4	425	LPGFTTAGF	20.000
5	334	KSGGTFTSH	20.000
6	400	ASRQTSML	15.000
7	29	MSRSISCEPL	15.000
8	196	GPNIQDEGV	12.000
9	285	DPTELDKNV	8.000
10	239	LSSTDAGLF	7.500
11	139	KVKRMVDL	6.000
12	223	EQKVSDELM	6.000
13	488	LPKTSATT	6.000
14	198	KIQDEGVVL	6.000
15	182	KNKVKRKL	6.000
16	309	MSRPSRRGF	5.000
17	360	DSHHDRWF	5.000
18	50	RSYNVHHPW	5.000
19	103	RPSSNLNN	4.000
20	468	GISEPIQAM	4.000
21	347	GPVGNKRMV	4.000
22	398	RTASRQTSM	4.000
23	295	DPVFESILF	3.000
24	476	WQRPGLGL	3.000
25	74	EPSKOYREN	3.000
26	474	QAMCRPKGL	3.000
27	143	MAVDLPQDI	2.400
28	184	KVKRKLKI	2.400
29	293	VPDFVESI	2.400
30	90	MSDSDQML	2.250

10

20

同調した使用者の10704ド配列  
(長さ=504残基)

```

1 MEELVHDLVS ALEESSEQAR GFAETGDRS RSISCPKLRQ ARKRGRKRKRR
51 SYNVHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNHNKKDH SDSDDQMLVA
101 KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRKRKV KRMAVDLPQD
151 ISNRTMTQP PEGCRDQOMD SORAYQYQEF TKNKVKRKL KIIRQGFNIK
201 DEGVVLESEE TNQTNKDRME CEEQKVSDEL MSESDDSSLS STDAGLFTND
251 EGRQGDDEQS DWFYKESCG ACGITGVVPM WEKEDPTELD KNVDFVFES
301 ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLGMSK NIKKSGCTPT SMVPIPGFVG
351 NKRNVHFPD SHHHDRWFSP GAATEHDQRQ LLRDNNAERG HKNKCSVRTA
401 SRQTSMLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGFTT AGFVGENAQ ILENNIGNRM
451 LQNMGWTPGS GLGRDGGKIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLK SISATTTFNA
501 GKSA

```

30

(表15B)

【0267】

【表29】

## HLA ハフチドモチーフの検索結果

使用者のパラメーターおよびスコア付け情報	
結果の数を制限するために選択された方法	明確な数
要求した結果の数	30
選択されたHLA分子の型	B*3501
スコア付けされる部分配列について選択された長さ	10
入力配列について選択されたエコーモード	Y
エコー形式	番号付きの線
使用者の入力ハフチド配列の長さ	504
計算された部分配列のスコアの数	495
スコア付け出力表に基づいて報告されたトップのスコア付けの部分配列の数	30

10

(表16A)

【0268】

【表30】

スコア付けの結果			
ラング	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(部分配列を含む分子の 半分の解鎖時間の予測)
1	343	IPGPvGNKRM	40.000
2	70	SSLEePSKDY	20.000
3	196	GPKIqDEGVV	18.000
4	318	QARLsRLRCM	18.000
5	14	ESSEqARGGF	10.000
6	99	VAKRrPSSNL	9.000
7	103	RPSSnLWNV	8.000
8	116	RPLWhESDEA	6.000
9	488	LPKStSATT	6.000
10	293	VDFvFEsIL	6.000
11	299	ESILtGSFPL	5.000
12	237	SSLSsTDAGL	5.000
13	467	KGISsPIQAM	4.000
14	56	HPNtGHCLS	4.000
15	147	LPQoLSNKRT	4.000
16	425	LPGLTAGFV	4.000
17	358	SPDSHHDHW	3.000
18	230	LMSEsDSSSL	3.000
19	253	RQGDdEQSDW	3.000
20	399	TASRqTSMRL	3.000
21	184	KVKRrKLKII	2.400
22	445	NIGNrMLQNM	2.000
23	402	RQTSmHLGSL	2.000
24	300	SILTqSFPLM	2.000
25	334	KSGGtPTSMV	2.000
26	433	FVGENAQFIL	2.000
27	210	ETNQtNKDKN	2.000
28	63	CLSEqSDSSL	2.000
29	486	FPLPKtSAT	2.000
30	315	RGFQaRLSRL	2.000

10

20

同調した使用者の10704ド配列  
(長さ=504残基)

1	MEELVHDLV	ALESSEQAR	CGFAETGDRS	RSISCPKIKQ	ARKRRGRKRR
51	SYNVHPWET	GHCLSEGSDS	SLEEPSKDYR	ENHNNNKXDB	SDSDQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGRPLWH	ESDFAVDNVG	NRTLRRRRRV	KHMAVDLPQD
151	ISNKATMTQP	PEGCRDQMD	SDRAYQYQEF	TKNKVKRKL	KIIAQGPKIQ
201	DEGVVLESEE	TNQTNKQME	CEEOKVSDLE	MSESDSSLS	STNAGLFTND
251	EGRQGDDEQS	DWFYEKESGG	ACGTTGVVFN	WEKEDPTELD	KNVDPDVEIS
301	ILTGSFPLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGMSK	NIRKSGGTF	SMVPIPGFVG
351	NKRHVHFSFD	SHHHDHWFS	GARTEHDQHQ	LLRDNRARAG	HKKNCVRIA
401	SRQTSMLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGPTT	AGFVGENAQF	ILENNIGNRM
451	LQNMGWTPGS	GLGRDGRGIS	EPIQAMORPK	GLGLGEFLPK	STSATTTFNA
501	GKSA				

30

(表16B)

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、長さ約425ヌクレオチドの、84P2A9の抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション(suppression subtractive hybridization)(SSH)DNA配列(配列番号3)を示す。この配列は、種々のアンドロゲン依存性LAPC異種移植片およびアンドロゲン非依存性LAPC異種移植片由来のcDNAの比較において同定された。

40

【図2】 図2は、84P2A9のヌクレオチド配列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号2)を示す。下記の実施例2を参照のこと。開始ATG(AACATGG)(配列番号4)の周辺の配列は、Kozak配列(Aは-3位、そしてGは+1位)を示す。Kozak配列の開始メチオニンを太字で示し、核局在シグナルを四角で囲んだ。

【図3】 図3Aおよび図3Bは、84P2A9(配列番号2)とKIAA1552(配列番号5)およびLUCA15(配列番号6)のアミノ酸配列とのアラインメントを示す。図3Aは、84P2A9タンパク質配列(下線)が、ヒト脳タンパク質KIAA115

50

2 に対するいくらかの相同性を有することを示す (337 アミノ酸領域にわたり 39.5% 同一性、スコア: 407.0; ギャップ頻度: 5.9%)。図 3 B は、84P2A9 タンパク質配列 (下線) が、LUC A15 癌抑制遺伝子タンパク質の一部に対して相同なドメインを含むことを示す (42 アミノ酸領域にわたり 64.3% 同一性、スコア: 138.0; ギャップ頻度: 0.0%)。

【図 4】 図 4 A ~ 4 C は、種々の正常ヒト組織 (プローブとして 84P2A9 SSH フラグメントを使用) および LAPC 異種移植片における、84P2A9 の限定された発現のノーザンプロット分析を示す。複数の組織の 2 つのノーザンプロット (Clontech) (図 4 A および 4 B) ならびに異種移植片ノーザンプロット (図 4 C) は、84P2A9 SSH フラグメントで検査した。図 4 A のレーン 1 ~ 8 は、それぞれ心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および膵臓由来の mRNA からなる。図 4 B のレーン 1 ~ 8 は、それぞれ脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸および白血球由来の総 RNA からなる。図 4 C のレーン 1 ~ 5 は、それぞれ前立腺、LAPC-4 AD、LAPC-4 AI、LAPC-9 AD、LAPC-9 AI 由来の mRNA からなる。キロベース (kb) でのサイズ標準を、脇に示す。各レーンは、正常組織について 2 μg の mRNA を、そして異種移植片組織について 10 μg の総 RNA を含む。この結果は、84P2A9 の精巣および前立腺ならびに LAPC 異種移植片における発現を示す。

【図 5】 図 5 は、前立腺および複数の癌細胞株における 84P2A9 発現のノーザンプロット分析を示す。レーン 1 ~ 56 は、それぞれ LAPC-4 AD、LAPC-4 AI、LAPC-9 AD、LAPC-9 AI、LNCaP、PC-3、DU145、TsuPr1、LAPC-4 CL、HT1197、SCaBER、UM-UC-3、TC SUP、J82、5637、239T、RD-ES、PANC-1、BxPC-3、HPAC、Capan-1、SK-CO-1、CaCo-2、LoVo、T84、Colo-205、KCL 22、PFSK-1、T98G、SK-ES-1、HOS、U2-OS、RD-ES、CALU-1、A427、NCI-H82、NCI-H146、769-P、A498、CAKI-1、SW839、BT20、CAMA-1、DU4475、MCF-7、MDA-MB-435s、NTERRA-2、NCCIT、TERA-1、TERA-2、A431、HeLa、OV-1063、PA-1、SW626 および CAOV-3 における発現を示す。高レベルの 84P2A9 発現は、脳 (PFSK-1、T98G)、骨 (HOS、U2-OS)、肺 (CALU-1、NCI-H82、NCI-H146)、および腎臓 (769-P、A498、CAKI-1、SW839) 癌細胞株において検出された。中程度の発現レベルは、膵臓 (PANC-1、BxPC-3、HPAC、CAPAN-1)、結腸 (SK-CO-1、CACO-2、LOVO、COLO-205)、骨 (SK-ES-1、RD-ES)、乳房 (MCF-7、MDA-MB-435s) および精巣癌 (NCCIT) 細胞株のいくつかにおいて検出された。

【図 6】 図 6 は、前立腺癌患者サンプルにおける 84P2A9 発現のノーザンプロット分析を示す。前立腺癌患者サンプルは、前立腺組織の正常な部分および腫瘍部分の両方における 84P2A9 の発現を示す。レーン 1 ~ 7 は、それぞれ正常前立腺、患者 1 の正常隣接組織、患者 1 のグリーソン 9 腫瘍、患者 2 の正常隣接組織、患者 2 のグリーソン 7 腫瘍、患者 3 のグリーソン 7 腫瘍を示す。これらの結果は、84P2A9 が、前立腺癌において、そして潜在的には他の癌においてアップレギュレートされる、まさに精巣特異的遺伝子であるという証拠を提供する。従って、MAGE 抗原と同様に、84P2A9 は癌の精巣の抗原として適当であり得る (Van den Eynde および Boon、Int J Clin Lab Res. 27: 81-86、1997)。

【図 7】 図 7 は、腎臓癌患者から得られた腎臓癌 (T) およびその隣接正常組織 (N) から単離された RNA を示す。レーン 1 ~ 15 は、それぞれ 769-P - クリアな細胞型; A498 - クリアな細胞型; SW839 - クリアな細胞型; 正常腎臓; 患者 1、N; 患者 1、腫瘍; 患者 2、N; 患者 2、腫瘍、クリアな細胞型、分類 III; 患者 3、N; 患者 3、腫瘍、クリアな細胞型、分類 II/IV; 患者 4、N; 患者 4、腫瘍、クリアな細胞型、分類 II/IV; 患者 5、N; 患者 5、腫瘍、クリアな細胞型、分類 II; および

10

20

30

40

50

患者6、腫瘍、胸部への転移、を示す(N = 正常な隣接組織およびCL = 細胞株)。ノーザン分析を、各サンプルについて10 μgの総RNAを使用して実施した。84P2A9の発現は、試験した6つの腫瘍サンプル全て、ならびに3つの腎臓細胞株769-P、A498およびSW839において観察された。

【図8】 図8は、結腸癌患者から得られた結腸癌組織(T)およびその隣接する正常組織(N)から単離されたRNAを示す。レーン1~11は、Colo205; LoVo; T84; Caco-2; 患者1、N; 患者1、腫瘍分類2、T3N1Mx(リンパ節転移について陽性); 患者2、N; 患者2、腫瘍、分類1、T2N0Mx; 患者3、N; 患者3、腫瘍、分類1、T2N1Mx(リンパ節転移について陽性); および患者4、腫瘍、分類2、T3 N1 MX(リンパ節転移について陽性)をそれぞれ示す(N = 正常な隣接組織およびCL = 細胞株)。ノーザン分析を、各サンプルについて総RNAの10 μgを使用して実施した。84P2A9の発現は、試験された4つの腫瘍サンプル全てにおいて、ならびに4つの結腸癌細胞株Colo205、LoVo、T84およびCaco-2において観察された。

10

【図9】 図9は、アッセイされた84P2A9の発現を、ヒト癌(T)およびそのそれぞれに対応する正常組織(N)のパネルにおけるRNAドットプロットで示す。癌細胞株は、左から右に、HeLa(子宮頸癌)、Daudi(パーキットリンパ腫)、K562(CML)、HL-60(PML)、G361(黒色腫)、A549(肺癌)、MOLT-4(リンパ芽球性白血病)、SW480(結腸直腸癌)およびRaji(パーキットリンパ腫)である。84P2A9発現は、腎臓癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、胃癌、結腸癌、子宮頸癌および直腸癌において観察された。84P2A9はまた、癌細胞株、特にMOLT-4リンパ芽球性白血病細胞株およびA549肺癌腫細胞株のパネルにおいて高度に発現することが見出された。発現は、(疾患組織から単離した)正常な隣接組織において検出されたが、健康なドナーから単離した正常な組織においては検出されなかった。この発現は、これらの組織が完全には正常でないこと、そして84P2A9が腫瘍の初期段階において発現され得ることを示し得る。

20

【図10】 図10は、膀胱癌患者の検体における84P2A9の発現を示す。84P2A9の発現は、試験された膀胱癌患者の4つの検体において、ならびに3つの膀胱細胞株(CL)、UM-UC-3(レーン1)、J82(レーン2)およびSCABER(レーン3)において観察された。RNAは、6人の膀胱癌患者(P)から得られた正常な膀胱(Nb)、膀胱腫瘍(T)およびその隣接組織(N)から単離された。P1由来の腫瘍は、遷移性癌腫、分類4; P2は、浸襲性扁平上皮癌腫; P3は、遷移性癌腫、分類3; P4は、非浸襲性乳頭状癌腫、分類1/3; P5は、乳頭状癌腫、分類3/3; およびP6は、遷移性癌腫、分類3/2である。ノーザンプロット分析を、各サンプルについて10 μgの総RNAを使用して実施した。

30

【図11】 図11は、293T細胞における84P2A9タンパク質の発現を示す。293T細胞を、pCDNA3.1 V5-HISエピトープタグ化84P2A9プラスミドまたは空のコントロールベクターのいずれかで、一過的にトランスフェクトし、そして2日後に回収した。細胞を、SDS-PAGEサンプル緩衝液中で溶解し、そしてその溶解産物を10~20%のSDS-PAGEゲル上で分離し、次いでニトロセルロースに移した。このプロットを、Tris緩衝化生理食塩水(TBS) + 2%無脂肪乳中でブロッキングし、次いでマウス抗V5モノクローナル抗体(Invitrogen)のTBS + 0.15% Tween-20 + 1%乳での1:3, 000希釈で探查した。このプロットを洗浄し、次いで抗マウスIgG-HRP結合体二次抗体の1:4, 000希釈と共にインキュベートした。洗浄後、抗V5エピトープ免疫反応性バンドを、増強された化学発光によって発光させ、そしてオートラジオグラフィフィルムに曝露することによって可視化した。矢印によって示されるのは、トランスフェクトした細胞におけるエピトープタグ化84P2A9タンパク質の発現に対応する、約87Kdの特異的抗V5免疫反応性バンドである。

40



FIG. 6

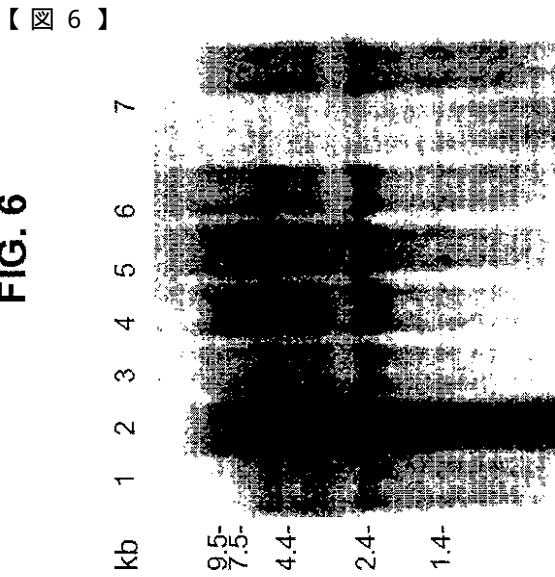


FIG. 4C

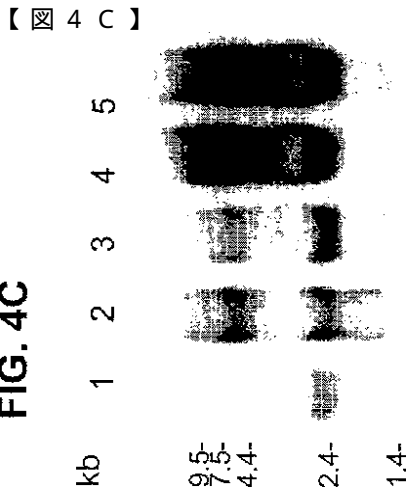


FIG. 4B

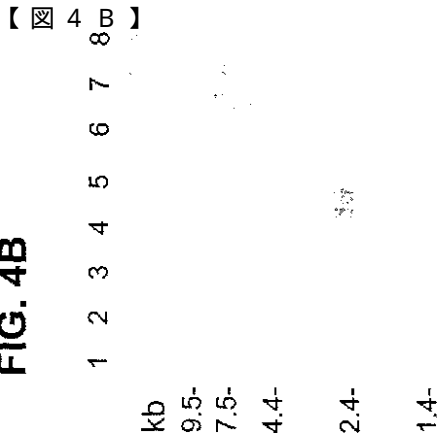
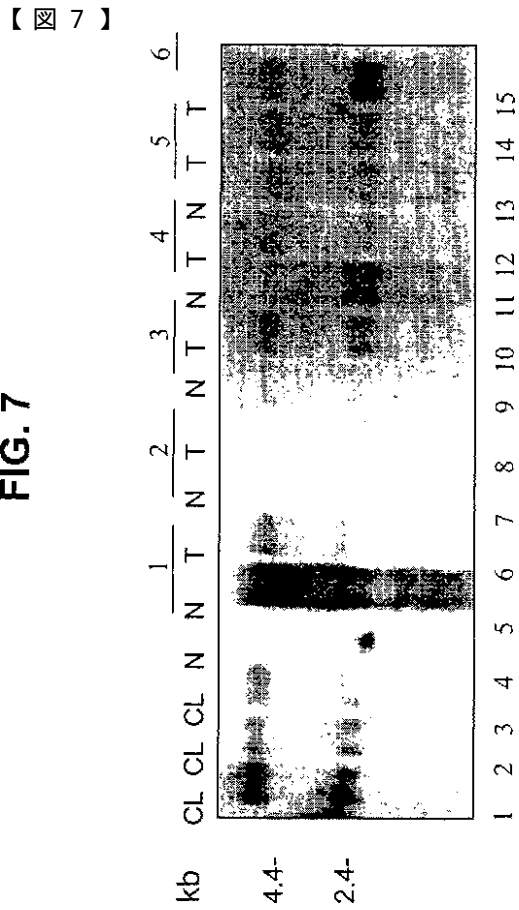
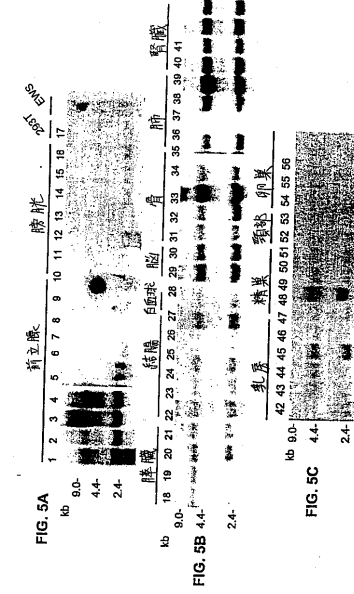


FIG. 7



【 図 7 】

FIG. 5A



【 図 5 】

FIG. 5B

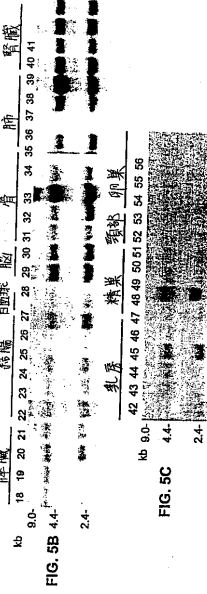
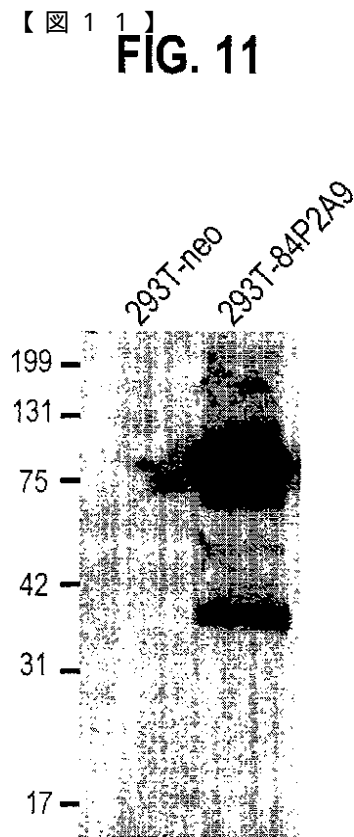
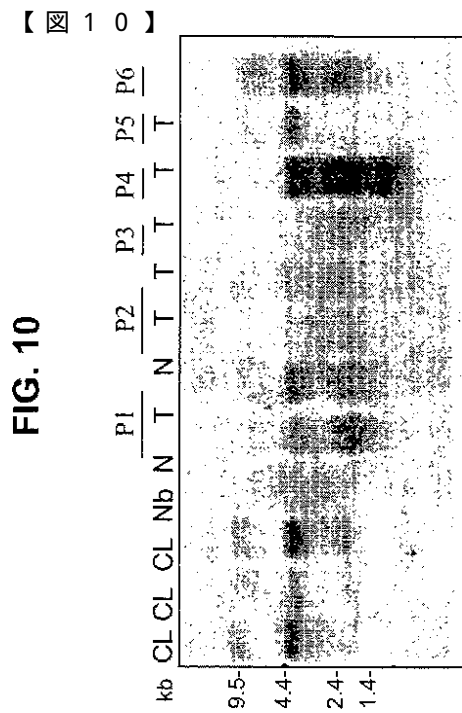
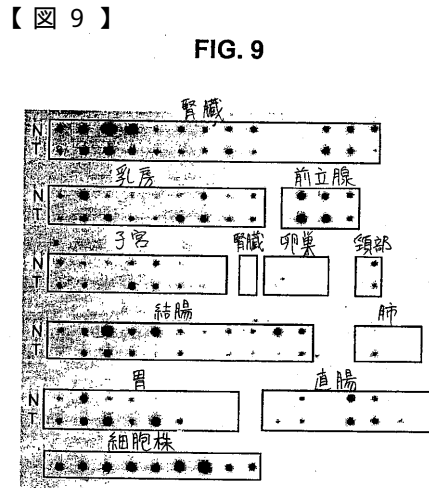
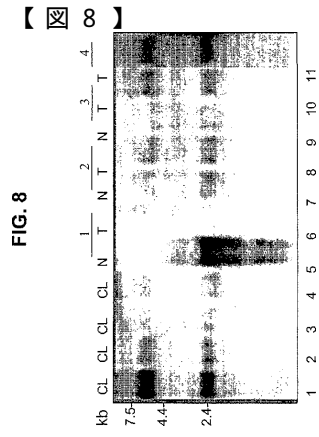


FIG. 5C





## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>		C 1 2 N 1/21	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>		C 1 2 N 5/00	B
<b>C 1 2 N 15/02 (2006.01)</b>		C 1 2 N 15/00	C
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>		C 1 2 P 21/02	C
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>		C 1 2 P 21/08	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>		C 1 2 Q 1/68	A
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53	D
<b>G 0 1 N 33/566 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53	M
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/566	
		G 0 1 N 33/574	A

- (72)発明者 アファー, ダニエル イー. エイチ.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005, ブリスベン, ビジタシオン アベニュー 4  
35
- (72)発明者 チャリティド, ピア エム.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91436, エンシノ, モリソン ストリート 1574  
5
- (72)発明者 レビン, エラナ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 99034, ロス アンジェルス, ローズ アベニュー  
ナンバー9 10874
- (72)発明者 ミッチェル, スティーブ チャップレル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90405, サンタ モニカ, 4ティーエイチ ストリート  
1/2-2417
- (72)発明者 ヒューバート, レーン エス.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90026, ロス アンジェルス, ノース オクシデンタル  
ブールバード 1644

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 国際公開第99/042579 (WO, A1)  
J Biol Chem 273(28) p.17618-17625 (1998)  
Meth Enzymol 303 p.19-44 (1999)  
DATABASE EMBL[online] Acc.No.AA908061

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00-15/90  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
SwissProt/PIR/Geneseq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	84P2A9 : 在前列腺癌中高度表达的前列腺和睾丸特异性蛋白质		
公开(公告)号	<a href="#">JP3946044B2</a>	公开(公告)日	2007-07-18
申请号	JP2001554420	申请日	2001-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	艾更斯司股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Agensys公司		
当前申请(专利权)人(译)	Agensys公司		
[标]发明人	ジャコボビッツアヤ アフアーダニエルイーエイチ チャリテイドピアエム レビンエラナ ミッチェルステイーブチャッペル ヒューバートレーンエス		
发明人	ジャコボビッツ, アヤ アフアー, ダニエル イー. エイチ. チャリテイド, ピア エム. レビン, エラナ ミッチェル, ステイーブ チャッペル ヒューバート, レーン エス.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K47/48 A61K48/00 A61P35/00 C07K19/00 C12N15 /12		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61K39/00 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17 /00 A61P17/02 A61P19/00 C07K14/47 Y02A50/466		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.B C12N15/00.C C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/178560 2000-01-26 US		
其他公开文献	JP2003520605A5 JP2003520605A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

描述了一种新基因 ( 命名为84P2A9 ) 及其编码的蛋白质。尽管84P2A9在正常成人组织中表现出前列腺和睾丸的特异性表达, 但其异常表达多种癌症, 包括前列腺癌, 睾丸癌, 肾癌, 脑癌, 骨癌, 皮肤癌, 卵巢癌, 乳腺癌, 胰腺癌, 结肠癌, 淋巴细胞癌和肺癌。因此, 84P2A9为癌症提供诊断和/或治疗靶点, 并且84P2A9基因或片段片段或其编码的蛋白质或其片段用于引发免疫应答。

ランク	開始位置	部分配列残基の表示	スコア(半分の解離時間) 予測
1	300	SILTGSFPL (SEQ ID NO: 19)	63.04
2	449	RMLQNMGWT (SEQ ID NO: 20)	33.75
3	4	LVHDLVSAL (SEQ ID NO: 21)	29.97
4	238	SLSSTDAGL (SEQ ID NO: 22)	21.36
5	198	KIQDEGVVL (SEQ ID NO: 23)	17.28
6	433	FVGENAQPI (SEQ ID NO: 24)	17.22
7	301	ILTGSFPLM (SEQ ID NO: 25)	16.05
8	218	KMECEEQKV (SEQ ID NO: 26)	11.25
9	480	KGLGLGFPL (SEQ ID NO: 27)	10.47
10	461	GLGRDCKGI (SEQ ID NO: 28)	10.43