

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4555681号  
(P4555681)

(45) 発行日 平成22年10月6日(2010.10.6)

(24) 登録日 平成22年7月23日(2010.7.23)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/40 (2006.01)

C O 7 K 16/40

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 C

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 9 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-513330 (P2004-513330)  
 (86) (22) 出願日 平成15年6月12日(2003.6.12)  
 (65) 公表番号 特表2006-513135 (P2006-513135A)  
 (43) 公表日 平成18年4月20日(2006.4.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2003/001772  
 (87) 国際公開番号 W02003/106500  
 (87) 国際公開日 平成15年12月24日(2003.12.24)  
 審査請求日 平成18年5月9日(2006.5.9)  
 (31) 優先権主張番号 02/07212  
 (32) 優先日 平成14年6月12日(2002.6.12)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

微生物の受託番号 CNCM 1-3050

(73) 特許権者 595040744  
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェ  
 ルシュ・シャンティフィク  
 CENTRE NATIONAL DE  
 LA RECHERCHE SCIENT  
 IFIQUE  
 フランス国、75794 パリ・セデック  
 ス 16、リュ・ミシェル・アンジュ 3  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100141357  
 弁理士 鈴木 音哉  
 (74) 代理人 100075225  
 弁理士 篠田 文雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗オーロラ-Aモノクローナル抗体、該抗体を得る方法、並びに癌の診断および処置のための該抗体の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトおよびマウスのオーロラ-Aキナーゼを特異的に認識し、以下の特性：

前記ヒトまたはマウスのオーロラ-Aタンパク質を含有するメンブレン上に固定することができる、

免疫沈降により前記ヒトおよびマウスのオーロラ-Aタンパク質の検出、適切な場合には精製を可能にする、

前記オーロラ-Aタンパク質が分泌される生物組織の染色を可能にする、および

前記ヒトおよびマウスのオーロラ-Aタンパク質の酵素活性を阻害しない、  
 を有する抗オーロラ-Aモノクローナル抗体であって、

該モノクローナル抗体が、以下の工程：

- ゲノム中にオーロラ-AをコードするヒトcDNAが挿入された細菌発現ベクターにより形質転換されたE.coli細菌により産生された組み換えオーロラ-Aタンパク質キナーゼを15日間にわたってマウスに5回注射し、前記マウスを犠牲死させ、これらのマウスの脾臓細胞と培養において不死化されたハムスター細胞とを融合させてハイブリドーマを得る工程、

- 前の工程で前記マウスの免疫感作に用いられた前記組み換えタンパク質を免疫沈降することができる抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、この第1のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養ヒトHeLa細胞の抽出物由来の内因性オーロラ-Aタンパク質を免疫沈降する

ことができる抗体を産生する、前の工程で回収された前記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第2のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養ヒト細胞の中心体および紡錘体極を間接免疫蛍光法で認識することができる抗体を産生する、前の工程で回収された前記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第3のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養マウス細胞の抽出物由来のマウスの内因性オーロラ - Aタンパク質を免疫沈降することができる抗体を産生する、前の工程で回収された前記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第4のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養マウス細胞の中心体および紡錘体極を間接免疫蛍光法で認識することができる抗体を産生する、前の工程で回収した前記ハイブリドーマをスクリーニングする工程、

- 前のスクリーニング工程後に陽性のハイブリドーマをクローニングすることにより回収および精製し、先に定義した特性をすべて有するモノクローナル抗体を産生する工程、により得られる、

パスツール研究所のCollection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) に番号 I - 3 0 5 0 で寄託されているハイブリドーマにより分泌され、35CI抗体とも呼ばれる、前記抗オーロラ - Aモノクローナル抗体。

【請求項2】

ヒトまたは動物での癌のインビトロ診断法を行うための、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

乳癌、胃癌、および結腸直腸癌を含む充実性腫瘍のインビトロ診断法を行うための、請求項2項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

PCNAタンパク質のマーカーを含む細胞増殖マーカーを併用する、請求項2または3に記載の抗体。

【請求項5】

ヒトまたは動物での、請求項3に記載の癌のインビトロ検出法であって、以下の工程：

- 個体から採取した生物試料の存在下に請求項1に記載のモノクローナル抗体を置く工程（該抗体は、適切な場合には固体支持体上に固定される）、

- 前の工程中に前記モノクローナル抗体と前記生物試料中に存在し得る前記オーロラ - Aタンパク質とで形成された複合体中の前記オーロラ - Aタンパク質に結合した前記モノクローナル抗体または前記モノクローナル抗体に結合した前記オーロラ - Aタンパク質のいずれかを認識する、標識化された試薬を用いて、前記生物試料中に存在し得る前記オーロラ - Aタンパク質を検出し、適切な場合には定量化する工程（これは必要な場合には前記固体支持体を適当にリンスした後に行う）、を含むことを特徴とする、前記方法。

【請求項6】

前記標識化された試薬が、標識化された抗体である、請求項5に記載の癌のインビトロ検出方法。

【請求項7】

前記生物試料中の、正常な生理学的値より低いまたは高いオーロラ - Aタンパク質の量の決定が、診断される癌に対してそれぞれ良好なまたは劣悪な予後を示すことを特徴とする、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

以下：

請求項1に記載の抗オーロラ - Aモノクローナル抗体、

適切な場合には、PCNAタンパク質のマーカーを含む細胞増殖マーカー、

を含むことを特徴とする、請求項5または6に記載のインビトロ検出法を行うためのキット。

【請求項9】

前記マーカーが、抗 P C N A 抗体である、請求項 8 に記載のインビトロ検出方法を行うためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の対象は、哺乳動物のオーロラ - A キナーゼに対するモノクローナル抗体、該抗体を得る方法、並びに癌の診断または予後に関連する該抗体の使用および癌処置用の医薬組成物での該抗体の使用である。

【0002】

オーロラ - A タンパク質キナーゼは癌遺伝子であり、ラット - 1 細胞でのその過剰発現は形質転換された表現型の出現を引き起こすのに十分であり、これらの形質転換細胞を免疫不全マウスへ移植することにより腫瘍が現れる (Bischoff ら、1998; Zhou ら、1998)。このキナーゼをコードする遺伝子は、20q13 で染色体 20 上に位置し、多数の腫瘍 (乳癌、大腸癌、胃癌) で頻繁に検出される単位複製配列である。

【0003】

オーロラ - A タンパク質キナーゼの過剰発現は多数の腫瘍で観察されている。興味深いことに、異常な量でのこのキナーゼの存在は、P C N A などの特異的な増殖マーカーで染色されることにより検出される増殖には関連しない。したがって、オーロラ - A は細胞の腫瘍態様の特異的なマーカーである (Tanaka ら、1999; Takahashi ら、2000)。

【0004】

オーロラ - A は、オーロラと呼ばれるタンパク質キナーゼの複遺伝子性のファミリーに属し、このファミリーは、オーロラ - A (先に記載)、オーロラ - B (Prigent ら、1999)、およびオーロラ - C (Bernard ら、1998) の 3 つのメンバーを含む。オーロラ - A だけが真の腫瘍誘発力を有するが、他 2 つのキナーゼもまた、同じ腫瘍で過剰発現することが見出された (Giet および Prigent, 1999)。

【0005】

オーロラ - A をコードする遺伝子の増幅は、これらの腫瘍におけるタンパク質キナーゼの異常に高い活性の存在に関係している。さらに、培養細胞におけるこのキナーゼの異所性過剰発現は、形質転換された表現型を出現させるのに十分であり、免疫不全マウスへ移植されたこれらの細胞により腫瘍の出現が引き起される。

【0006】

オーロラ - A キナーゼの過剰発現は、細胞の癌状態に非常に密接に関連している。オーロラ - A キナーゼのこの過剰発現により、細胞の多倍数性が誘導され、中心体の増幅が引き起こされるが、これら 2 つの事象は例えば乳癌の劣悪な (poor) 予後に先行して起こる。

【0007】

したがって、癌の病理でこのキナーゼの発現を m R N A およびタンパク質のレベルの双方で正確に測定することができることが重要である。

【0008】

今や、オーロラ - A タンパク質キナーゼの発現の測定は優良なモノクローナル抗体の使用に完全に依存している。

【0009】

しかしながら、オーロラ - A タンパク質キナーゼに対する十分に特異的なモノクローナル抗体は今まで得ることができていないし、市販されてもいない。

【0010】

本発明の対象は、実験研究の目的での使用並びに癌の診断、予後、および処置の分野での使用を考えて、十分な特異性及び感応性をもってこのタンパク質と結合する信頼性のある抗オーロラ - A モノクローナル抗体を提供することである。

【0011】

本発明は、ヒトおよびマウスのオーロラ - A キナーゼを特異的に認識し、以下の特性：

10

20

30

40

50

上記ヒトまたはマウスのオーロラ - A タンパク質を含有するメンブレン上に固定することができる、

免疫沈降により上記ヒトおよびマウスのオーロラ - A タンパク質の検出、適切な場合には精製を可能にする、

上記オーロラ - A タンパク質が分泌される生物組織の染色を可能にする、および

上記ヒトおよびマウスのオーロラ - A タンパク質の酵素活性を阻害しない、  
を有する抗オーロラ - A モノクローナル抗体であって、

該モノクローナル抗体が、以下の工程：

- ゲノム中にオーロラ - A をコードするヒト c D N A が挿入された細菌発現ベクターにより形質転換された E.coli 細菌により産生された組み換えオーロラ - A タンパク質キナーゼを 15 日間にわたってマウスに 5 回注射し、上記マウスを犠牲死させ、これらのマウスの脾臓細胞と培養物中で不死化されたハムスター細胞とを融合させてハイブリドーマを得る工程、

10

- 前の工程で上記マウスの免疫感作に用いられた上記組み換えタンパク質を免疫沈降することができる抗体を産生する上記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第 1 のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養ヒト H e L a 細胞の抽出物由来の内因性 (endogenous) オーロラ - A タンパク質を免疫沈降することができる抗体を産生する、前の工程で回収された上記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第 2 のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

20

- 培養ヒト細胞の中心体および紡錘体極を間接免疫蛍光法で認識することができる抗体を産生する、前の工程で回収された上記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第 3 のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養マウス細胞の抽出物由来のマウスの内因性オーロラ - A タンパク質を免疫沈降することができる抗体を産生する、前の工程で回収された上記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第 4 のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養マウス細胞の中心体および紡錘体極を間接免疫蛍光法で認識することができる抗体を産生する、前の工程で回収した上記ハイブリドーマをスクリーニングする工程、

- 前のスクリーニング工程後に陽性のハイブリドーマをクローニングすることにより回収および精製し、先に定義した特性をすべて有するモノクローナル抗体を産生する工程、  
により得られるモノクローナル抗体に関する。

30

#### 【 0 0 1 2 】

したがって、本発明の対象は、より具体的には、35C1 抗体とも呼ばれる先に記載のモノクローナル抗体であり、該抗体は、2003 年 6 月 12 日にパスツール研究所の Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) に番号 I - 3050 として寄託されたハイブリドーマにより分泌される。

#### 【 0 0 1 3 】

本発明の対象はまた、ヒトまたは動物における癌のインビトロ診断法または予後法を行うための、上記定義のモノクローナル抗体の使用、より具体的には先に言及した 35C1 抗体の使用である。

40

#### 【 0 0 1 4 】

本発明の対象は、より具体的には、乳癌、胃癌、および結腸直腸癌などの充実性腫瘍のインビトロ診断法または予後法を行うための上記定義のモノクローナル抗体の使用、より具体的には先に言及した 35C1 抗体の使用である。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明は、P C N A タンパク質のマーカーなどの細胞増殖マーカー (Tanaka ら、1999; Takahashi ら、2000) と、上記定義のモノクローナル抗体の併用、より具体的には先に言及した 35C1 抗体の併用にも関する。

#### 【 0 0 1 6 】

本発明の対象はまた、ヒトまたは動物における先に定義した癌のインビトロ診断法また

50

は予後法であって、以下の工程：

個体から採取した生物学的試料の存在下に先に定義したモノクローナル抗体、より具体的には先に言及した 35C1 抗体を置く工程（該抗体は適切な場合には固体支持体上に固定される）、

前の工程中にモノクローナル抗体と生物試料中に存在し得る上記オーロラ - A タンパク質との間で形成された複合体中の上記オーロラ - A タンパク質に結合した上記モノクローナル抗体または上記モノクローナル抗体に結合した上記オーロラ - A タンパク質のいずれかを認識する有標の試薬、特に有標の抗体を用いて、上記生物学的試料中に存在し得る前記オーロラ - A タンパク質を検出し、適切な場合には定量化する工程（これは必要な場合には上記固体支持体を適当にリンスした後に行う）、

を含むことを特徴とする方法である。

10

【0017】

有利なことに、先に言及した方法に関連し、生物試料の関数として決定される生理学的閾値より低いまたは高いオーロラ - A タンパク質の量の決定は、診断される癌に対してそれぞれ良好なまたは劣悪な予後を示す。

【0018】

本発明の対象はまた、以下：

先に定義した抗オーロラ - A モノクローナル抗体、より具体的には先に言及した 35C1 抗体、

適切な場合には、PCNA タンパク質のマーカー、特に抗 PCNA 抗体などの細胞増殖マーカー、

を含むことを特徴とする先に定義した診断方法を行うためのキットである。

20

【0019】

本発明はまた乳癌、結腸直腸癌、および胃癌などの癌の処置を意図した医薬の調製のための、上記定義のモノクローナル抗体の使用、より具体的には先に言及した 35C1 抗体の使用にも関する。

【0020】

したがって、本発明の対象は、より具体的には、上記定義のモノクローナル抗体、より具体的には先に言及した 35C1 抗体を、薬学的に許容し得るビヒクルと併せて含有する医薬組成物である。

30

【0021】

本発明の対象はまた、オーロラ - A キナーゼ活性の低下を上記抗体を用いて測定する、オーロラ - A キナーゼの阻害剤のスクリーニング方法を行うための上記定義のモノクローナル抗体の使用、より具体的には先に言及した 35C1 抗体の使用である。

【0022】

本発明の対象は、より具体的には、以下：

- 種々の癌（乳癌、結腸癌など）に由来する系などの細胞を、試験された阻害剤により処置する工程、

- 上記定義のモノクローナル抗体、より具体的には先に言及した 35C1 抗体を用いてオーロラ - A タンパク質キナーゼを免疫沈降し、具体的には以下のパラグラフ 3.g) に従った方法によりキナーゼ活性を測定する工程、

を含むことを特徴とするオーロラ - A キナーゼの阻害剤をスクリーニングする方法である。

40

【0023】

本発明はまた、以下の工程：

- ゲノム中にオーロラ - A をコードするヒト cDNA が挿入された細菌発現ベクターにより形質転換された E.coli 細菌により産生された組み換えオーロラ - A タンパク質キナーゼを 15 日間にわたってマウスに 5 回注射し、上記マウスを犠牲死させ、これらのマウスの脾臓細胞と培養において不死化されたハムスター細胞とを融合させてハイブリドーマを得る工程、

50

- 前の工程で上記マウスの免疫感作に用いられた上記組み換えタンパク質を免疫沈降することができる抗体を産生する上記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第1のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養ヒトH e L a細胞の抽出物由来の内因性オーロラ - Aタンパク質を免疫沈降することができる抗体を産生する、前の工程で回収された上記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第2のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養ヒト細胞の中心体および紡錘体極を間接免疫蛍光法で認識することができる抗体を産生する、前の工程で回収された上記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第3のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養マウス細胞の抽出物由来のマウスの内因性オーロラ - Aタンパク質を免疫沈降することができる抗体を産生する、前の工程で回収された上記ハイブリドーマをスクリーニングし、この第4のスクリーニング後に陽性のハイブリドーマを回収する工程、

- 培養マウス細胞の中心体および紡錘体極を間接免疫蛍光法で認識することができる抗体を産生する、前の工程で回収した上記ハイブリドーマをスクリーニングする工程、

- 前のスクリーニング工程後に陽性のハイブリドーマをクローニングすることにより回収および精製し、上記定義の特性をすべて有するモノクローナル抗体を産生する工程、を含むことを特徴とする、上記定義のモノクローナル抗体、より具体的には先に言及した35C1抗体の調製方法に関する。

【0024】

上記定義の35C1モノクローナル抗体の詳細な説明およびそれを得る方法により本発明をさらに例説する。

【0025】

オーロラ - A (配列番号1) をコードするヒトcDNAを細菌発現ベクター (pET29 Novagene) に挿入した。

【0026】

タンパク質キナーゼをBL21 (DE3) pLysS細菌中で産生し、Ni-NTAアガロースカラム (Qiagen) でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

【0027】

次いで、実験室で精製されたタンパク質をマウス (BALB/c) に注射した。

【0028】

15日にわたる5回の注射後、マウスを犠牲死させ、マウスの脾臓細胞と培養において不死化されたハムスターの細胞とを融合させてハイブリドーマを得た。

【0029】

次いで、960の量で得られたハイブリドーマを、ウエスタンブロットを用いて、免疫化に用いられたタンパク質を認識する抗体を産生するそれらの能力につき試験した。

【0030】

次いで、この第1のスクリーニング後の陽性のハイブリドーマを、ウエスタンブロットを用いて、培養ヒトH e L a細胞の抽出物由来の内因性オーロラ - Aタンパク質を認識するそれらの能力につき試験した。

【0031】

次いで、この第2のスクリーニング後の陽性のハイブリドーマを、培養ヒト細胞の中心体および紡錘体極を間接免疫蛍光法で認識することができるそれらの能力につき試験した。

【0032】

次いで、この第3のスクリーニング後の陽性のハイブリドーマを、ウエスタンブロットを用いて、培養マウス細胞の抽出物由来のマウスの内因性オーロラ - Aタンパク質を認識するそれらの能力につき試験した。

【0033】

この第4のスクリーニング後の陽性のハイブリドーマを、培養マウス細胞の中心体および紡錘体極を間接免疫蛍光法で認識するそれらの能力につき試験した。

10

20

30

40

50

## 【0034】

これらのすべての基準に対応するハイブリドーマを保持し、クローニングして純粋なクローンを得た。このクローンを35C1と命名した。

## 【0035】

該35C1は、ヒトおよびマウスのオーロラ - A キナーゼを認識する抗オーロラ - A モノクローナル抗体を分泌する。

## 【0036】

ヒトおよびマウスのオーロラ - A キナーゼを特異的に認識するこの抗オーロラ - A モノクローナル抗体は以下の特性を有する：

該抗体は、ウエスタンブロット（ニトロセルロースまたはナイロンメンブレン上でのタンパク質の間接免疫検出）に用いることができる、

該抗体は、培養細胞中のタンパク質を間接免疫検出により位置を特定することを可能にする、

該抗体は、インビトロでのキナーゼの酵素活性を阻害しない、

該抗体は、無細胞抽出物由来のオーロラ - A キナーゼを免疫沈降により精製することを可能にする、

該抗体は、オーロラ - A のキナーゼ活性を阻害しないので、病理を示す組織から調製されるタンパク質抽出物でのキナーゼ活性をアッセイするのに用いることができる。

## 【0037】

## 1) 組み換えオーロラ - A タンパク質の精製

ヒトオーロラ - A キナーゼをコードするcDNAを、6個の追加のヒスチジン残基を含有する組み換えタンパク質の産生を可能とする細菌発現ベクターpET29（供給者Novagen）中にクローニングした。タンパク質分解酵素が欠失し、かつ、凍結融解後にリゾチームの産生によって自己溶解する（これらの特性はすべてタンパク質の精製を容易にする）E.coli細菌（供給者Promega）のBL21（DE3）pLysS株を用いた。増殖期（OD<sub>600</sub> = 0.6）における細菌中のオーロラ - A - (His)<sub>6</sub> - タンパク質の過剰発現は、1mMのIPTG（イソプロピル - β-D - チオガラクトシド）を添加することにより22℃で4時間にわたって誘導する。次いで、自己溶解特性に加えてリゾチームおよび超音波を用い、4℃で細菌を溶解した。次いで、オーロラ - A - (His)<sub>6</sub> - タンパク質をニッケルカラムNi - NTA - アガロース（供給者Qiagen）でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。Qiagenの指示書に従って、250mMのイミダゾールでタンパク質を溶出した。次いで、精製タンパク質をcentricon YM-10（供給者Millipore）に通過させ、PBS溶液（NaCl 136mM、KCl 26mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM、pH 7.2）中に置いた。タンパク質画分15μgを調製し、凍結乾燥し、4℃で保存した。

## 【0038】

## 2) マウスの免疫感作

50%フロイント完全アジュバント（供給者Sigma）に希釈した組み換えオーロラ - A タンパク質15μgで、腹腔内経路により、BALB/cマウスを免疫感作した。次いで、3週間の間隔をおいて、50%フロイント完全アジュバントに希釈したオーロラ - A タンパク質15μgでマウスに2度注射した。抗オーロラ - A 抗体がマウスの血液中に検出されたとき、該マウスを犠牲死させ、脾臓を取り除いた。ダウンス型のホモジェナイザーにより、懸濁している細胞をこの脾臓から得た。

## 【0039】

これらの脾臓細胞を、マウスミエローマに由来し、かつ、E.C.A.C.Cから得られるSP2/O - Ag14細胞（Shulmanら、1978）と融合した。50%ポリエチレングリコール1500（供給者Roche）中で37℃において90分にわたり、脾臓細胞100×10<sup>6</sup>個とSP2/O - Ag14細胞20×10<sup>6</sup>個との間で融合を行った。次いで、HAT選択培地（供給者Sigma Chemicals）を含有する10個の96ウェルの皿内に細胞を分注した。

## 【 0 0 4 0 】

## 3) ハイブリドーマのスクリーニング

## a) E L I S A

4  $\mu\text{g/ml}$ の組み換えオーロラ - A タンパクを含有する P B S 1 0 0  $\mu\text{l}$ を E l i s a プレート ( 9 6 ウェルプレート ) の各ウェル中に投入し、4 で 3 6 時間インキュベートした。P B S で 2 回洗浄した後、ウェルを 3 % B S A ( ウシ血清アルブミン、供給者Sigma ) を含有する P B S で満たし、該プレートを 4 で一晩インキュベートした。次の日、各々の融合上清 1 0 0  $\mu\text{l}$ を、組み換えオーロラ - A を含有するこれらの 9 6 ウェルプレートに移した。これらのプレートを周囲温度で 2 時間インキュベートした。P B S / B S A で 2 回洗浄した後、ホスファターゼ結合抗マウス抗体 ( Sigma Biochemical ) とともにインキュベートした。次いで、ウェルを P B S で 2 回、A P 溶液 ( 1 0 0 m M T r i s p H 9 . 5 、 1 0 0 m M N a C l および 5 m M M g C l <sub>2</sub> ) で 1 回洗浄した。合成ホスファターゼ基質 ( 4 - ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物塩 ) ( 供給者Merck ) を 5 m g / m l 含有する A P 溶液 5 0  $\mu\text{l}$ でウェルを満たした後、ウェル中に黄色の染色が現れることにより、モノクローナル抗体の存在を検出した。

10

## 【 0 0 4 1 】

## b) 組み換えタンパク質に対するウエスタンブロット

9 6 ウェルプレート ( 8  $\times$  1 2 ) 1 0 枚を E L I S A 試験により分析したが、あまり再現性ある結果が出なかった。次いで、以下の方式により、これらのプレートをウエスタンブロットにより試験した。従来に記載された技術 ( Roghi ら、1998 ) に従い、組み換えオーロラ - A タンパク質をポリアクリルアミド - S D S ゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロースメンブレン上に移した。メンブレンを切り取りオーロラ - A タンパク質が移動した位置に対応する領域を単離した。5 % ミルクを含有する T B S T 溶液 ( 2 0 m M T r i s - H C l p H 7 . 5 、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 0 5 % Tween 20 ) 中で 4 で 2 時間インキュベーションすることにより、メンブレン側をブロッキングした。次いで、2 . 5 % ミルクを含有する T B S T 溶液で 1 : 1 0 0 に希釈された細胞上清とともに 4 で 1 時間、各メンブレン端をインキュベーションした。製造者が薦める希釈でペルオキシダーゼまたはホスファターゼ ( 供給者Sigma Chemicals ) のいずれかと結合させた第 2 の抗マウス抗体を用いて、免疫複合体を同定した。反応物の現像を、ペルオキシダーゼ ( 供給者Amersham Pharmacia Biotech ) の場合には、供給者の指示書に従って化学発光技術により実施し、ホスファターゼの場合には製造者の指示書に従って 2 つの基質 N B T / B C I P ( 供給者Sigma Chemicals ) を用いて比色法により実施した。

20

30

## 【 0 0 4 2 】

各プレートのウェルを、各プレートの各縦列に対応する 8 個のプールにグループ分けした。組み換えオーロラ - A タンパク質に対するウエスタンブロットにより、各プールにおけるモノクローナルの存在を分析した。試験された 1 2 0 個のプールのうち、1 9 個のプールだけが陽性反応を生じた。

## 【 0 0 4 3 】

各陽性プールに対応する 8 ウェルの各々を、どのウェルが抗体を含有しているかを特定する目的で、同じウエスタンブロット技術により、別々に試験した。図 1 はプール番号 2 で得られた結果の例を示しているが、この特定の場合ではウェル A および B だけが抗体を含有しており、該ウェルを保持した。

40

## 【 0 0 4 4 】

試験された 1 2 0 個のプールのうち、1 9 個のプールだけを保持したが、その理由はそれらが非常に強い陽性反応を示したからである。これらの 1 9 個のプールの中で、2 3 ウェルだけが組み換えオーロラ - A タンパク質に対する抗体を含有していた。

## 【 0 0 4 5 】

## c) 内因性ヒトオーロラ - A タンパク質に対するウエスタンブロット

今回は同じウエスタンブロット技術を用いて、培養ヒト細胞から調製された全無細胞抽出物のすべてのタンパク質からオーロラ - A タンパク質を認識することができる上清を特

50



定した。

【0046】

選んだ細胞はH e L a細胞であった。抽出物を約 $10^6$ 個の細胞を含有する培養皿から調製し、ポリアクリルアミド - S D Sゲル上に堆積させる溶液に対応するいわゆるLaemml i溶液 (Laemml i 1970) 1mlで皿中の細胞を溶解し、溶液を90 で10分間インキュベートし、音波処理し、遠心分離し、上清10  $\mu$  lをゲル上に堆積させた。

【0047】

H e L a細胞の抽出物に対して行ったウエスタンブロットにより、先に選択した23の上清のうち、12だけが46 kD (オーロラ - Aの予想サイズ) のタンパク質を認識することができる抗体を含有していた。

10

【0048】

d) ヒト細胞に対する免疫蛍光法

培養ヒト細胞の中心体を装飾することができる抗体を選択するために、追加の工程をスクリーニングに取り入れた。細胞の選択は乳癌に由来する細胞系M C F 7に対するものとしたが、その理由はこれらの細胞中でオーロラ - A タンパク質が過剰発現することが報告されていたからである。

【0049】

用いた技術は間接免疫蛍光法である。細胞を12ウェルの皿 (供給者Corning Inc) 中の丸いガラススリップ上で48時間培養した。次いで、スリップをP B S溶液で洗浄し、冷メタノール (- 20 ) で細胞を固定した。次いで、3% B S Aを含有するP B S中において周囲温度で30分間、細胞をインキュベーションした。P B Sで3回洗浄した後、スリップをP B Sに1:50に希釈したハイブリドーマ上清とともに周囲温度で1時間インキュベーションした。細胞を再びP B Sで3回洗浄した後、フルオレセイン<< F I T C >> (供給者Sigma Chemicals) と結合した第2の抗マウス抗体とともに周囲温度で1時間インキュベーションした。スリップをP B Sで3回洗浄し、抗退色剤を含有するMow i ol中でブレードとスリップとの間に細胞を置いた。Leica DMRXA蛍光顕微鏡で観察を行い、白黒カメラ (C O H U) で撮った画像をLeica Qfishソフトウェアで処理した。

20

【0050】

先に保持した12の上清のうち、4つだけがM C F 7細胞の中心体および紡錘体極を装飾することができる抗体を含有していた。この位置特定は、オーロラ - A キナーゼに対して予期した位置づけと正確に対応する。

30

【0051】

e) 内因性マウスオーロラ - A タンパク質に対するウエスタンブロット

スクリーニングの選択性を増大させる目的で、マウスのオーロラ - A のオーソログなタンパク質に対して4つの上清を試験した。培養マウス細胞であるm - I C c 12細胞の無細胞抽出物に対するウエスタンブロットにより第1のスクリーニングを行った。ヒト細胞について無細胞抽出物を調製し、上述と同じ方法でウエスタンブロットを行った。上清のうち2つは、46 kD (マウスオーロラ - A キナーゼに対しても予想されるサイズ) のタンパク質を認識することができた。

【0052】

40

f) マウス細胞に対する免疫蛍光法

ウエスタンブロットを用いて先に特定した2つの上清が培養マウス細胞の中心体を装飾することができるかどうかを検証した。L L C 1細胞を選択したが、その理由は該L L C 1細胞が非常に高い分裂指数を示すためである。2つの抗体のうち1つだけが中心体および紡錘体極におけるタンパク質の位置特定を可能とし、この位置特定はマウスのオーロラ - A タンパク質キナーゼについて予想されたものであった。

【0053】

g) オーロラ - A キナーゼ活性のアッセイ

オーロラ - A キナーゼ活性の測定を、図5ではミエリン塩基性タンパク質 (M B P) 4  $\mu$  g (供給者Sigma Chemicals) をまたは図6ではG S T - H 3 タンパク質を産生する細菌

50

の抽出物 10  $\mu$ l を含有する、1  $\mu$ Ci の [  $\gamma$  -  $^{32}$ P ] ATP 3000 Ci / mmole を含む Tris - HCl 50 mM pH 7.5、NaCl 50 mM、DDT 1 mM、MgCl<sub>2</sub> 10 mM、および ATP 10  $\mu$ M (供給者 Amersham Pharmacia Chemicals) 20  $\mu$ l 中で行った。反応物を 37  $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションした。反応物 10  $\mu$ l を計数中 (図 5)、またはポリアクリルアミド - SDS ゲル上での移動、乾燥、オートラジオグラフィによる検査の後 (図 6) に解析した。

#### 【0054】

##### h) 選択されたモノクローナルのクローニング

選択した上清は、融合後に得られた細胞の不均一混合物 (heterogeneous mixture) を含有していた。限界希釈を行ってこれらの細胞を継代培養し、20 のクローンを得た。組み換えオーロラ - A タンパク質に対するウエスタンブロットを用いてこれらの 20 のクローンの上清を試験すると、8 つが陽性反応を生じた。これらの 8 つの上清をヒト HeLa 細胞の抽出物、マウス m - ICC 12 細胞の抽出物に対して試験した。2 つの上清だけを保持した。

#### 【0055】

これらの 2 つの上清を限界希釈により再び再クローニングし、前述のように再試験した。この最後のクローニングの目的は、継代培養後に再生産され得る抗体産生レベルを維持するクローンを選択することであった。

#### 【0056】

2 つのクローンのうち 1 つだけが安定であることが分かり、それを 35C1 と命名し、モノクローナルの保存および産生のために保持した。

#### 【0057】

##### i) 35C1 モノクローナルの特性 (図を参照のこと)

該抗体は、ウエスタンブロットを用いて全無細胞抽出物中でヒトおよびマウスのオーロラ - A タンパク質キナーゼを特異的に認識する (図 1)。

#### 【0058】

該抗体は、培養ヒト細胞およびマウス細胞内でオーロラ - A タンパク質キナーゼを位置を特定する (図 3)。

#### 【0059】

該抗体は、ヒト MCF7 の抽出物由来のオーロラ - A タンパク質キナーゼを免疫沈降させる (図 4)。

#### 【0060】

該抗体は、オーロラ - A のキナーゼ活性を阻害しない (図 5)。

#### 【0061】

したがって、該抗体は、オーロラ - A タンパク質が該抗体と未だ組み合わさっている間、該オーロラ - A タンパク質の免疫沈降およびそのキナーゼ活性の測定を可能にする (図 6)。

#### 【0062】

35C1 モノクローナルのこれらの特性により、該抗体はオーロラ - A タンパク質キナーゼの研究に選択すべきツールとなる。

#### 【0063】

該抗体を充実性腫瘍の診断法および予後法で用いることができる。オーロラ - A タンパク質をコードする mRNA の発現レベルは、乳癌細胞の遺伝的不安定性およびグレードの高い腫瘍と密接に関連している (Miyoshi ら、2001)。このことは乳癌では非常に明確に確立された。一方、十分に特異的なモノクローナル抗体がないゆえに、オーロラ - A mRNA の量と癌のグレードとのこうした相関関係は、タンパク質レベルではまだ明らかにすることができていない。抗オーロラ - A 35C1 モノクローナルにより、このタイプの測定が可能となる。該抗オーロラ - A 35C1 モノクローナルにより、一方ではオーロラ - A タンパク質の量の測定 (ウエスタンブロットおよび免疫組織化学的測定) が可能となり、他方では腫瘍中のオーロラ - A 活性の測定 (免疫沈降) が可能となり、したがって、

10

20

30

40

50

それを下回るおよび上回る場合に決定される癌の予後がそれぞれ良好または劣悪である、オーロラ - A の量の閾値の決定が可能となる。

【 0 0 6 4 】

さらに、35C1抗体により、インビボにおけるオーロラ - A キナーゼ活性の阻害剤の有効性試験が可能になる。例えば阻害剤で先に処置したH e L a細胞からオーロラ - A タンパク質キナーゼを免疫沈降させ、その活性をインビボで測定する。これにより、とりわけ、インビボにおける阻害剤の安定性の評価が可能になる。

【 0 0 6 5 】

## 【表 1】

## 参考文献

Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics*. 1998 Nov 1;53(3):406-9.

Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998 Jun 1;17(11):3052-65.

10

Giet R, Prigent C. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* 1999 Nov;112 ( Pt 21):3591-601.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(259):680-5.

Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, Noguchi S. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer* 2001 May 1;92(3):370-3.

20

Prigent C, Gill R, Trower M, Sanseau P. In silico cloning of a new protein kinase, Aik2, related to *Drosophila* Aurora using the new tool: EST Blast. *In Silico Biol* 1999;1(2):123-8.

Roghi C, Giet R, Uzbekov R., Morin N, Chartrain I, The Guellec R, Couturier A, Doree M, Philippe M, Prigent C. The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci*. 1998 Mar;111 ( Pt 5):557-72.

30

Shulman M, Wilde CD, Kohler G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 1978 Nov 16;276(5685):269-70.

Takahashi T, Futamura M, Yoshimi N, Sano J, Katada M, Takagi Y, Kimura M, Yoshioka T, Okano Y, Saji S. (2000) Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res* 91(10):1007-14

Takahashi T, Futamura M, Yoshimi N, Sano J, Katada M, Takagi Y, Kimura M, Yoshioka T, Okano Y, Saji S. Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res* 2000 Oct;91(10):1007-14.

40

Tanaka T, Kimura M, Matsunaga K, Fukada D, Mori H, Okano Y. Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1999 May 1;59(9):2041-4.

Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):104-6.

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 6 6 】

【図1】ウエスタンブロットによるハイブリドーマのスクニング。精製組み換えオーロラ - A タンパク質をポリアクリルアミド - S D S ゲル上に沈着させ、ニトロセルロースメンブレン上に移した。メンブレンをケシ色 (poppy red) に染色し、オーロラ - A に対応するバンドを切り出した。各パネルはオーロラ - A を有するメンブレン片に対応する。融合後、細胞を 96 ウェルの皿に分注した。上清のアリコートの抗オーロラ - A モノクローナルの存在をスクリーニングするために、各列のウェルをプールでグループ分けし、これを各皿に対して行う。次いで、各プールをウエスタンブロットの 1 ~ 12 の右側列を用いて試験した。プールが陽性であるとみなされる (ここではプール番号 1) と、このプールを構成する各ウェル (A から H まで) の上清を個別に再試験した。この特定の場合に、ウェル A および B が抗体を含有したが、ウェル B だけを保持した。

20

【図2】ウエスタンブロット。全無細胞抽出物をポリアクリルアミド S D S ゲル上で分離し、ゲルをニトロセルロースメンブレン上に移した。ウェル 1 は抽出物を含有しないが、ウェル 2 は抽出物 10  $\mu$ l (1ml あたり 10<sup>6</sup> 個の細胞に相当する) を含有する。46 kD のオーロラ - A タンパク質だけが検出される。

【図3】ヒトおよびマウス細胞中のオーロラ - A の間接免疫検出。ヒト細胞は MCF7 であり、マウス細胞は LLC1 である。免疫蛍光法において、DAPI (青)、 $\alpha$ -チューブリン (赤)、およびオーロラ - A (緑) を染色することにより DNA を検出した。

【図4】オーロラ - A の免疫沈降。タンパク質をプロテイン A - セファロースに結合した 35C1 抗体により免疫沈降させる。免疫沈降物をポリアクリルアミド - S D S ゲル上で分離し、ゲルを移し、免疫複合体を 35C1 モノクローナルで明らかにした。ウェル 1 : 35C1 抗体のみ ; ウェル 2 : プロテイン A - セファロースのみで行う免疫沈降 ; ウェル 3 : 35C1 モノクローナル抗体で行った免疫沈降 ; ウェル 4 : 実験室で調製された抗体で行った免疫沈降。

30

【図5】35C1 モノクローナル抗体の存在下で測定された精製ヒト組み換えオーロラ - A キナーゼの活性。アフリカツメガエル (xenopus) 属のオーロラ - A タンパク質に対する、ヒトタンパク質と交差しない 1C1 抗体を対照として用いる。MBP (ミエリン塩基性タンパク質) を基質として用いてキナーゼ活性を測定する。

【図6】ダイナビーズプロテイン A 上に固定された 35C1 抗体により免疫沈降された内因性オーロラ - A タンパク質の活性。リン酸化することができるたった 1 つのセリンを含む基質上でキナーゼ活性を測定する。該基質は H3 ヒストンの尾部 (セリン 10 を有する) と融合した GST 構築物である。セリン 10 をアラニンに置き換えた対照の基質も用いる。ウェル 1、4、および 7 は精製組み換えオーロラ - A を含有し、用いる。ウェル 2、5、および 8 は免疫沈降された組み換えオーロラ - A を含有し、抗体およびプロテイン A - セファロースに固定される。ウェル 3 および 6 はキナーゼを含有しない。ウェル 3、4、および 5 はリン酸化可能な基質である GST - H3 (S) を含有し、ウェル 6、7、および 8 はリン酸化が不可能でない、キナーゼに対する GST - H3 (S/A) 基質を含有する。

40

【配列表】

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; CNRS

<120> ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-AURORA-A, SON PROCEDE  
D'OBTENTION, ET SES UTILISATIONS DANS LE DIAGNOSTIC ET  
LE TRAITEMENT DES CANCERS

&lt;130&gt; IFB 01 BN CNR AURA

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2253

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (257)..(1495)

&lt;400&gt; 1

```

ggaagacttg ggtccttggg tcgcaggtgg gagccgacgg gtgggtagac cgtgggggat 60
atctcagtgg cggacgagga cggcggggac aagggcgggc tggtcggagt ggcggagcgt 120
caagtccctt gtcggttcct ccgtccctga gtgtccttgg cgtgccttgg tgcccgccca 180
gcgcctttgc atccgtcctt gggcaccgag gcgccttgta ggatactgct tgttacttat 240
tacagctaga ggcatac atg gac cga tot aaa gaa aac tgc att tca gga oct 292
          Met Asp Arg Ser Lys Glu Asn Cys Ile Ser Gly Pro
          1             5             10

gtt aag gct aca gct cca gtt gga ggt cca aaa cgt gtt ctc gtg act 340
Val Lys Ala Thr Ala Pro Val Gly Gly Pro Lys Arg Val Leu Val Thr
          15             20             25

cag caa att cct tgt cag aat cca tta oct gta aat agt ggc cag1gct 388
Gln Gln Ile Pro Cys Gln Asn Pro Leu Pro Val Asn Ser Gly Gln Ala
          30             35             40

cag cgg gtc ttg tgt cct tca aat tct tcc cag cgc gtt cct ttg caa 436
Gln Arg Val Leu Cys Pro Ser Asn Ser Ser Gln Arg Val Pro Leu Gln
          45             50             55             60

gca caa aag ctt gtc tcc agt cac aag ccg gtt cag aat cag aag cag 484
Ala Gln Lys Leu Val Ser Ser His Lys Pro Val Gln Asn Gln Lys Gln
          65             70             75

aag caa ttg cag gca acc agt gta cct cat cct gtc tcc agg cca ctg 532
Lys Gln Leu Gln Ala Thr Ser Val Pro His Pro Val Ser Arg Pro Leu
          80             85             90

```

10

20

30

aat aac acc caa aag agc aag cag ccc ctg cca tcg gca cct gaa aat	580
Asn Asn Thr Gln Lys Ser Lys Gln Pro Leu Pro Ser Ala Pro Glu Asn	
95 100 105	
aat cct gag gag gaa ctg gca tca aaa cag aaa aat gaa gaa tca aaa	628
Asn Pro Glu Glu Glu Leu Ala Ser Lys Gln Lys Asn Glu Glu Ser Lys	
110 115 120	
aag agg cag tgg gct ttg gaa gac ttt gaa att ggt cgc cct ctg ggt	676
Lys Arg Gln Trp Ala Leu Glu Asp Phe Glu Ile Gly Arg Pro Leu Gly	
125 130 135 140	
aaa gga aag ttt ggt aat gtt tat ttg gca aga gaa aag caa agc aag	724
Lys Gly Lys Phe Gly Asn Val Tyr Leu Ala Arg Glu Lys Gln Ser Lys	
145 150 155	
ttt att ctg gct ctt aaa gtg tta ttt aaa gct cag ctg gag aaa gcc	772
Phe Ile Leu Ala Leu Lys Val Leu Phe Lys Ala Gln Leu Glu Lys Ala	
160 165 170	
gga gtg gag cat cag ctc aga aga gaa gta gaa ata cag tcc cac ctt	820
Gly Val Glu His Gln Leu Arg Arg Glu Val Glu Ile Gln Ser His Leu	
175 180 185	
cgg cat cct aat att ctt aga ctg tat ggt tat ttc cat gat gct acc	868
Arg His Pro Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Tyr Phe His Asp Ala Thr	
190 195 200	
aga gtc tac cta att ctg gaa tat gca cca ctt gga aca gtt tat aga	916
Arg Val Tyr Leu Ile Leu Glu Tyr Ala Pro Leu Gly Thr Val Tyr Arg	
205 210 215 220	
gaa ctt cag aaa ctt tca aag ttt gat gag cag aga act gct act tat	964
Glu Leu Gln Lys Leu Ser Lys Phe Asp Glu Gln Arg Thr Ala Thr Tyr	
225 230 235	
ata aca gaa ttg gca aat gcc ctg tct tac tgt cat tcg aag aga gtt	1012
Ile Thr Glu Leu Ala Asn Ala Leu Ser Tyr Cys His Ser Lys Arg Val	
240 245 250	
att cat aga gac att aag cca gag aac tta ctt ctt gga tca gct gga	1060
Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu Gly Ser Ala Gly	
255 260 265	
gag ctt aaa att gca gat ttt ggg tgg tca gta cat gct cca tct tcc	1108
Glu Leu Lys Ile Ala Asp Phe Gly Trp Ser Val His Ala Pro Ser Ser	
270 275 280	
agg agg acc act ctc tgt ggc acc ctg gac tac ctg ccc cct gaa atg	1156
Arg Arg Thr Thr Leu Cys Gly Thr Leu Asp Tyr Leu Pro Pro Glu Met	
285 290 295 300	
att gaa ggt cgg atg cat gat gag aag gtg gat ctc tgg agc ctt gga	1204
Ile Glu Gly Arg Met His Asp Glu Lys Val Asp Leu Trp Ser Leu Gly	
305 310 315	
gtt ctt tgc tat gaa ttt tta gtt ggg aag cct cct ttt gag gca aac	1252
Val Leu Cys Tyr Glu Phe Leu Val Gly Lys Pro Pro Phe Glu Ala Asn	
320 325 330	

10

20

30

aca tac caa gag acc tac aaa aga ata tca cgg gtt gaa ttc aca ttc 1300  
 Thr Tyr Gln Glu Thr Tyr Lys Arg Ile Ser Arg Val Glu Phe Thr Phe  
           335                          340                          345

cct gac ttt gta aca gag gga gcc agg gac ctc att tca aga ctg ttg 1348  
 Pro Asp Phe Val Thr Glu Gly Ala Arg Asp Leu Ile Ser Arg Leu Leu  
           350                          355                          360

aag cat aat ccc agc cag agg cca atg ctc aga gaa gta ctt gaa cac 1396  
 Lys His Asn Pro Ser Gln Arg Pro Met Leu Arg Glu Val Leu Glu His  
           365                          370                          375                          380

ccc tgg atc aca gca aat tca tca aaa cca tca aat tgc caa aac aaa 1444  
 Pro Trp Ile Thr Ala Asn Ser Ser Lys Pro Ser Asn Cys Gln Asn Lys  
                           385                          390                          395

gaa tca gct agc aaa cag tct tag gaa tcg tgc agg ggg aga aat cct 1492  
 Glu Ser Ala Ser Lys Gln Ser  
                           400

tga gccagggtcg ccatataacc tgacaggaac atgctactga agtttatitt 1545

accattgact gctgcctca atctagaacg ctacacaaga aatatttggt ttactcagca 1605

ggtgtgcctt aacctcccta ttcagaaagc tccacatcaa taaacatgac actctgaagt 1665

gaaagtagcc acgagaattg tgctacttat actggttcat aatctggagg caaggttcga 1725

ctgcagccgc ccgctcagcc tgtgctaggc atgggtgtctt cacaggaggc aaatccagag 1785

cctggctgtg gggaaagtga ccactctgcc ctgacccoga tcagttaagg agctgtgcaa 1845

taaccttctt agtacctgag tgagtgtgta acttattggg ttggcgaagc ctggtaaagc 1905

tggtggaatg agtatgtgat tctttttaag tatgaaaata aagatatatg tacagacttg 1965

tattttttct ctggtggcat tccttttaga atgctgtgtg tctgtccggc acccggtag 2025

gcttgattgg gtttctagtc ctccctaacc acttatctcc catatgagag tgtgaaaaat 2085

aggaacacgt gctctacctc catttaggga ttgcttggg atacagaaga ggccatgtgt 2145

ctcagagctg ttaagggctt atttttttaa aacattggag tcatagcatg tgtgtaaact 2205

ttaaataatgc aaataaataa gtatctatgt ctaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2253

<210> 2

<211> 403

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Arg Ser Lys Glu Asn Cys Ile Ser Gly Pro Val Lys Ala Thr

1                          5                          10                          15

Ala Pro Val Gly Pro Lys Arg Val Leu Val Thr Gln Gln Ile Pro

20                          25                          30

10

20

30



Cys Gln Asn Pro Leu Pro Val Asn Ser Gly Gln Ala Gln Arg Val Leu  
 35 40 45  
 Cys Pro Ser Asn Ser Ser Gln Arg Val Pro Leu Gln Ala Gln Lys Leu  
 50 55 60  
 Val Ser Ser His Lys Pro Val Gln Asn Gln Lys Gln Lys Gln Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Ala Thr Ser Val Pro His Pro Val Ser Arg Pro Leu Asn Asn Thr Gln  
 85 90 95  
 Lys Ser Lys Gln Pro Leu Pro Ser Ala Pro Glu Asn Asn Pro Glu Glu  
 100 105 110  
 Glu Leu Ala Ser Lys Gln Lys Asn Glu Glu Ser Lys Lys Arg Gln Trp  
 115 120 125  
 Ala Leu Glu Asp Phe Glu Ile Gly Arg Pro Leu Gly Lys Gly Lys Phe  
 130 135 140  
 Gly Asn Val Tyr Leu Ala Arg Glu Lys Gln Ser Lys Phe Ile Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Val Leu Phe Lys Ala Gln Leu Glu Lys Ala Gly Val Glu His  
 165 170 175  
 Gln Leu Arg Arg Glu Val Glu Ile Gln Ser His Leu Arg His Pro Asn  
 180 185 190  
 Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Tyr Phe His Asp Ala Thr Arg Val Tyr Leu  
 195 200 205  
 Ile Leu Glu Tyr Ala Pro Leu Gly Thr Val Tyr Arg Glu Leu Gln Lys  
 210 215 220  
 Leu Ser Lys Phe Asp Glu Gln Arg Thr Ala Thr Tyr Ile Thr Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Ala Asn Ala Leu Ser Tyr Cys His Ser Lys Arg Val Ile His Arg Asp  
 245 250 255  
 Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu Gly Ser Ala Gly Glu Leu Lys Ile  
 260 265 270  
 Ala Asp Phe Gly Trp Ser Val His Ala Pro Ser Ser Arg Arg Thr Thr  
 275 280 285  
 Leu Cys Gly Thr Leu Asp Tyr Leu Pro Pro Glu Met Ile Glu Gly Arg  
 290 295 300  
 Met His Asp Glu Lys Val Asp Leu Trp Ser Leu Gly Val Leu Cys Tyr  
 305 310 315 320  
 Glu Phe Leu Val Gly Lys Pro Pro Phe Glu Ala Asn Thr Tyr Gln Glu  
 325 330 335  
 Thr Tyr Lys Arg Ile Ser Arg Val Glu Phe Thr Phe Pro Asp Phe Val  
 340 345 350  
 Thr Glu Gly Ala Arg Asp Leu Ile Ser Arg Leu Leu Lys His Asn Pro  
 355 360 365  
 Ser Gln Arg Pro Met Leu Arg Glu Val Leu Glu His Pro Trp Ile Thr  
 370 375 380  
 Ala Asn Ser Ser Lys Pro Ser Asn Cys Gln Asn Lys Glu Ser Ala Ser  
 385 390 395 400  
 Lys Gln Ser

10

20

30

40

【図 1】

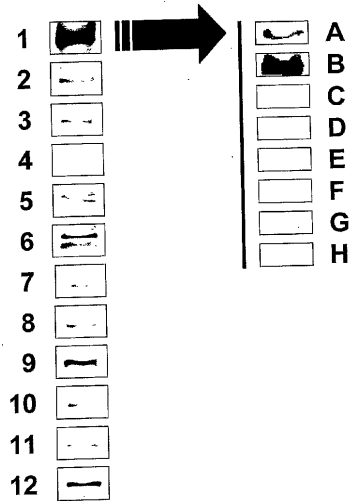
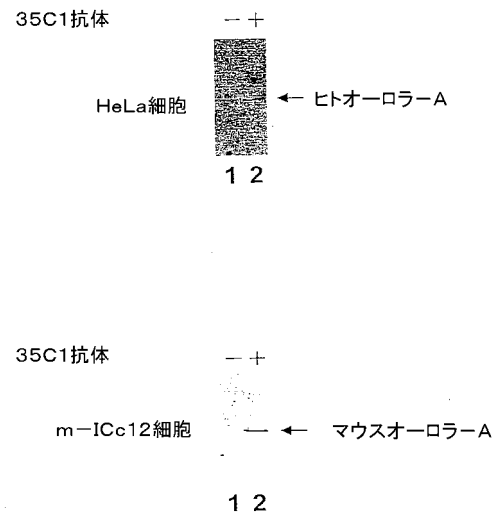
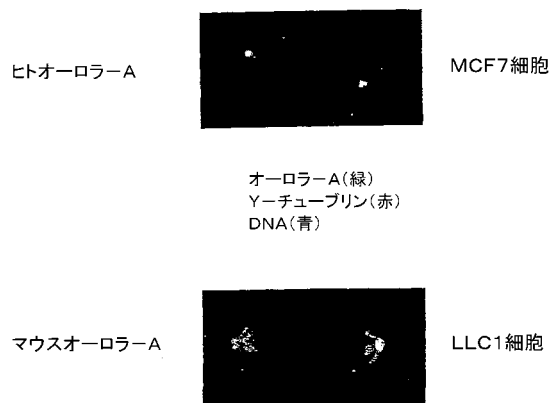


Figure 1

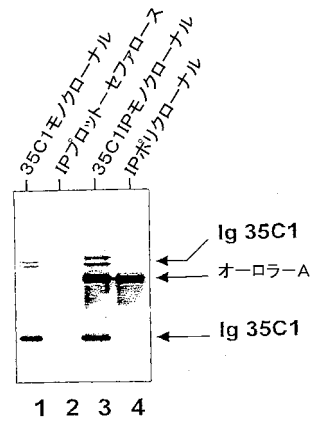
【図 2】



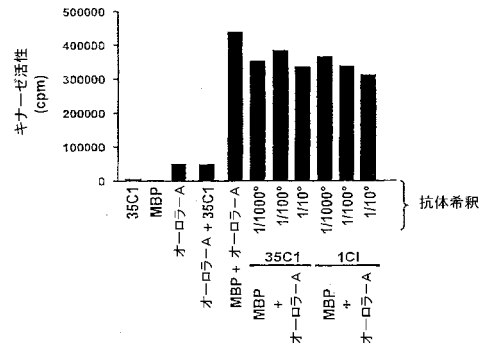
【図 3】



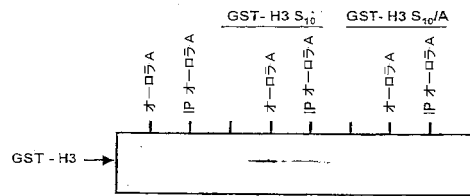
【図 4】



【図 5】



【図 6】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q 1/48 (2006.01)</b>		<b>C 1 2 Q 1/48</b>	<b>Z</b>
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>		<b>G 0 1 N 33/574</b>	<b>A</b>
<b>G 0 1 N 33/577 (2006.01)</b>		<b>G 0 1 N 33/577</b>	<b>B</b>

(73)特許権者 504457304

エタブリスマン・フランセ・デュ・サン - ブルターニュ  
 E T A B L I S S E M E N T F R A N C A I S D U S A N G - B R E T A G N E  
 フランス国、エフ - 3 5 0 1 6 レヌ・セデックス、ペーパー 9 1 6 1 4、リュ・ピエール・ジ  
 ャン・ジェネスト

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74)代理人 100075225

弁理士 篠田 文雄

(72)発明者 ブリジャン, クロード

フランス国、エフ - 3 5 2 3 5 トリニエ - フウイラル、リュ・アンジェラ・デュヴァル 1

(72)発明者 マルタン, アン

フランス国、エフ - 3 5 7 0 0 レヌ、リュ・ボードレール 2 6

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 Oncogene, 2 0 0 0 年, vol.19, no.24, p.2812-2819

Cancer Res., 1 9 9 9 年, vol.59, no.9, p.2041-2044

J. Cell Sci., 2 0 0 1 年, vol.114, no.11, p.2095-2104

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1 9 9 8 年, vol.244, no.1, p.285-292

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07K 16/00-16/46

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/48

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed