

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-540852  
(P2009-540852A)

(43) 公表日 平成21年11月26日(2009.11.26)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A	2 G 04 5
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q 1/02		4 B 02 4
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	A	4 B 06 3
C 07 K 14/47 (2006.01)	C 07 K 14/47		4 C 07 6
C 07 K 16/18 (2006.01)	C 07 K 16/18		4 C 08 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-517228 (P2009-517228)	(71) 出願人	599022270 エグゼニ・テラピューティック・ソシエテ ・アノニム EXONHIT THE RAPÉUTIC S SA フランス国、エフー75017 パリ、リ ュ・ブリュネル 26
(86) (22) 出願日	平成19年6月29日 (2007.6.29)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成21年3月3日 (2009.3.3)	(74) 代理人	100113653 弁理士 東田 幸四郎
(86) 國際出願番号	PCT/EP2007/056584	(74) 代理人	100116919 弁理士 斎藤 房幸
(87) 國際公開番号	W02008/003656		
(87) 國際公開日	平成20年1月10日 (2008.1.10)		
(31) 優先権主張番号	60/817,686		
(32) 優先日	平成18年7月3日 (2006.7.3)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】前立腺特異的な転写物ならびに前立腺癌の治療および診断におけるその使用

## (57) 【要約】

ヒト前立腺腫瘍組織において上方制御される遺伝子および対応するタンパク質が同定される。これらの遺伝子および対応する抗原は、前立腺癌の処置、診断、または予防のために適した標的である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒト前立腺癌細胞により発現される単離核酸であって、

(i)配列番号：1～23のいずれか1つに含まれる配列を含む核酸；

(ii)(i)の変異体であり、該変異体がギャップを許容することなく整列された場合に(i)の配列と少なくとも70%同一である核酸配列を有する；および

(iii)少なくとも20ヌクレオチド長のサイズを有する(i)または(ii)のフラグメントからなる群より選択される単離核酸。

**【請求項 2】**

配列番号：1～23のいずれか1つにおいて含まれる核酸配列またはそのフラグメントを含む、請求項1記載の核酸。 10

**【請求項 3】**

請求項1記載の核酸配列の1つの特異的増幅をもたらすプライマーを含むプライマー混合物。

**【請求項 4】**

ヒト前立腺細胞サンプルが標的核酸分子を発現するか否かを決定することを含む前立腺癌を検出する方法であって、該標的核酸分子が配列番号：1～23からなる群より選択される核酸配列を含む遺伝子もしくはRNAの配列、または少なくとも20ヌクレオチド長のサイズを有する該遺伝子もしくはRNAのフラグメント、または該核酸によりコード化されるポリペプチドを含む方法。 20

**【請求項 5】**

方法が標的核酸分子に特異的にハイブリダイズする核酸配列を使用して標的核酸分子の発現を検出することを含む、請求項4記載の方法。

**【請求項 6】**

方法が標的核酸分子の増幅をもたらすプライマーを使用して標的核酸分子の発現を検出することを含む、請求項5記載の方法。

**【請求項 7】**

核酸によりコード化されるポリペプチドをアッセイすることにより標的核酸分子の発現を検出する、請求項5記載の方法。

**【請求項 8】**

アッセイがポリペプチドに対して特異的に結合するモノクローナル抗体またはフラグメントの使用も含む、請求項7記載の方法。 30

**【請求項 9】**

アッセイがELISAまたは競合結合アッセイを含む、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

ヒト前立腺癌細胞により発現される抗原であって、該抗原が、

(i)配列番号：1～23のいずれか1つにおける少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列によりコード化される抗原；

(ii)配列番号：1～23のいずれか1つにおける少なくとも90%の同一性を有する配列を含むタンパク質に由来する抗原；および、 40

(iii)(i)または(ii)の抗原フラグメントからなる群より選択される抗原。

**【請求項 11】**

(i)配列番号：1～23からなる群より選択される核酸配列によりコード化されるアミノ酸配列または(ii)配列番号：1～23に由来するアミノ酸配列；または、(iii)(i)もしくは(ii)の抗原フラグメントを含む前立腺抗原。

**【請求項 12】**

以下から選択される標的ポリペプチド分子に対して特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント：

(i)配列番号：1～23からなる群より選択される配列を含む遺伝子もしくはRNAの配列を含 50

む核酸分子、または少なくとも20ヌクレオチド長のサイズを有する該遺伝子もしくはRNAのフラグメントによりコード化されるポリペプチド、または、配列番号：1～23に由来するポリペプチド、

(ii)請求項10または11に記載の抗原、および、

(iii)(i)または(ii)の抗原性フラグメント。

【請求項13】

請求項11記載の抗原に対して特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項14】

検出可能な標識に直接的または間接的に結合された請求項10または11に記載の抗原。 10

【請求項15】

検出可能な標識に直接的または間接的に結合された請求項12または13に記載の抗原。

【請求項16】

請求項1記載の核酸（例えば、DNA）および検出可能な標識を含む前立腺癌の検出のための診断キット。

【請求項17】

請求項3記載のプライマーおよび診断的に許容可能な担体を含む前立腺癌の検出のための診断キット。

【請求項18】

請求項12または13に記載のモノクローナル抗体および検出可能な標識を含む前立腺癌の検出のための診断キット。 20

【請求項19】

前立腺癌を処置するための方法であって、治療有効量のリガンドを被験者に対して投与することを含み、前記のリガンドが、(i)配列番号：1～23からなる群より選択される配列を含む遺伝子もしくはRNA、それらの変異体または少なくとも20ヌクレオチド長のサイズを有する前記の遺伝子もしくはRNAのフラグメント、および(ii)配列番号：1～23からなる群より選択される配列を含む遺伝子もしくはRNAによりコード化されるタンパク質もしくはポリペプチド、それらの変異体または少なくとも20ヌクレオチド長のサイズを有する前記の遺伝子もしくはRNAのフラグメント、または配列番号：1～23に由来するポリペプチドから選択される標的分子に特異的に結合する方法。 30

【請求項20】

リガンドが、配列番号：1～23からなる群より選択されるDNA配列を有する遺伝子もしくはそのフラグメントまたはそれらの変異体、または配列番号：1～23から由来するポリペプチドの発現を阻止するリボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項19記載の方法。

【請求項21】

リガンドをエフェクター成分に対して直接的または間接的に結合する、請求項19または20に記載の方法。

【請求項22】

エフェクター成分が治療用の放射標識、酵素、細胞毒素、増殖因子、または薬物である、請求項21記載の方法。 40

【請求項23】

請求項10または11に記載の治療有効量の抗原を被験者に対して投与すること、および場合により該抗原に対する体液性または細胞毒性Tリンパ球応答を誘発するアジュバントを含む、前立腺癌を処置するための方法。

【請求項24】

医薬的有効量の抗原提示細胞を被験者に対して投与することを含む、前立腺癌を処置するための方法。

【請求項25】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求24記載の方法。 50

**【請求項 2 6】**

樹状細胞が(i)請求項10または11の通りに由来するペプチドをパルスまたは負荷し、ペプチドに対する、および、これにより腫瘍に対するT細胞免疫を刺激するための細胞ワクチンとして使用し、または(ii)請求項10または11の通りに由来するペプチドをコード化する発現構築物により改変され、ペプチドに対する、およびこれにより腫瘍に対するT細胞免疫を刺激するための細胞ワクチンとして使用される、請求項25記載の方法。

**【請求項 2 7】**

二次または複数の腫瘍関連HLA拘束性ペプチドをさらに含む、請求項24記載の方法。

**【請求項 2 8】**

治療有効量のリガンドを被験者に対して投与することを含む前立腺癌を処置するための方法であって、リガンドが、場合により治療用エフェクター成分に直接的または間接的に結合された配列番号：1～23からなる群より選択される配列を含む遺伝子もしくはRNAによりコード化されるタンパク質、またはそれらの変異体、または配列番号：1～23に由来するポリペプチドに対して特異的に結合する方法。

10

**【請求項 2 9】**

エフェクター成分が放射標識、酵素、細胞毒素、増殖因子、または薬物である、請求項28記載の方法。

**【請求項 3 0】**

放射標識がイットリウムである、請求項29記載の方法。

20

**【請求項 3 1】**

放射標識がインジウムである、請求項29記載の方法。

**【請求項 3 2】**

リガンドがモノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項28記載の方法。

**【請求項 3 3】**

リガンドが小分子である、請求項28記載の方法。

**【請求項 3 4】**

リガンドがペプチドである、請求項28記載の方法。

**【請求項 3 5】**

リガンドがタンパク質の細胞外ドメインに結合する、請求項28記載の方法。

30

**【請求項 3 6】**

(i)配列番号：1～23からなる群より選択される配列を含む遺伝子またはRNAによりコード化されるタンパク質の細胞外ドメインの配列を含むポリペプチド；および、  
(ii)(i)のポリペプチドをコード化する核酸分子、  
から選択される分子。

**【請求項 3 7】**

ポリペプチドが8～100アミノ酸長を有する、請求項36記載の分子。

40

**【請求項 3 8】**

生物活性化合物を選択、同定、スクリーニング、特性付け、または最適化するための方法であって、候補化合物を標的分子と接触させること、および候補化合物が該標的分子に結合するか否かを決定することを含み、該標的分子が(i)配列番号：1～23からなる群より選択される核酸配列を含む遺伝子またはRNAの配列を含む核酸分子、(ii)少なくとも20ヌクレオチド長のサイズを有する該遺伝子またはRNAのフラグメント、および(iii)(i)または(ii)によりコード化されるポリペプチドまたは配列番号：1～23に由来するポリペプチドから選択される方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、前立腺癌細胞中で発現される遺伝子における選択的スプライシング事象に対応するDNA配列の同定に関するものである。これらの遺伝子またはそれらの対応するタンパク質は、癌の処置、予防、および／または診断の標的となり、ここで、これらの遺伝子

50

は、特に前立腺癌において、異なって制御される、および／または、スプライシングされる。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

###### 発明の背景

ヒト疾患状態の遺伝子検出は、急速に発生している分野である (Taparowsky et al., 1982; Slamon et al., 1989; Sidransky et al., 1992; Miki et al., 1994; Dong et al., 1995; Morahan et al., 1996; Lifton, 1996; Barinaga, 1996)。しかし、このアプローチにはいくつかの問題が存在する。多くの公知の遺伝子病変は、個人における特定の疾患状態の発生の素因となるのみである。遺伝子病変を持つ個人において疾患状態が発生しないことがあれば、特定の遺伝子病変を持たない他の個人において疾患状態が発生することもある。ヒトの癌において、遺伝子欠損が多数の公知の腫瘍抑制遺伝子およびプロトオンコジーンにおいて潜在的に生じうる。

10

##### 【0003】

癌の遺伝子検出は長い歴史を有する。癌の素因となることが示された最も初期の遺伝子病変の一部は、rasオンコジーンの形質転換点突然変異である (Taparowsky et al., 1982)。形質転換ras点突然変異は、良性および悪性の結腸直腸癌を伴う個人の便において検出できる (Sidransky et al., 1992)。しかし、このような腫瘍のわずか50%にしかras突然変異は含まれなかった。乳癌および前立腺癌におけるHER-2/neuの増幅 (Slamon et al., 1989)、膀胱癌におけるp53の欠失および突然変異 (Sidransky et al., 1991)、結腸大腸癌におけるDCCの欠失 (Fearon et al., 1990)、ならびに乳癌および前立腺癌におけるBRCA1の突然変異 (Miki et al., 1994) について同様の結果が得られている。

20

##### 【0004】

これらの遺伝子病変のいずれも癌を伴う患者の大半を予測できず、大半が、疑わしい腫瘍の直接サンプリングを必要とし、スクリーニングを困難にする。さらに、上記のマーカーのいずれも転移型と非転移型の間で癌を識別できない。癌患者の有効な管理においては、腫瘍が既に転移した、または転移する可能性の高い個人の特定が重大である。転移性癌は米国において毎年560,000人を殺すため (ACSホームページ)、転移性前立腺癌マーカーの同定は重要な進歩でありうる。

30

##### 【0005】

前立腺癌では癌の検出および診断における特定の問題が生じる。前立腺の癌腫は、米国における男性の間で最も高頻度に診断される (Veltri et al., 1996)。1998年において前立腺癌は約189,500人の男性において診断され、約40,000人の男性が悪性腫瘍で死亡した (Landis et al., 1998)。比較的少数の前立腺腫瘍が、患者の一生の間に臨床的有意性にまで進行するが、性質が進行性のものは検出時までに転移している可能性が高い。転移性前立腺癌を伴う個人での生存率は非常に低い。これらの極端の間は、転移するが、依然転移していない前立腺腫瘍を伴う患者であり、これらの患者では前立腺の外科切除が治療である。患者が該当する群の決定は、最適な処置および患者の生存を決定する際に重大である。

30

##### 【0006】

1984年における血清前立腺特異抗体 (PSA) 試験のFDA承認により、前立腺癌を管理する方法が変わった (Allhoff et al., 1989; Cooner et al., 1990; Jacobson et al., 1995; Orozco et al., 1998)。PSAは、前立腺癌患者における治療応答を検出およびモニターするための血清バイオマーカーとして広く使用される (Badalament et al., 1996; O'Dowd et al., 1997)。PSAアッセイにおけるいくつかの改変は (Partin and Oesterling, 1994; Babian et al., 1996; Zlotta et al., 1997)、早期診断および処置の改善をもたらした。

40

##### 【0007】

1988年以降、PSAは前立腺癌の臨床マーカーとして広く使用されてきたが (Partin and Oesterling, 1994)、PSA単独を利用した、または直腸診 (DRE) との併用によるスクリー

50

ニングプログラムは、前立腺癌を伴う男性での生存率を改善させることに成功していない（Partin and Oesterling, 1994）。PSAは前立腺組織に特異的であるが、正常および良性の前立腺上皮、ならびに、悪性の前立腺上皮により産生され、前立腺癌の検出での高い偽陽性率を招く（Partin and Oesterling, 1994）。

#### 【0008】

血清レベルが比較的高い場合での前立腺癌の有効な指標であるが、小幅に上昇している場合、例えば、レベルが2~10 ng/mLの間である場合、PSAの血清レベルは前立腺癌のより曖昧な指標である。これらの小幅な上昇では、血清PSAは、BPH（良性前立腺過形成）、前立腺炎、または身体外傷などの非癌性疾患状態から起こりうる（McCormack et al., 1995）。より低い2.0 ng/mLという血清PSAの癌検出カットオフ濃度の適用によって、特に触知不能な早期腫瘍（病期T1c）を伴う若い男性における前立腺癌の診断が上昇したが（Soh et al., 1997； Carter and Coffey, 1997； Harris et al., 1997； Orozco et al., 1998）、低い血清PSAレベルでの前立腺癌の検出におけるPSAアッセイの特異性は依然として問題である。

10

#### 【0009】

数人の研究者が、血清PSA濃度の他、他の様々なバイオマーカーを調べることにより、前立腺癌の血清学的検出の特異性を改善させることに努めている（Ralph and Veltri, 1997）。これらの他のバイオマーカーの中で最も重点的に研究されたものの1つが、患者の血液における遊離PSA対全PSAの比（f/t PSA）である。血清中の大部分のPSAは、アルファ1-アンチトリプシン（ACT）またはアルファ2-マクログロブリンなどの他のタンパク質に結合した分子型である（Christensson et al., 1993； Stenman et al., 1991； Lilja et al., 1991）。遊離PSAは他のタンパク質とは結合していない。遊離PSA対全PSAの比（f/t PSA）は、通常、臓器に限局した前立腺癌を伴う患者と比較して、BPHを伴う患者において有意に高い（Marley et al., 1996； Oesterling et al., 1995； Pettersson et al., 1995）。f/t PSAアッセイのために適当なカットオフを決定できる場合、f/t PSAアッセイは、血清PSAレベルが小幅にのみ上昇した症例において前立腺癌を伴う患者からBPHを伴う患者を識別するのに有用になる（Marley et al., 1996； Partin and Oesterling, 1996）。残念ながら、f/t PSAは前立腺癌の検出を改善させうるが、f/t PSA比における情報は、望ましいレベルにまで前立腺癌の血清学的検出の感度および特異性を改善させるには不十分である。

20

#### 【0010】

前立腺癌の検出のために使用してきた他のマーカーとして、前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）および前立腺分泌タンパク質（PSP）が挙げられる。PAPは、ホルモン調節下で、前立腺細胞により分泌される（Brawn et al., 1996）。それはPSAよりも低い特異性および感度を有する。結果として、今ではそれほど使用されていないが、PAPは依然として一次処置で失敗した転移性患者をモニターするためのいくつかの適用を有しうる。一般的に、PSPはPAPよりも高感度なバイオマーカーであるが、しかし、PSAほど高感度ではない（Huang et al., 1993）。PSAと同様に、PSPレベルは、BPHを伴う患者および前立腺癌を伴う患者において高頻度で上昇する。

30

#### 【0011】

前立腺疾患に関連する別の血清マーカーは、前立腺特異的膜抗原（PSMA）である（Horoszewicz et al., 1987； Carter and Coffey, 1996； Murphy et al., 1996）。PSMAはII型細胞膜タンパク質であり、葉酸ヒドロラーゼ（FAH）として同定された（Carter and Coffey, 1996）。PSMAに対する抗体は、正常前立腺組織および前立腺癌組織のいずれとも反応する（Horoszewicz et al., 1987）。Murphyら（1995）はELISAを使用し、進行性前立腺癌における血清PSMAを検出した。血清検査として、PSMAレベルは前立腺癌の比較的不良な指標である。しかし、PSMAは特定の状況において有用性を有しうる。PSMAは転移性前立腺腫瘍の毛細血管床において発現しており（Silver et al., 1997）、転移性癌患者の血液中においてより豊富であると報告されている（Murphy et al., 1996）。PSMAメッセージ RNA（mRNA）は、5-アルファ-ジヒドロキシテストステロン（DHT）に対する暴露後にLNC

40

50

aP前立腺癌細胞株において8-10倍下方制御され、ホルモン除去状態においては高レベルで発現される (Israeli et al., 1994)。PSMA発現のホルモン調節によって、前立腺癌におけるその制御および重要性に関するより明確な理解が促進されうる。

#### 【0012】

前立腺癌のための2つの比較的新しい潜在的なバイオマーカーは、ヒトカリクレイン2 (HK2) (Piironen et al., 1996) および前立腺特異的トランスグルタミナーゼ (pTGase) (Dubbink et al., 1996) である。HK2は、前立腺により分泌されるカリクレインファミリーのメンバーである (Piironen et al., 1996)。前立腺特異的トランスグルタミナーゼは、タンパク質の翻訳後架橋を触媒する、前立腺細胞において発現されるカルシウム依存性酵素である (Dubbink et al., 1996)。理論上は、HK2またはpTGaseの血清濃度は、前立腺癌の検出または診断において有用でありうるが、しかし、これらのマーカーの有用性は依然評価中である。10

#### 【0013】

インターロイキン8 (IL-8) も前立腺癌のためのマーカーとして報告されている (Veltri et al., 1999)。血清IL-8濃度は、前立腺癌の病期の上昇と相関しており、BPHを悪性前立腺腫瘍から識別できると報告された (同上)。前立腺癌の検出および診断でのこのマーカーの広範囲の適用性は、依然研究中である。

#### 【0014】

前立腺癌のためのこれらのタンパク質マーカーに加えて、以下を含むいくつかの遺伝子変化が、前立腺癌に関連すると報告された：対立遺伝子喪失 (Bova, et al., 1993 ; Macoska et al., 1994 ; Carter et al., 1990) ; DNA高度メチル化 (Isaacs et al., 1994) ; 細胞膜芽細胞腫 (Rb) 、p53、およびKAI1遺伝子の点突然変異または欠失 (Bookstein et al., 1990a ; Bookstein et al., 1990b ; Isaacs et al., 1991 ; Dong et al., 1995) ; および、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) により検出される染色体の異数性および異数染色体 (aneusomy) (Macoska et al., 1994 ; Visakorpi et al., 1994 ; Takahashi et al., 1994 ; Alcaraz et al., 1994)。これらのいずれも無症候性前立腺癌での一般的なスクリーニングツールとして有用となるために十分な感度および特異性を呈するとは報告されていない。20

#### 【0015】

現行の臨床診療において、血清PSAアッセイおよび直腸診 (DRE) を使用し、いずれの患者が前立腺生検を有する必要があるのかを示す (Lithrup et al., 1994 ; Orozco et al., 1998)。生検組織の組織学的検査を使用して、前立腺癌の診断を下す。1998年において診断された189,500例の前立腺癌 (Landis, 1998) および公知の癌検出率である約35% (Parker et al., 1996) に基づいて、1998年において50万の前立腺生検が米国において実施されたと推定される (Orozco et al., 1998 ; Veltri et al., 1998)。明らかに、血清学的検査に由来する利点は多く存在し、それは小さな早期前立腺腫瘍を検出するために十分に高感度であり、非悪性または臨床的に有意ではない病状を伴う患者の大部分を除外するために十分な特異性も有する。30

#### 【0016】

前立腺癌の進行および疾患進行をモニターするための診断方法の開発に関する遺伝子の同定に関する先行技術においては依然として不備が残る。同様に、前立腺癌において異なってスプライシングされる、および / または、異なる発現される遺伝子の同定は、癌を診断するための迅速で安価な方法の開発においてかなり重要となりうる。少数の前立腺特異的遺伝子がクローニングされているが (PSA、PSMA、HK2、pTGaseなど)、これらは典型的には前立腺癌において上方制御されない。非悪性前立腺組織と比較して、前立腺癌において異なる発現される新規の前立腺特異的転写物は、前立腺癌の診断、予後診断、および処置のための大きな予想外の進歩を表しうる。40

#### 【0017】

CD8+Tリンパ球サブセットは、腫瘍形成に対する免疫監視において重要な役割を果たしうる (Knutson et al., 2005)。疾患細胞上で主要組織適合複合体 (MHC) クラスI分子に50

より提示されるペプチドは、CD8<sup>+</sup>T細胞により認識されうる (Flutter et al., 2004)。その増殖をもたらすCD8<sup>+</sup>T細胞の活性化は、樹状細胞、特殊化した抗原提示細胞 (APC)、提示されるペプチド抗原との相互作用を介して生じる。最初の活性化後、CD8<sup>+</sup>T細胞は強力なキラー細胞であり、自己MHC分子により提示された場合、それらに特異的な活性化ペプチド抗原を発現する細胞を溶解できる。MHCクラスI分子により提示されるペプチドは、細胞質多触媒性プロテアソーム複合体により主に媒介される細胞内タンパク質分解過程の事象に由来する (Guermonprez et al., 2005)。抗原特異的T細胞受容体とMHC / ペプチド抗原複合体との相互作用時、CD8<sup>+</sup>細胞溶解性Tリンパ球 (CTL) はポア形成タンパク質パフォリンおよびグランザイムB (granzyme B) を含むグランザイムを分泌する。これらの顆粒タンパク質は、標的細胞においてカスパーゼカスケードのタンパク質分解活性化と協調し、アポトーシス死を招く (Ashton-Richardt, 2005)。選択的スプライシングを通じて產生される、前立腺および前立腺癌に特異的な転写物およびタンパク質の同定を通じた新規前立腺癌ワクチンの開発には大きな可能性がある。

#### 【0018】

細胞ベースの腫瘍ワクチン治療法の開発のために、抗原提示樹状細胞に焦点が当てられてきた。樹状細胞は専門の抗原提示細胞であり、未感作T細胞の最も強力なアクチベータである (Banchereau and Steinman, 1998; Fong and Engleman, 2000; Schuler et al., 2003)。これらの細胞は、抗原ペプチド、共刺激分子、および / または増殖因子とともに機械的に、および / または遺伝的に操作され、CD8<sup>+</sup>CTLを特異的に活性化できる細胞集団を作り、腫瘍細胞を特異的に標的にして破壊できる (Gabrilovich et al., 1996; Nair et al., 1997; Paglia et al., 1996; Zitvogel et al., 1996; Ashley et al., 1997; Mayordomo et al., 1996; Siders et al., 2003; Chen et al., 2003; Akiyama et al., 2000; Wan et al., 1997; Esslinger et al., 2002; Bonifaz et al., 2002)。様々な樹状細胞ベースの癌ワクチンが臨床試験において試験中である (Berzofsky et al., 2004)。例えば、再発性および転移性の前立腺癌および血清前立腺酸性フォスファターゼ (PAP) の上昇を伴う21人の患者が、ネズミのPAPでバルスした樹状細胞で処置された。処置された患者の10人が、PAPに対するT細胞増殖反応を発現した (Fong et al., 2001)。最近では、樹状細胞の前駆細胞をPAP融合タンパク質に暴露させて、次に患者に投与して、CTL反応を誘発させる (Drugs R&D, 2006)。

#### 【0019】

表面タンパク質を標的とする、癌の処置のための治療抗体の使用は公知である。それらの例としては、B細胞リンパ腫上のCD20を標的とするRITUXAN (商標)、慢性リンパ性白血病により発現される表面抗原CD52を標的とするCampath (商標)、乳癌および他の癌上のerbB2を標的とするHerceptin (商標)、および白血病細胞上で発現されるCD33表面抗原を標的とするMylotargが挙げられる。しかし、今日まで、前立腺癌の処置用モノクローナル抗体は、治療的使用のためには承認されていない。

#### 【発明の概要】

#### 【0020】

本発明は前立腺癌細胞または組織に特徴的な新規の核酸およびアミノ酸の同定に関し、それは被験者におけるこのような病状の治療または診断の標的を表す。

#### 【0021】

本発明は、より具体的には、新規ペプチド配列をコード化する23の特異的な单離核酸分子を開示する。これらの新規配列は、正常前立腺と前立腺癌の間で異なって発現されることが見出されている。これらの配列および分子は、前立腺癌の検出、診断、および処置のための方法および材料を開発するための標的および貴重な情報を表す。

#### 【0022】

前立腺癌の処置および診断のための方法および材料を提供することが本発明の目的である。

#### 【0023】

前立腺癌の処置および診断のための潜在的な遺伝子標的である、前立腺癌組織により発

10

20

30

40

50

現される新規エクソン（新規スプライス変異体）を同定することは、本発明のより具体的な目的である。

【0024】

前立腺癌により特異的に発現される新規遺伝子標的に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与または使用を含む前立腺癌の処置のための新規治療法を開発することは、本発明の具体的な目的である。

【0025】

前立腺癌細胞において特異的に上方制御されるエクソンおよびそれらのエクソンによりコード化される対応するタンパク質ドメインを同定することは、本発明の別の具体的な目的である。

10

【0026】

限定はされないが、モノクローナル抗体を含む特定の前立腺癌によりタンパク質ドメインとして発現される、エクソンによりコード化される抗原に結合するリガンドを産生させることは、本発明の別の具体的な目的である。

【0027】

単剤、もしくは、このような抗原を発現する癌細胞に対する抗原特異的な細胞傷害性T細胞リンパ球応答を誘発するアジュバントとの併用において、特定の前立腺癌により発現される抗原の投与または使用を含む前立腺癌の処置のための新規治療計画を提供することは、本発明の別の具体的な目的である。

20

【0028】

リガンド、特に、特定の前立腺癌により発現される新規抗原に対して特異的に結合するモノクローナル抗体の投与または使用を含む、前立腺癌の処置のための新規治療計画を提供することは、本発明の別の目的である。

【0029】

医薬的に許容可能な担体または賦形剤および／またはアジュバントと併用において、上で定義したリガンドまたは抗原を含む組成物を提供することは、本発明の別の目的である。

30

【0030】

前立腺腫瘍関連抗原を発現するウイルスベクター、前立腺腫瘍関連抗原の直接注入、または裸のDNA発現構築物の形質導入により、細胞ベースの抗腫瘍ワクチン、特に、ペプチドを直接負荷した抗原提示樹状細胞の投与または使用を含む、前立腺癌の処置のための新規治療計画を提供することは、本発明の別の目的である。

【0031】

細菌LPS、TNFアルファ、CD40リガンド、単球馴化培地、またはサイトカインカクテルで成熟させた上記の抗原ペプチドを負荷した樹状細胞からなる細胞ベースの抗腫瘍ワクチンの投与または使用を含む、前立腺癌の処置のための新規治療計画を提供することは、本発明の別の目的である。

40

【0032】

被験者が前立腺癌を発生するリスクの上昇を有する、またはそれに曝されているか否かを検出するために、リガンド、例えば、特定の前立腺癌により特異的に発現される抗原に対して特異的に結合するモノクローナル抗体による前立腺癌の診断のための新規方法を提供することは、本発明の別の目的である。

【0033】

特定の前立腺癌により発現される新規遺伝子標的に対してハイブリダイズする標識DNAの使用により前立腺癌を発生するリスクの上昇を有する、またはそれに曝されているヒトを検出する新規方法を提供することは、本発明の別の目的である。

【0034】

リガンド、例えば、前立腺癌細胞により発現される抗原に対して特異的に結合するモノクローナル抗体、および、検出可能な標識、例えば、指標酵素、放射標識、フルオロフオア、または常磁性粒子を含む、前立腺癌を発生するリスクの上昇を有する、またはそれに

50

曝されているヒトを検出するための診断検査キットを提供することは、本発明のさらに別の目的である。

【0035】

前立腺癌細胞により特異的に発現される新規遺伝子に特異的な核酸（例えば、DNA）プライマーまたはプローブ、および、検出可能な標識、例えば、指標酵素、放射標識、フルオロフォア、または常磁性粒子を含む、前立腺癌を発生する高リスクを有する、またはそれに曝されているヒトを検出するための診断キットを提供することは、本発明の別の目的である。

【0036】

候補化合物が、好ましくは選択的に、本出願において開示する抗原またはポリヌクレオチドに結合するか否かの判定を含む、生物活性化合物を選択、同定、スクリーニング、特性付け、最適化するための方法を提供することは、本発明の別の目的である。このような化合物は、癌疾患、特に前立腺癌を処置するための薬物候補またはリードを表す。

10

【0037】

前立腺癌細胞において変化型で発現される遺伝子を同定することは、本発明の別の目的である。これらの型は遺伝子のスプライス変異体を表わし、ここでDATAS（商標）フラグメントは、1) 遺伝子内で生じるスプライス事象を示す、または2) 活発にスプライシングされ、異なる遺伝子産物を產生する遺伝子を指摘する、のいずれかである。これらの異なるスプライス変異体またはアイソフォームは、治療介入のための標的となりうる。

20

【0038】

発明の詳細な説明  
DATAS (Different Analysis of Transcripts with Alternative Splicing) によって発現された遺伝子間での構造的差異を分析し、RNAスプライシングの変化への体系的アプローチを提供する（米国特許第6,251,590号において開示されており、開示はその全体が参照により組み入れられる）。これらのスプライス配列に対する接近手段を有することは、細胞のホメオスタシスのために重大であり、機能的ゲノムにおける有用な進歩を表す。

30

【0039】

DATAS Technologyによって、正常組織対腫瘍組織など、2つのサンプルを比較する際に2つのライブラリーが作成される。各ライブラリーには、1つのサンプルにおいて存在し、より高発現される配列のクローンが含まれる。例えば、ライブラリーAには、正常サンプル中の遺伝子において存在するが、しかし、腫瘍サンプル中には存在しない配列が含まれる。これらの配列は、腫瘍サンプルにおいて遺伝子から除去された、またはスプライスアウト (spliced out) されたものとして同定される。対照的に、ライブラリーBには、腫瘍サンプル中にのみ存在し、正常サンプル中には存在しない配列が含まれる。これらは腫瘍サンプルにおいてのみ発現される遺伝子に選択的スプライシングされるエクソン／イントロンを表す。

30

【0040】

本発明は、一部において、DATASを使用して単離され、次に前立腺腫瘍サンプルにおいて差異的に制御される、または発現されることが決定されるエクソンの同定に基づいている。加えて、本発明は、細胞表面上で発現されない前立腺腫瘍特異的または前立腺特異的であるエクソンを提供し、これらは予防ワクチンおよび治療ワクチンを含む前立腺腫瘍ワクチンの調製において有用となりうる。具体的には、DATASを通じて23の発現配列タグが同定され、正常前立腺組織と前立腺腫瘍組織の間で異なって発現されることが確認された。これらのDATASフラグメント (DF) は、1つのサンプルにおいて包含または除外のために選択されるが、他においてはされない遺伝子の小区分である。これらの小区分は、発現された遺伝子転写物の一部であり、限定はされないが、单一のエクソンの部分、いくつかのエクソン、イントロンからの配列、およびエクソンおよびイントロンからの配列を含む、遺伝子のいくつかの異なる領域に由来する配列からなりうる。異なる生物サンプルにおけるエクソンのこの選択的使用によって、選択的RNAスプライシングとして当技術分野において周知の過程を通じて同じ遺伝子から異なる遺伝子産物が產生される。特に、DATASフ

40

50

ラグメント配列から23の選択的スプライシングアイソフォームが同定されており、以下の標的および遺伝子産物に関するすべての記載に適合する選択的遺伝子産物を产生する。

#### 【0041】

同じ遺伝子から產生される選択的スプライシングされたmRNAには異なるリボヌクレオチド配列が含まれ、したがって異なるアミノ酸配列を伴うタンパク質に翻訳される。遺伝子産物に、またはそれから選択的にスプライシングされる核酸配列は、元の遺伝子配列からインフレームで、またはアウトフレームで挿入または欠失できる。これは、各変異体からの異なるタンパク質の翻訳をもたらす。差異として、単なる配列の欠失または遺伝子産物に挿入された新規配列情報を挙げてよい。アウトフレームで挿入された配列は、早期停止コドンの產生をもたらし、切断型タンパク質を产生できる。あるいは、核酸のインフレーム挿入は、mRNAから発現される追加のタンパク質ドメインを引き起こしうる。最終段階の標的は、新規のエピトープまたは機能のいずれかを含む新規タンパク質である。周知の遺伝子の多くの変異が同定されており、タンパク質の元の生物活性を伴うアゴニストまたはアンタゴニストでありうるタンパク質変異体を产生する。

10

#### 【0042】

このように、DATASフラグメントによって前立腺癌細胞において差異的制御や選択的なスプライシングを受ける遺伝子およびタンパク質が同定される。このように、DATASフラグメントによって前立腺癌の診断または治療に適した標的分子の定義が可能になり、それらの標的分子には、DATASフラグメントの配列またはDATASフラグメントの配列が由来する遺伝子またはRNAを含む遺伝子またはRNAのすべて、または部分、および、対応するポリペチドまたはタンパク質、およびこれらの変異体が含まれる。

20

#### 【0043】

本発明の特定の目的は、以下：

- (i)配列番号1～23のいずれか1つの配列からなる核酸；
- (ii)(i)の変異体であって、ここで前記の変異体が、ギャップを許容することなく整列された場合に配列と少なくとも70%同一である核酸配列を有する変異体；および、
- (iii)少なくとも20ヌクレオチド長のサイズを有する(i)または(ii)のフラグメント。  
からなる群より選択される単離核酸（例えば、DNA、RNAなど）分子（ヒト前立腺癌細胞により発現される）に存する。

30

#### 【0044】

本発明の他の目的は、ポリペプチド（抗原）（ヒト前立腺癌細胞により発現される）存し、ここで前記のポリペプチドが以下：

- (i)配列番号1～23のいずれか1において少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列によりコード化される抗原；
- (ii)配列番号1～23のいずれか1において少なくとも90%の同一性を有する配列を含むタンパク質に由来する抗原；および、
- (iii)(i)または(ii)の抗原フラグメント。  
からなる群より選択される。

40

#### 【0045】

第1のタイプの標的分子は、本出願において開示する通り、DATASフラグメントの配列を含む完全な遺伝子またはRNA分子の配列を含む標的核酸分子である。実際に、DATASフラグメントによって前立腺腫瘍に関連する遺伝子の脱制御が同定されるため、前記のDATASフラグメントが由来する全体の遺伝子またはRNA配列を治療介入または診断の標的として使用できる。

#### 【0046】

同様に、別のタイプの標的分子は、本出願において開示する通り、DATASフラグメントによりコード化されるアミノ酸配列を含む全長タンパク質の配列を含む標的ポリペプチド分子である。

#### 【0047】

さらなるタイプの標的分子は、上で開示する通り、遺伝子またはRNAのフラグメントを

50

含む標的核酸分子である。実際に、DATASフラグメントによって前立腺腫瘍細胞において変化している遺伝子やRNAが同定されるため、DATASフラグメントの配列を含まない部分などの、このような遺伝子またはRNAの部分を治療介入または診断の標的として使用できる。このような部分の例としては：DATASフラグメント、それらの部分、前記の遺伝子またはRNAの選択的エクソンまたはイントロン、前記のRNAなどにおいてスプライシングにより作成されるエクソン-エクソン、エクソン-イントロン、またはイントロン-イントロン接合部の配列が挙げられる。特定の部分は、ポリペプチドの細胞外ドメインをコード化する配列を含む。

#### 【0048】

同様に、別のタイプの標的分子は、本出願において開示する通り、DATASフラグメントによりコード化されるアミノ酸配列を含むタンパク質のフラグメントである。このようなフラグメントは、DATAS配列を含む、または含まないことがあり、例えば、フレームシフト、新規エクソン-エクソンまたはエクソン-イントロン接合部、新規停止コドンの作製などに起因する新しく作成されたアミノ酸配列を含みうる。

10

#### 【0049】

これらの標的分子（遺伝子、フラグメント、タンパク質、およびそれらの変異体を含む）は、診断剤として、および治療剤の開発のための標的としての役割を果たす。例えば、これらの治療剤は、前立腺腫瘍の生存に関連する生物学的過程を調節しうる。前立腺腫瘍細胞におけるアポトーシス（細胞死）の誘導に関連する薬剤も同定されうる。モノクローナル抗体などの他の物質を開発することもでき、これらはタンパク質またはその変異体に結合して、細胞増殖のために重要な生物学的過程を変化させる。あるいは、抗体によって、細胞増殖を阻止し、細胞死をもたらすことのできる毒素を送達できる。

20

#### 【0050】

具体的には、本発明は、変異タンパク質において発現され、前立腺腫瘍に特異的な、または前立腺に特異的な配列を提供する。これらの配列は、バイオインフォマティクス分析を通じて細胞の細胞膜において同定された遺伝子の部分であり、本発明の特定の配列はタンパク質の細胞外領域上で発現され、そのために、配列は、予防および治療用の細胞ベースおよび非細胞ベースのワクチンを含む前立腺腫瘍ワクチンの調製において有用となりうる。

30

#### 【0051】

これらに基づいて、異なって発現される配列および対応する変異タンパク質に関連する開示された遺伝子は、前立腺癌の治療、予防、または診断のための、例えば、抗体、低分子インヒビター、アンチセンス治療薬、およびリボザイムの開発のための適当な標的になることが予測される。以下では、潜在的な治療法がより詳細に記載されている。

#### 【0052】

このような治療法には、前立腺癌において上方制御されていると思われる、対象となる核酸に対してアンチセンス方向の配列を有するオリゴヌクレオチドの合成が含まれる。適当な治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、2～数百ヌクレオチド長まで、より典型的には約50～70ヌクレオチド長まで、長さが変化する。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、裸の核酸または保護型、例えば、リポソーム中に封入して投与できる。インビボでの安定性が増強され、これにより標的部位、すなわち、前立腺腫瘍細胞への送達が促進されうるため、リポソーム型または他の保護型の使用は有利なことがある。

40

#### 【0053】

また、対象となる新規遺伝子を使用して、前立腺腫瘍細胞において対応するmRNAの切断を標的とする新規リボザイムをデザインできる。同様に、これらのリボザイムを遊離（裸）型で、もしくは安定性および/または標的化を増強する送達系、例えば、リポソームの使用により投与できる。

#### 【0054】

また、本発明には、以下で同定される新規核酸標的にハイブリダイズする核酸の使用の

50

施行が包含され、それらは、これらの核酸を発現する細胞、すなわち、前立腺腫瘍細胞を選択的に標的にし、殺すために、治療用エフェクター成分、例えば、放射標識（例えば、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{I}$ ）、細胞毒素、細胞傷害性酵素などに結合される。

#### 【0055】

また、本発明には、変化した遺伝子または対応する変化したタンパク質、特に、前立腺腫瘍細胞において変化型で発現するスプライス変異体を標的にすることによる前立腺癌の処置および／または診断が包含される。これらの方法は、これらの変化型を発現して、それにより正常細胞に対する有害効果を最小限にする細胞の選択的検出および／または細胞の根絶を提供する。

#### 【0056】

さらに、本発明には非核酸ベースの治療法が包含される。例えば、本発明には、本明細書において同定される新規抗原に対応する新規cDNAの1つを含むDNAの使用が包含される。このようにコード化される抗原が治療用または予防用の抗腫瘍ワクチンとして使用されうることが予測される。例えば、これらの抗原の特定の検討される用途には、細胞傷害性Tリンパ球応答を誘導するアジュバントとそれらの投与が含まれる。

#### 【0057】

アジュバントとの併用での対象となる新規抗原の投与は、このような抗原に対する液性免疫応答をもたらし、それにより前立腺癌の発生を遅延または予防しうる。

#### 【0058】

本発明のこれらの実施態様には、理想的にはアジュバント、例えば、特に、PROVAX（商標）、ISCOM'S（登録商標）、DETOX（登録商標）、SAF、フロイントアジュバント、Alum（登録商標）、Saponin（登録商標）との併用での、1以上の対象となる新規前立腺癌抗原の投与が含まれる。この組成物は、治療または予防に有効となる十分量、例えば、約50～20,000 mg/kg体重、約100～5,000 mg/kg体重で投与されうる。

#### 【0059】

本発明の追加の実施態様には、直接混合、前立腺腫瘍関連抗原を発現するウイルスベクターとの形質導入、前立腺腫瘍関連抗原または裸のDNA発現構築物の直接注入による新規抗原ペプチドを負荷した抗原提示樹状細胞の投与が含まれる。これらの負荷された樹状細胞を、投与前に、細菌LPS、TNFアルファ、CD40リガンド、単球馴化培地、またはサイトカイン・カクテルで成熟できる。

#### 【0060】

本発明のさらに別の実施態様は、以下に開示する核酸配列を含む新規遺伝子によりコード化される抗原に対するモノクローナル抗体の調製を含む。このようなモノクローナル抗体は、従来の方法により產生され、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、单鎖抗体、例えば、scFv'sおよびFabフラグメントおよびFab'フラグメントなどの抗原結合抗体が挙げられる。モノクローナル抗体の調製のための方法は当業者には公知である。一般的に、モノクローナル抗体の調製には、適当な（非相同）宿主の対象となる前立腺癌抗原での免疫化、そこからの免疫細胞の単離、モノクローナル抗体を単離するためのこのような免疫細胞の使用、およびこれらの抗原のいずれかに特異的に結合するモノクローナル抗体のスクリーニングが含まれる。抗体フラグメントは、公知の方法、例えば、モノクローナル抗体の酵素的変化により調製できる。

#### 【0061】

これらのモノクローナル抗体およびフラグメントは受動抗腫瘍免疫療法に有用であり、または、標的細胞毒性を提供する、すなわち、ヒト前立腺腫瘍細胞を殺すために、例えば、治療用エフェクター成分、例えば、放射標識、細胞毒素、治療用酵素、アポトーシスを誘導する薬剤などに結合できる。対象となる遺伝子が多くの正常組織により見掛け上有意に発現されていないとの事実を踏まえると、これは有意な有害効果（非標的組織に対する毒性）をもたらさないはずである。

#### 【0062】

本発明の一実施態様において、このような抗体またはフラグメントを単剤で、もしくは

10

20

30

40

50

他の治療薬、例えば、前立腺癌治療に適したシスプラチン、メトトレキサート、アドリアマイシンなどの化学療法薬との併用で、標識型または未標識型で投与する。投与される組成物には、典型的に、治療的使用のための抗体組成物において使用される医薬的に許容可能な担体、および場合によりアジュバント、安定化剤なども含まれる。

【0063】

好ましくは、対象となるモノクローナル抗体は、高い親和性で標的抗原に結合し、例えば、約 $10^{-6}$  ~  $10^{-12}$  Mの結合親和性 (Kd) を持つ。

【0064】

記述の通り、本発明には、本明細書において開示する前立腺特異的スプライス変異体の発現の検出を提供する診断用途も包含される。これには、RNAレベルおよび/またはタンパク質レベルでのこれらの遺伝子の1以上の発現の検出が含まれる。10

【0065】

核酸では、対象となる遺伝子の発現は、公知の核酸検出方法、例えば、ノーザンプロットハイブリダイゼーション、鎖置換増幅 (SDA : strand displacement amplification)、触媒ハイブリダイゼーション増幅 (CHA : catalytic hybridization amplification)、および他の公知の核酸検出方法により検出される。好ましくは、cDNAライブラリーは、本出願において開示する新規アイソフォームに対応するプライマーを使用するPCRにより、前立腺癌の検査を受ける被験者から得られた前立腺細胞から作られる。

【0066】

PCR産物が得られるか否か、および発現レベルに基づいて、前立腺癌の有無を決定できる。特定の前立腺癌患者の予後を決定するために、このようなPCR産物の発現レベルを定量化できる（疾患が進行するにつれてPCR産物の発現レベルが上昇または低下することが多いためである）。これによって前立腺癌患者の状態をモニタリングするための方法を提供できる。20

【0067】

あるいは、生体液、例えば、血液、尿、リンパ液などを、本明細書において開示する、新規前立腺腫瘍に特異的に結合する抗体または抗体群またはフラグメントにより検査することにより、前立腺癌の検査を受ける被験者の状態を評価できる。抗原発現を検出する抗体を使用するための方法は周知であり、ELISA、競合結合アッセイなどが挙げられる。一般的に、このようなアッセイでは、検出を提供する標識、例えば、指標酵素、放射標識、フルオロフォア、または常磁性粒子に直接的または間接的に結合した標的抗原に対して特異的に結合する抗体または抗体フラグメントを使用する。30

【0068】

前立腺細胞上での抗原の存在の増強に関する検査で陽性である患者は、前立腺癌を発生するリスクの上昇を有する、またはそれに曝されていると診断される。加えて、抗原の発現レベルは、患者の状態、すなわち、疾患がどの程度進行したか（前立腺癌の病期）を決定する際に有用になりうる。

【0069】

記述の通り、本発明は、ヒトの前立腺癌と相關する抗原をコード化する新規スプライス変異体を提供する。本発明にはこれらの変異体も包含される。本明細書において使用される通り、「変異体 (variant)」とは、これらのDNA配列を、対象となるDNA配列または少なくとも約50ヌクレオチドのサイズを有するこれらのフラグメントをコード化する核酸配列と比較した場合、これと少なくとも約75%同一である、より好ましくは少なくとも約85%同一である、最も好ましくは少なくとも90%同一である、一層好ましくは少なくとも95~99%同一である配列を意味する。これには対象となる遺伝子の対立遺伝子変異体またはスプライス変異体が含まれる。本発明には、例えば、以下に記載される高、中、または低ストリングエンシーな条件下で対象となるスプライス変異体とハイブリダイズする核酸配列も包含される。40

【0070】

また、本発明は、所望の細胞材料、典型的にはヒト前立腺の細胞サンプルまたは組織サ

10

20

30

40

50

ンブルから得られるmRNAライブラリーにおいて対象となる新規遺伝子またはそれらの部分をコード化するDNAの増幅をもたらすプライマー組を提供する。典型的には、このようなプライマーは約12～100ヌクレオチドの長さであり、標的遺伝子の全体または大部分の増幅を提供するように構築される。

【0071】

また、本発明は、完全長の抗原に対する特異的な抗体に結合する、またはそれを誘発する、対象となるDNAまたはそれらのフラグメントによりコード化される抗原が包含される。典型的には、このようなフラグメントは、少なくとも10アミノ酸長であり、より典型的には、少なくとも25アミノ酸長である。

【0072】

記述の通り、対象となるDNAフラグメントは、検査される前立腺腫瘍サンプルの大半において発現される。本発明では、このような遺伝子を発現する他の癌の同定、および、このような癌を検出および処置するためのこれらの使用についてさらに検討する。例えば、対象となるDNAフラグメントまたはそれらの変異体を、他の癌、例えば、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、肺癌、または前立腺癌上で発現できる。本質的に、本発明には任意の癌の検出が含まれ、ここで対象となる新規遺伝子またはそれらの変異体の発現は、癌または癌の可能性の上昇と相關する。本発明の研究を促進するために、以下の定義を提供する。

【0073】

「単離された腫瘍抗原または腫瘍タンパク質」とは、その正常な細胞環境にない任意のタンパク質を指す。これには、例として、以下に開示する遺伝子によりコード化される組換えタンパク質を含む組成物、そのような精製タンパク質を含む医薬的組成物、そのような精製タンパク質を含む診断用組成物、およびそのようなタンパク質を含む単離タンパク質組成物が含まれる。好ましい実施態様において、他のタンパク質が実質的に含まれず、好ましくは少なくとも90%純粋であり、本明細書において含まれるアミノ酸配列、または本質的に同じ配列を有する天然ホモログもしくは変異体が含まれるという点において、本発明の単離された前立腺腫瘍タンパク質には実質的に純粋なタンパク質が含まれる。天然変異体は、例えば、本発明の変異タンパク質をコード化する遺伝子を発現する腫瘍細胞において見出されうる。

【0074】

「天然の腫瘍抗原または腫瘍タンパク質」とは、以下に含まれるアミノ酸配列を有するタンパク質のヒト以外の靈長類のホモログであるタンパク質を指す。

【0075】

「単離された前立腺腫瘍遺伝子または核酸配列」とは、本発明の腫瘍抗原をコード化する核酸分子を指し、それはその正常なヒト細胞環境中ではなく、例えば、ヒトまたはヒト以外の靈長類の染色体DNAには含まれない。これには、例として、本発明の遺伝子を含むベクター、本発明の遺伝子、および検出可能な成分、例えば、蛍光標識または放射標識に直接的または間接的に結合された核酸配列を含むプローブ、または5'末端もしくは3'末端で異なるDNA、例えば、プロモーターまたは検出可能なマーカーもしくはエフェクター成分をコード化するDNAに融合された本発明の遺伝子をコード化する核酸分子を含むDNA融合体が挙げられる。実質的に同じ配列を有する天然ホモログまたは変異体も含まれる。縮重である天然ホモログ(homologue)は、対応するアミノ酸配列を変化させないヌクレオチドの差異を含む同じタンパク質をコード化しうる。天然変異体は腫瘍細胞において見出されうるが、ここでこのようなヌクレオチドの差異は変異腫瘍抗原をもたらしうる。保存的置換を含む天然ホモログも含まれる。

【0076】

「前立腺腫瘍抗原または腫瘍タンパク質の変異体」とは、対応する天然腫瘍抗原と、少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも91%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも92%の配列同一性、一層好ましくは少なくとも93%の配列同一性、一層好ましくは少なくとも94%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の配列同一性、一層好ましくは少なくとも96%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも97%の配列同一性、一

10

20

30

40

50

層好ましくは少なくとも98%の配列同一性、および最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を持つアミノ酸配列を持つタンパク質を指し、ここで配列同一性は以下に定義される通りである。好ましくは、この変異体は、天然タンパク質と共に少なくとも1つの生物学的特性を持つ。

#### 【0077】

「前立腺腫瘍遺伝子または核酸分子または配列の変異体」とは、対応する天然ヒト核酸配列と、少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも91%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも92%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも93%の配列同一性、一層好ましくは少なくとも94%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の配列同一性、一層好ましくは少なくとも96%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも97%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも98%の配列同一性、および最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を持つアミノ酸配列を指し、ここで「配列同一性」は以下に定義される通りである。

#### 【0078】

「核酸分子または配列をコード化する前立腺癌抗原のフラグメント」とは、天然ヒト遺伝子の部分に対応する核酸配列を指し、ここで前記の部分は、少なくとも約50ヌクレオチド長、または100、より好ましくは少なくとも150ヌクレオチド長である。

#### 【0079】

「前立腺腫瘍抗原の抗原フラグメント」とは、それ自体で使用される場合、または免疫原性担体に結合された場合、タンパク質に特異的に結合する抗体を誘発させる前立腺タンパク質またはその変異体もしくはホモログのフラグメントに対応するポリペプチドを指す。典型的に、このような抗原フラグメントは、少なくとも8~15アミノ酸長であり、ずっと長くなりうる。

#### 【0080】

配列同一性またはパーセント同一性は、Lasergene biocomputing software (DNASTAR, INC, Madison, WI)における複数配列アラインメントのClustal法[Higgins et al., CABIOS 8: 189-191 (1992)]、またはGenetics Computer Group (GCG Wisconsin package, Accelrys, San Diego, CA)から入手可能なアラインメントプログラムを使用して2つの配列を整列した場合、ヒトタンパク質Aまたはタンパク質Bまたは遺伝子Aもしくは遺伝子Bと言及される2つの配列の間で共有される同じ残基のパーセンテージを意味することを意図している。この方法において、複数アラインメントが漸進的に行われ、ここでは一連のペアワイスアラインメントから計算される類似性スコアを使用してより大きなアラインメント群が組み立てられる。最高アラインメントスコア (maximum alignment score)を見出すことにより最適な配列アラインメントが得られ、これは、所与の進化間隔のわたる2つの関連するタンパク質において生じる所与のアミノ酸変化の可能性を表す残基重量表から決定される、アラインメントにおける別々の残基の間のすべてのスコアの平均である。アラインメントにおけるギャップを開く、および、長くすることのペナルティは、スコアに寄与する。このプログラムで使用するデフォルトパラメーターは以下の通りである：複数アラインメントでのギャップペナルティ = 10；複数アラインメントでのギャップ長ペナルティ = 10；ペアワイスアラインメントにおけるk-組値 = 1；ペアワイスアラインメントにおけるギャップペナルティ = 3；ペアワイスアラインメントにおけるウインドウ値 = 5；ペアワイスアラインメントにおける保存された斜線 = 5。アラインメントプログラムのために使用した残基重量表はPAM250である[Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff, Ed., NDRF, Washington, Vol. 5, suppl. 3, p.345, (1978)]。

#### 【0081】

同一残基のパーセンテージを2つの残基が保存置換を表す位置のパーセンテージに加えることにより、保存率は上のアラインメントから計算される (PAM250残基重量表における0.3より大きいまたは等しいログオッズ値を有すると定義される)。保存率を決定する際のヒト以外の遺伝子Aまたは遺伝子B、例えば、マウス遺伝子Aまたは遺伝子Bと共に、保存率を決定する際のヒト遺伝子Aまたは遺伝子Bに対して保存が参照される。必要条件を満た

10

20

30

40

50

す保存アミノ酸変化として、R-K；E-D、Y-F、L-M；V-I、Q-Hが挙げられる。

#### 【0082】

##### ポリペプチドフラグメント

本発明は、開示するタンパク質のポリペプチドフラグメントを提供する。本発明のポリペプチドフラグメントは、タンパク質またはそのアナログの少なくとも8、より好ましくは少なくとも25、一層好ましくは少なくとも50個のアミノ酸残基を含みうる。より好ましくは、このようなフラグメントは、対応する遺伝子によりコード化されるポリペプチドの少なくとも75個、100個、125個、150個、175個、200個、225個、250個、275個の残基を含む。さらに好ましくは、タンパク質は、天然タンパク質の大部分、例えば、天然タンパク質の約100の連続残基を含む。

10

#### 【0083】

##### 生物活性変異体

本発明は、天然タンパク質と少なくとも80%、より好ましくは90%、一層好ましくは95～99%類似であるアミノ酸配列を含む、以下に開示する新規前立腺タンパク質の変異体も包含する。

#### 【0084】

生物活性または免疫活性を無効にすることなく、いずれのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失できるかを決定する際のガイダンスは、DNASTARまたはGenetics Computer Group (GCG) からのソフトウェアなどの当技術分野において周知のコンピュータプログラムを使用して見いだせる。好ましくは、タンパク質の変異体におけるアミノ酸変化は、保存アミノ酸変化、すなわち、類似の荷電または非荷電アミノ酸の置換である。保存アミノ酸変化として、その側鎖において関連するアミノ酸のファミリーの1つの置換が挙げられる。天然アミノ酸は一般的に4つのファミリーに分割される：酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性アミノ酸（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、および非荷電極性アミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、シスチン、セリン、トレオニン、チロシン）。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、一緒に芳香族アミノ酸として分類されることがある。

20

#### 【0085】

ムテインと呼ばれる変異体のサブセットは、セリンなどの中性アミノ酸が、ジスルフィド結合に関与しないシステイン残基の代わりに用いられるポリペプチドの群である。これらの変異体は天然の分泌タンパク質よりも広い温度範囲にわたり安定でありうる。Markらの米国特許第4,959,314号を参照されたい。

30

#### 【0086】

ロイシンとイソロイシンまたはバリン、アスパラギン酸とグルタミン酸、スレオニンとセリンの単独置換、またはアミノ酸と構造的に関連するアミノ酸の類似の置換は、得られる分泌タンパク質またはポリペプチド変異体の生物学的特性に対して大きな効果はない予測することが妥当である。

#### 【0087】

タンパク質変異体として、グリコシリ化型、他の分子との凝集コンジュゲート、および無関係な化学成分との共有結合コンジュゲートが挙げられる。また、タンパク質変異体として、対立遺伝子変異体、種変異体、およびムテインも挙げられる。遺伝子の発現差異に影響を及ぼさない領域の切断または欠失も変異体である。共有結合変異体は、当技術分野において公知の通りに、アミノ酸鎖において、またはN末端残基もしくはC末端残基で見いだされる基に官能基を連結させることにより調製できる。

40

#### 【0088】

本発明の前立腺タンパク質の一部のアミノ酸は、タンパク質の構造または機能に対する有意な効果なく変えられることが認識される。配列におけるこのような差異を検討する場合、活性を決定するタンパク質上の重大な領域が存在することを記憶しておく必要がある。一般的に、類似の機能を実施する残基を使用するという条件で、三次構造を形成する残

50

基を置換することが可能である。他の場合において、変化がタンパク質の重大ではない領域で生じる場合、残基のタイプは全く重要ではないことがある。アミノ酸の置換によって細胞表面受容体に対する結合の選択性も変化しうる。Ostade et al., *Nature* 361: 266-268 (1993)には、公知の2タイプのTNF受容体の一方のみに対するTNF-アルファの選択性的結合をもたらす特定の突然変異が記載される。このように、本発明のポリペプチドは、天然突然変異または人為的操作のいずれでも、1以上のアミノ酸の置換、欠失、または付加を含みうる。

#### 【0089】

本発明は、同等の発現パターンを示す、または抗原領域を含む、以下に開示する前立腺タンパク質の変異を含む。このような変異体として、欠失、挿入、逆位、反復、および部位置換が挙げられる。いずれのアミノ酸変化が表現型的にサイレントである可能性が高いのかに関するガイダンスは、Bowie, J. U., et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," *Science* 247: 1306-1310 (1990)において見いだせる。

10

#### 【0090】

別の荷電アミノ酸での、および、中性アミノ酸または負荷電アミノ酸での荷電アミノ酸の置換が特に対象となる。後者の例は、正荷電の減少したタンパク質をもたらし、開示されるタンパク質の特性を改善させる。凝集の防止が非常に望ましい。タンパク質の凝集は、活性の喪失をもたらすのみでなく、それらが免疫原性を有しうるため、医薬製剤を調整する際に問題にもなりうる。(Pinckard et al., *Clin. Exp. Immunol.* 2:331-340 (1967) ; Robbins et al., *Diabetes* 36: 838-845 (1987) ; Cleland et al., *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10: 307-377 (1993))。

20

#### 【0091】

機能のために必須である本発明のポリペプチド中のアミノ酸は、部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキャニング突然変異誘発などの当技術分野において公知の方法により同定できる (Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989))。後者の手順により、分子中の各残基に単一のアラニン突然変異が導入される。次に、天然または人工結合パートナーに対する結合などの生物活性について得られた突然変異分子を試験する。リガンド受容体結合のために重大である部位は、結晶化、核磁気共鳴分析法、または光親和性標識などの構造解析により決定することもできる (Smith et al., *J Mol. Biol.* 24: 899-904 (1992) および de Vos et al. *Science* 255: 306-312 (1992))。

30

#### 【0092】

示した通り、変化は、好ましくは、タンパク質の折り畳みまたは活性に有意な影響を与えない保存アミノ酸置換などの軽度のものである。無論、当業者が作製しうるアミノ酸置換の数は、上に記載したものを含む多くの因子に依存する。一般的に言って、任意の所とのポリペプチドのための置換の数は、50個、40個、30個、25個、20個、15個、10個、5個、または3個を超えない。

#### 【0093】

##### 融合タンパク質

対象となる前立腺腫瘍抗原のタンパク質またはポリペプチドフラグメントを含む融合タンパク質を構築することもできる。融合タンパク質は、アミノ酸配列に対する抗体を作成するため、および様々なアッセイ系における使用のために有用である。例えば、融合タンパク質を使用して、本発明のタンパク質と相互作用する、またはその生物学的機能と干渉するタンパク質を同定できる。タンパク質親和性クロマトグラフィーなどの物理的方法、または酵母ツーハイブリッドもしくはファージディスプレイ系などのタンパク質タンパク質相互作用のためのライプラリーベースのアッセイをこの目的のために使用することもできる。このような方法は当技術分野において周知であり、薬物スクリーンとして使用することもできる。本発明のシグナル配列および / または膜貫通ドメインまたはこれらのフラグメントを含む融合タンパク質を使用して、細胞膜に結合する、または細胞外に分泌されるなど、ドメインが通常見出されない細胞部位に対して他のタンパク質ドメインを標的に

40

50

できる。

【0094】

融合タンパク質は、ペプチド結合により一緒に融合された2つのタンパク質セグメントを含む。記述の通り、これらのフラグメントは、約8つのアミノ酸から全長のタンパク質までサイズが変動しうる。

【0095】

第二のタンパク質セグメントは、全長タンパク質またはポリペプチドフラグメントでよい。融合タンパク質の構築において一般に使用されるタンパク質としては、<sup>10</sup> -ガラクトシダーゼ、<sup>-</sup>グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)を含む自己励起蛍光タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、ルシフェラーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)が挙げられる。加えて、ヒスチジン(His)タグ、FLAGタグ、インフルエンザの血球凝集素(HA)タグ、Mycタグ、VSV-Gタグ、およびチオレドキシン(Trx)タグを含む、エピトープタグを融合タンパク質の構築において使用できる。他の融合構築物としては、マルトース結合タンパク質(MBP)、S-タグ、Lex DNA結合ドメイン(DBD)融合物、GAL4 DNA結合ドメイン融合物、およびヘルペス単純ウイルス(HSV)BP 16タンパク質融合物を挙げてよい。

【0096】

これらの融合物は、例えば、2つのタンパク質セグメントを共有結合させることにより<sup>20</sup>、または分子生物学の技術分野における標準的な手順により作製できる。組換えDNA方法を使用して、例えば、当技術分野において公知の通りに、適当な読み枠において本発明の可能な抗原をコード化するコード配列またはそのフラグメントを、第二タンパク質セグメントをコード化するヌクレオチドと共に含むDNA構築物を作製することにより、および宿主細胞においてDNA構築物を発現させることにより融合タンパク質を調製できる。融合タンパク質を構築するための多くのキットが、例えば、Promega Corporation(Madison, WI)、Stratagene(La Jolla, CA)、Clontech(Mountain View, CA)、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)、MBL International Corporation(MIC; Watertown, MA)、およびQuantum Biotechnologies(Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS)を含む、研究所に実験用ツールを供給する企業から入手可能である。

【0097】

本発明のタンパク質、融合タンパク質、またはポリペプチドを組換えDNA方法により<sup>30</sup>产生できる。組換えタンパク質、融合タンパク質、またはポリペプチドの产生のために、当技術分野において公知の発現系を使用し、タンパク質をコード化する配列を原核生物または真核生物の宿主細胞において発現できる。これらの発現系として、細菌、酵母、昆虫、および哺乳動物の細胞が挙げられる。

【0098】

次に、得られた発現タンパク質を当技術分野において公知の精製手順を使用し、培養液または培養細胞の抽出物から精製できる。例えば、培養液中に十分に分泌されたタンパク質のために、無細胞培地を酢酸ナトリウムで希釈し、陽イオン交換樹脂、続いて疎水性相互作用クロマトグラフィーに接触できる。この方法を使用し、所望のタンパク質またはポリペプチドは典型的に95%超純粹である。例えば、上に列挙した技術のいずれか1つを使用し、さらなる精製に着手できる。<sup>40</sup>

【0099】

機能的タンパク質を得るために、例えば、適当な部位のリン酸化またはグルコシル化により、酵母または細菌において産生されるタンパク質を改変する必要がありうる。公知の化学的方法または酵素的方法を使用して、このような共有結合を作製できる。

【0100】

本発明のタンパク質またはポリペプチドを、精製を促進する型で培養宿主細胞において<sup>50</sup>発現させることもできる。例えば、タンパク質またはポリペプチドを、例えば、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、またはチオレドキシンを含む

融合タンパク質として発現させ、市販のキットを使用して精製できる。このような融合タンパク質の発現および精製のためのキットは、New England BioLabs、Pharmacia、およびInvitrogenなどの企業から入手可能である。タンパク質、融合タンパク質、またはポリペプチドを、「Flag」エピトープ(Kodak)などのエピトープでタグ付けして、そのエピトープに対して特異的に結合する抗体を使用して精製することもできる。

#### 【0101】

本明細書において開示する配列を通じて同定されるタンパク質変異体のコード配列を使用し、マウス、ラット、モルモット、ウシ、ヤギ、ブタ、またはヒツジなどのトランスジェニック動物を構築することもできる。次に雌のトランスジェニック動物は、その乳汁中に本発明のタンパク質、ポリペプチド、または融合タンパク質を産生できる。このような動物を構築するための方法は、当技術分野において公知であり、広く使用される。

10

#### 【0102】

あるいは、固相ペプチド合成などの合成化学的方法を使用し、分泌タンパク質またはペプチドを合成できる。ペプチド、アナログ、または派生物の産生のため的一般的な手段は、Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins -- A Survey of Recent Developments, B. Weinstein, ed. (1983)において概説されている。通常のL-立体異性体の代わりにD-アミノ酸を用いることで、分子の半減期を上昇できる。

#### 【0103】

典型的には、相同ポリペプチド配列は、当技術分野において公知の通りに、ストリンジエントな条件下でのハイブリダイゼーションにより確認できる。例えば、以下の洗浄条件を使用し、最大で約25～30%の塩基対ミスマッチを含む相同配列を同定できる：2×SSC(0.3 M NaCl、0.03 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、0.1% SDS、室温で2回、それぞれ30分；次に2×SSC、0.1% SDS、50℃で1回、30分；次に2×SSC、室温で2回、それぞれ10分。より好ましくは、相同核酸鎖は15～25%の塩基対ミスマッチ、さらに好ましくは5～15%の塩基対ミスマッチを含む。

20

#### 【0104】

本発明は、例えば、ノーザンプロッティングまたはサザンプロッティングまたはin situハイブリダイゼーションなどのハイブリダイゼーションプロトコルにおいて相補ヌクレオチド配列を検出するために使用できるポリヌクレオチドプローブも提供する。本発明のポリヌクレオチドプローブは、本明細書において提供する核酸配列の少なくとも12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、30個、または40個またはそれ以上の連続ヌクレオチドを含む。本発明のポリヌクレオチドプローブは、ラジオアイソトープ標識、蛍光標識、酵素標識、または化学発光標識などの検出可能な標識を含んでよい。

30

#### 【0105】

本明細書において開示するcDNA配列に対応する単離遺伝子も提供する。本明細書において提供するcDNA配列を使用して対応する遺伝子を単離するために、標準的な分子生物学的方法を使用できる。これらの方法として、ヒトを含む哺乳動物のゲノムライブラリーまたはヒトのゲノムDNAの他の材料から遺伝子を同定または増幅する際に使用するための、本明細書において開示するヌクレオチド配列からのプローブまたはプライマーの調製が挙げられる。

40

#### 【0106】

ポリヌクレオチド増幅方法を使用して追加コピーのポリヌクレオチドを得るために、本発明のポリヌクレオチド分子をプライマーとして使用することもできる。当技術分野において周知の技術を使用してベクターおよび細胞株においてポリヌクレオチド分子を増殖できる。ポリヌクレオチド分子は直鎖状分子または環状分子でよい。それらは、自己複製中の分子または複製配列のない分子上でありうる。それらは、当技術分野において公知の通り、それら自体または他の制御配列により制御できる。

#### 【0107】

##### ポリヌクレオチド構築物

DNA構築物またはRNA構築物などのポリヌクレオチド構築物において、本明細書において開

50

示される配列を通じて同定される遺伝子変異体のコード配列を含むポリヌクレオチド分子を使用できる。本発明のポリヌクレオチド分子を、例えば、発現構築物において使用し、宿主細胞においてタンパク質、変異体、融合タンパク質、または単鎖抗体のすべて、または部分を発現できる。発現構築物は、選んだ宿主細胞において機能的であるプロモーターを含む。当業者は、当技術分野において公知であり、使用される数多くの細胞型特異的プロモーターから適当なプロモーターを容易に選択できる。発現構築物は、宿主細胞において機能的となる転写ターミネーターを含んでもよい。発現構築物は、所望のタンパク質のすべて、または部分をコード化するポリヌクレオチドセグメントを含む。ポリヌクレオチドセグメントは、プロモーターの下流に位置する。ポリヌクレオチドセグメントの転写は、プロモーターで開始する。発現構築物は、直鎖状または環状であり、自己複製のための配列を適宜含みうる。

10

## 【0108】

関連するタンパク質コード配列および／または検出可能な、または選択可能なマーカーをコード化する他の配列に機能的に連結された、対象となる新規遺伝子のプロモーター配列およびUTR配列を含むポリヌクレオチド分子も含まれる。このようなプロモーターおよび／またはUTRベースの構築物は、タンパク質発現の転写制御および翻訳制御を研究するため、および活性化および／または抑制性の制御タンパク質を同定するために有用である。

20

## 【0109】

## 宿主細胞

発現構築物を宿主細胞に導入できる。発現構築物を含む宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞でよい。細菌における発現系としては、Chang et al., Nature 275: 615 (1978) ; Goeddel et al., Nature 281: 544 (1979) ; Goeddel et al., Nucleic Acids Res. 8: 4057 (1980) ; 欧州特許第36,776号；米国特許第4,551,433号；deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983) ; およびSiebenlist et al., Cell 20: 269 (1980)。

## 【0110】

酵母における発現系としては、Hinonen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929 (1978) ; Ito et al., J Bacteriol 153: 163 (1983) ; Kurtz et al., Mol. Cell. Biol. 6: 142 (1986) ; Kunze et al., J Basic Microbiol. 25: 141 (1985) ; Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132: 3459 (1986), Roggenkamp et al., Mol. Gen. Genet. 202: 302 (1986)) ; Das et al., J Bacteriol. 158: 1165 (1984) ; De Louvencourt et al., J Bacteriol. 154: 737 (1983), Van den Berg et al., Bio/Technology 8: 135 (1990) ; Kunze et al., J. Basic Microbiol. 25: 141 (1985) ; Cregg et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3376 (1985) ; 米国特許第4,837,148号；米国特許第4,929,555号；Beach and Nurse, Nature 300: 706 (1981) ; Davidow et al., Curr. Genet. 10: 380 (1985) ; Gaillardin et al., Curr. Genet. 10: 49 (1985) ; Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 112: 284-289 (1983) ; Tilburn et al., Gene 26: 205-22 (1983) ; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474 (1984) ; Kelly and Hynes, EMBO J. 4: 475479 (1985) ; 欧州特許第244,234号；および国際公開広報第91/00357号に記載のものが挙げられる。

30

## 【0111】

昆虫における異種遺伝子の発現は、米国特許第4,745,051号；Friesen et al. (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression" : THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (W. Doerfler, ed.) ; 欧州特許第127,839号；欧州特許第155,476号；Vlak et al., J. Gen. Virol. 69: 765-776 (1988) ; Miller et al., Ann. Rev. Microbiol. 42: 177 (1988) ; Carbonell et al., Gene 73: 409 (1988) ; Maeda et al., Nature 315: 592-594 (1985) ; Lebacq-Verheyden et al., Mol. Cell Biol. 8: 3129 (1988) ; Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8404 (1985) ; Miyajima et al., Gene 58: 273 (1987) ; およびMartin et al., DNA 7:99 (1988)において記載の通りに達成できる。

40

50

多数のバキュロウイルスおよび変異体および宿主からの対応する許容昆虫宿主細胞が、Luckow et al., Bio/Technology (1988) 6: 47-55, Miller et al., in GENETIC ENGINEERING (Setlow, J.K. et al. eds.), Vol. 8, pp.277-279 (Plenum Publishing, 1986); およびMaeda et al., Nature, 315: 592-594 (1985)において記載されている。

## 【0112】

哺乳動物での発現は、Dijkema et al., EMBO J. 4: 761(1985); Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777 (1982b); Boshart et al., Cell 41: 521 (1985); および米国特許第4,399,216号において記載の通りに達成できる。哺乳動物での発現の他の特徴は、Ham and Wallace, Meth Enz. 58: 44 (1979)に記載の通りに促進できる;

## 【0113】

当技術分野において公知の任意の技術を使用して、発現構築物を宿主細胞に導入できる。これらの技術として、トランスフェリン ポリカチオン 媒介性DNAトランスファー、裸の核酸または封入核酸でのトランスフェクション、リポソーム媒介性細胞融合、DNAコードトラックスピーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、エレクトロポレーション、「遺伝子銃」、およびリン酸カルシウム媒介性トランスフェクションが挙げられる。

## 【0114】

本発明は、融合タンパク質、フラグメント、ならびに特定のタンパク質が欠失または置換されたハイブリッド型および改変型、1以上のアミノ酸が改変アミノ酸または普通ではないアミノ酸に変化された改変を含むハイブリッド型またはその改変型を含んでもよい。

## 【0115】

任意のヒトまたはヒト以外の靈長類のタンパク質も実質的に相補的という意味内に含まれ、それらは、抗体と本明細書において記載される遺伝子によりコード化されるタンパク質との交差反応により単離され、ゲノムDNA、mRNA、またはcDNAを含むそのコード配列がゲノムまたはサブゲノムスクレオチド配列または本明細書において記載のcDNAまたはそのフラグメントの相補配列とのハイブリダイゼーションを通じて単離される。縮重DNA配列は本発明の腫瘍タンパク質をコード化でき、これらも、対象となる遺伝子の対立遺伝子変異体と同様に、本発明に含まれることを意図していることも当業者は理解する。

## 【0116】

組換えDNA技術により調製された、本発明の前立腺タンパク質が好みしい。「純粋型」または「精製型」または「実質的な精製型」により、それは、タンパク質組成物に所望のタンパク質ではない他のタンパク質がないことを意味する。

## 【0117】

本発明は、疾患を伴う患者を処置するための有効量での本発明のタンパク質を含む治療または医薬用の組成物、および、治療有効量のタンパク質を投与することを含む方法も含む。これらの組成物および方法は、対象となるタンパク質に関連する癌、例えば、前立腺癌を処置するために有用になる。タンパク質が特定の細胞型において生存を促進させる、または機能する際に有用となりうるか否かを判断するために、当業者は、当技術分野において公知の様々なアッセイを容易に使用できる。

## 【0118】

## 抗前立腺抗原抗体

記述の通り、本発明は、診断および治療としての使用のための抗前立腺抗原抗体およびフラグメントの調製および使用を含む。これらの抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルでありうる。ポリクローナル抗体は、抗原を注入し、続いて適当な間隔で追加免疫することによりウサギまたは他の動物を免疫することにより調製できる。動物を採血して、通常はELISAにより、または対応する遺伝子の作用を阻止する能力に基づくバイオアッセイにより精製タンパク質に対して血清を分析する。鳥類、例えば、鶏、七面鳥などを使用した場合、抗体は卵黄から単離できる。モノクローナル抗体は、MilsteinとKohlerの方法に従い、免疫したマウスからの脾細胞を絶え間なく複製するミエローマまたはリンパ腫細胞などの腫瘍細胞と融合させることにより調製できる。[Milstein and Kohler, Nature 2

10

20

30

40

50

56: 495-497 (1975) ; Gulfre and Milstein, *Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques* 73: 1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, (1981) これは参照により組み入れられる]。このように形成されたハイブリドーマ細胞を限界希釈法によりクローニングし、ELISA、RIA、またはバイオアッセイにより抗体産生について上清をアッセイした。

#### 【0119】

抗体が標的タンパク質を認識し、特異的に結合する独自の能力は、タンパク質の過剰発現を処置するためのアプローチを提供する。このように、本発明の別の局面は、タンパク質に対する特異的抗体を伴う患者の処置によるタンパク質の過剰発現を含む疾患を予防または処置するための方法を提供する。

10

#### 【0120】

タンパク質に対する特異的抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれでも、上で開示した通り、当技術分野において公知の任意の適当な方法により产生できる。例えば、組換え方法により、好ましくは真核細胞において、ハイブリドーマ技術によりマウスまたはヒトのモノクローナル抗体を产生でき、または、代わりに、タンパク質、またはその免疫学的に活性なフラグメント、または抗イディオタイプ抗体、またはそのフラグメントを動物に投与して、タンパク質を認識し、結合できる抗体の產生を誘発できる。このような抗体は、限定はされないが、IgG、IgA、IgM、IgD、およびIgEを含む任意のクラスの抗体、または鳥類の場合、IgYおよび任意のサブクラスの抗体からでありうる。

20

#### 【0121】

単離タンパク質の利用により、通常のハイスループットスクリーニング方法(HTS)を通じて、結合パートナーへのタンパク質の結合を阻止する小分子および低分子量化合物の同定が可能になる。HTS方法は一般的にリード化合物での治療可能性の迅速アッセイを可能にする技術を指す。HTS技術では、被験物質のロボット処理、陽性シグナルの検出、およびデータの解釈を用いる。リード化合物は、放射活性の取り込みにより、または読み出しとしての吸光度、蛍光、または発光に依存する光学的アッセイを通じて同定できる。[Gonzalez, J. E. et al., *Curr. Opin. Biotech.* 9: 624-631 (1998)]。

20

#### 【0122】

例えば、リガンド結合でのタンパク質との競合によりタンパク質とそのリガンドとの相互作用を阻止する化合物に関するハイスループットスクリーニングにおける使用に適応できるモデル系を利用できる。Sarubbi et al., *Anal. Biochem.* 237: 70-75 (1996)には、IL-1受容体の活性部位に対する結合での天然リガンドと競合する分子を発見するための無細胞、非同位体アッセイについて記載している。Martens, C. et al., *Anal. Biochem.* 273: 20-31 (1999)には、総称的な非放射活性方法が記載されており、ここでは、標識リガンドが粒子上に固定したその受容体に結合する；粒子上の標識は、受容体結合で標識リガンドと競合する分子の存在下において低下する。

30

#### 【0123】

##### 抗体調製

###### (i) 出発物質および方法

免疫グロブリン(Ig)およびその特定の変異体が公知であり、多くは組換え細胞培養において調製された。例えば、米国特許第4,745,055号；欧州特許第256,654号；欧州特許第120,694号；欧州特許第125,023号；欧州特許第255,694；欧州特許第266,663号；国際公開広報第30 88/03559号；Faulkner et al., *Nature*, 298: 286 (1982)；Morrison, J. *Immun.*, 123: 793 (1979)；Koehler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2197 (1980)；Raso et al., *Cancer Res.*, 41: 2073 (1981)；Morrison et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 2: 239 (1984)；Morrison, *Science*, 229: 1202 (1985)；およびMorrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)を参考されたい。再集合免疫グロブリン鎖も公知である。例えば、米国特許第4,444,878号；国際公開広報第88/03565号；および欧州特許第68,763号および本明細書において引用する参考文献を参考されたい。本発明のキメラにおける免疫グロブリン成分は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、またはIgG-4のサブタイプ、Ig

40

50

A、IgE、IgD、またはIgM、しかし、好ましくはIgG-1またはIgG-3から得てよい。

【0124】

(ii) ポリクローナル抗体

対象となる前立腺抗原に対するポリクローナル抗体は、一般的に、抗原およびアジュvantの複数回の皮下(sc)または腹腔内(ip)注入により動物において生じる。例えば、二官能性剤または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介した結合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介した)、グルタルアルデヒド、または無水コハク酸を使用して、抗原、または標的アミノ酸配列を含むフラグメントを、免疫される種において免疫原性であるタンパク質、例えば、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、または大豆トリプシンインヒビターと結合させることは有用になりうる。

10

【0125】

約1mgまたは1μgのポリペプチドまたはコンジュゲート(それぞれウサギまたはマウス)と3容量のフロイント完全アジュvantを混ぜ合わせて、複数の部位に溶液を皮内注入することによりポリペプチドまたはフラグメント、免疫原性コンジュゲート、または派生物に対して動物を免疫する。1ヶ月後、フロイント完全アジュvant中の初回量の1/5~1/10のペプチドまたはコンジュゲートにより複数の部位で皮下注入により動物を追加免疫する。7~14日後、動物を採血して、抗原またはそのフラグメントに対する抗体価について血清をアッセイする。力価がプラトーに達するまで動物を追加免疫する。好ましくは、同じポリペプチドまたはそのフラグメントであるが、しかし、異なるタンパク質と、および/または異なる架橋試薬を介して抱合されたコンジュゲートで動物を追加免疫する。コンジュゲートは組換え細胞培養においてタンパク質融合体として作製することもできる。また、ミョウバンなどの凝集剤を適切に使用して、免疫応答を増強できる。

20

【0126】

(iii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、実質的に均質な抗体の集団から得られ、すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量において存在しうる起こりうる天然突然変異を除いて同一である。このように、改变因子「モノクローナル」は、別々の抗体の混合物ではないこととして抗体の特性を示す。

30

【0127】

例えば、本発明を実施するために使用するモノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256: 495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ方法を使用して作製でき、または組換えDNA方法(Cabilly et al., 前記)により作製できる。

【0128】

ハイブリドーマ方法において、マウスまたはハムスターなどの他の適当な宿主動物を上文において記載した通りに免疫して、免疫化のための抗原またはそのフラグメントに対して特異的に結合する抗体を産生する、または産生できるリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫できる。次に、ポリエチレンギリコールなどの適当な融合剤を使用してリンパ球をミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成した(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 [Academic Press, 1986])。

40

【0129】

このようにして調製したハイブリドーマ細胞を、好ましくは未融合の親ミエローマ細胞の増殖または生存を阻止する1以上の物質を含む適当な培養液中に播種し、増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞がヒポキサンチングアニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)酵素を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養液は典型的にはヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジン(HAT培地)を含み、これらの物質はHGPRT欠損細胞の増殖を阻止する。

【0130】

好みしいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安

50

定な高レベル産生を支持し、およびHAT培地などの培地に対して感受性である細胞である。これらの内、好ましいミエローマ細胞株は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USAから入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍に由来するミエローマ細胞株およびAmerican Type Culture Collection, Rockville, Md. USAから入手可能なSP-2細胞などのマウスミエローマ細胞株である。

## 【0131】

前立腺抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてハイブリドーマ細胞が増殖する培養液をアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降により、またはラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは酵素結合免疫測定法(ELISA)などのインビトロ結合アッセイにより決定される。

10

## 【0132】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980)のスキヤッチャード分析により決定できる。

## 【0133】

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを限界希釈手順によりサブクローニングし、標準方法(Goding、前記)により増殖させる。この目的のための適当な培養液として、例えば、D-MEM培地またはRPMI-1640培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞は動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖できる。

20

## 【0134】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手段により培養液、腹水液、または血清から適当に分離される。

## 【0135】

本発明のモノクローナル抗体をコード化するDNAは、従来の手順を使用して容易に単離、配列決定される(例えば、マウス抗体の重鎖または軽鎖をコード化する遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる)。本発明のハイブリドーマ細胞は、DNAなどの好ましい材料として役立つ。単離されると、DNAは発現ベクター中に置かれ、これは次に、本来なら免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはミエローマ細胞などの宿主細胞中にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコード化するDNAの細菌における組換え発現に関する総説としては、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993)およびPluckthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992)が挙げられる。

30

## 【0136】

DNAは、例えば、相同的なマウス配列の代わりにヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインのコード配列を置換することにより(Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 [1984])、または免疫グロブリンのコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列のすべてまたは一部を共有結合させることにより改変してもよい。この方法において、本明細書における抗前立腺抗原モノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」抗体または「ハイブリッド」抗体が調製される。

40

## 【0137】

典型的に、本発明の抗体の定常ドメインをこのような非免疫グロブリンポリペプチドで置換し、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインをそれらで置換し、本発明の前立腺抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作製する。

## 【0138】

キメラ抗体またはハイブリッド抗体は、架橋剤を含むものを含む、合成タンパク質化学において公知の方法を使用してインビトロで調製してもよい。例えば、ジスルフィド交換

50

反応を使用することにより、またはチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を構築できる。この目的のための適当な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートが挙げられる。

#### 【0139】

##### (iv) ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化させるための方法は、当技術分野において周知である。一般的に、ヒト化抗体は、ヒト以外の材料からそれに導入される1以上のアミノ酸残基を有する。これらのヒト以外のアミノ酸残基は、「インポート」残基と呼ばれることが多く、それは典型的に「インポート」可変ドメインから得られる。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列をげっ歯類のCDRまたはCDR配列で置換することにより、Winterおよび共同研究者の方 (Jones et al., Nature 321, 522-525 [1986] ; Riechmann et al., Nature 332, 323-327 [1988] ; Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 [1988] ) に従って本質的に実施できる。従って、このような「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり (Cabilly et al., 前記)、ここで実質的にインタクト (intact) に満たないヒト可変ドメインは、ヒト以外の種からの対応する配列により置換された。実際に、ヒト化抗体は典型的にヒト抗体であり、ここで一部のCDR残基および恐らくは一部のFR残基は、げっ歯類の抗体における類似の部位からの残基により置換される。

10

#### 【0140】

ヒト化抗体の作製において使用されるヒト可変ドメインの選択は、重鎖および軽鎖のいずれも、抗原性を減少するために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット (best-fit)」方法に従って、げっ歯類の抗体の可変ドメインの配列は、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブリラーに対してスクリーニングされる。げっ歯類のものに最も近いヒト配列を次にヒト化抗体のためのヒトフレームワーク (FR) として受け入れられる (Sims et al., J. Immunol., 151: 2296 [1993] ; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901 [1987] )。別の方法では、重鎖または軽鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体のために使用できる (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 [1992] ; Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 [1993] )。

20

#### 【0141】

抗原に対する親和性および他の好ましい生物学的特性を保持して抗体をヒト化することがさらに重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列および様々な概念化ヒト産物の分析方法によりヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルが一般に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元立体構造を図解し、ディスプレイするコンピュータプログラムを入手可能である。これらのディスプレイの検査により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のあり得る役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその高原に結合するための能力に影響を与える残基の分析が可能になる。この方法において、標的抗原に対する親和性の上昇などの所望の抗体特性を達成するために、FR残基をコンセンサス配列およびインポート配列から選択し、組み合わせてよい。一般的に、CDR残基は、抗原結合に影響を与える際に直接的および最も実質的に関与する。

30

#### 【0142】

##### (v) ヒト抗体

ヒトモノクローナル抗体はハイブリドーマ方法により作製できる。ヒトモノクローナル抗体の產生のためのヒトミエローマ細胞株およびマウスヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えば、Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984) ; Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ; およびBoerner et al., J. Immunol., 147: 86-95 (1991) により記載されている。

40

#### 【0143】

50

免疫化の際に内因性免疫グロブリン産生の非存在下において完全レパートリーのヒト抗体を産生できるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を今日では産生できる。例えば、キメラマウスおよび生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（JH）遺伝子のホモ欠失は、内因性抗体産生の完全阻止をもたらすことが記載されている。このような生殖系変異マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原チャレンジ時にヒト抗体の産生をもたらす。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993) ; Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993) ; Bruggermann et al., Year in Immuno., 7: 33 (1993)を参照されたい。

#### 【0144】

あるいは、ファージディスプレイ技術 (McCafferty et al., Nature, 348: 552-553 [1990]) を使用して、非免疫ドナーからの免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体および抗体フラグメントを産生できる。この技術に従って、抗体Vドメイン遺伝子をM13またはfdなどの糸状バクテリオファージの遺伝子の主要な、またはマイナーなコートタンパク質のいずれかにインフレームでクローニングし、ファージ粒子の表面上に機能的抗体フラグメントとしてディスプレイさせる。糸状粒子にはファージゲノムの一本鎖DNAのコピーが含まれるため、抗体の機能特性に基づく選択は、それらの特性を示す抗体をコード化する遺伝子の選択ももたらす。このように、ファージは、B細胞の特性の一部を模倣する。ファージディスプレイは様々な形式において実施でき；その総説としては、例えば、Johnson and Chiswell, Curr. Op. Struct. Biol., 3: 564-571 (1993)を参照されたい。ファージディスプレイのために、V遺伝子セグメントのいくつかの材料を使用できる。Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)では、免疫マウスの脾臓由来のV遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーから様々な一連の抗オキサゾロン抗体が単離された。非免疫ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構築して、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)、またはGriffith et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)により記載される技術に本質的に従って様々な一連の抗原（自己抗原を含む）に対する抗体を単離できる。

#### 【0145】

自然免疫応答において、抗体遺伝子は高率に突然変異を蓄積する（体細胞超突然変異）。導入された変化の一部は高親和性を与え、高親和性表面免疫グロブリンをディスプレイするB細胞は、続く抗原チャレンジ中に選択的に複製され、分化される。この自然過程は、「チェインシャッフリング（chain shuffling）」(Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 [1992])として公知の技術を用いることにより模倣できる。この方法において、ファージディスプレイにより得られる「一次」ヒト抗体の親和性は、重鎖および軽鎖のV領域遺伝子を、非免疫ドナーから得られるVドメイン遺伝子の天然変異体（レパートリー）のレパートリーと順次置き換えることにより改善できる。この技術により、nMの範囲における親和性を伴う抗体および抗体フラグメントの産生が可能になる。非常に大きなファージ抗体レパートリーを作製するための戦略は、Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)により記載されている。

#### 【0146】

げっ歯類の抗体からヒト抗体を得るために遺伝子シャッフリングを使用してもよく、ここでヒト抗体は出発げっ歯類抗体に対して同様の親和性および特異性を有する。「エピトープインプリントィング（epitope imprinting）」とも呼ばれるこの方法に従って、ファージディスプレイ技術により得られるげっ歯類抗体の重鎖または軽鎖のVドメインを、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置き換えて、げっ歯類ヒトキメラを作製できる。抗原上での選択は、機能的抗原結合部位を回復できるヒト可変部の単離をもたらし、すなわち、エピトープがパートナーの選択を支配（インプリント）する。残りのげっ歯類Vドメインを置き換えるために方法を繰り返した場合、ヒト抗体が得られる（1993年4月1日に公開されたPCT国際公開広報第93/06213号を参照）。CDRグラフティング（grafting）によるげっ歯類抗体の従来のヒト化とは異なり、この技術は完全なヒト抗体を提供し、これはげっ歯類由来のフレームワークまたはCDR残基を有さない。

10

20

30

40

50

## 【0147】

## (vi)二重特異性抗体

二重特異的抗体はモノクローナルで、好ましくは、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するヒトまたはヒト化抗体である。今回の場合、結合特異性の1つは、本発明の前立腺抗原に対する。二重特異性抗体を作製するための方法は、当技術分野において公知である。

## 【0148】

従来、二重特異性抗体の組換え產生は、2つの免疫グロブリンの重鎖 軽鎖のペアの同時発現に基づいており、ここで2つの重鎖は異なる特異性を有する (Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539 [1983])。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダム分類のため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10の異なる抗体分子の潜在的な混合物を产生し、このうちの1つのみが正確な二重特異性構造を有する。正確な分子の精製、これは通常親和性クロマトグラフィー段階により実施され、相当に煩雑であり、産物の収率は低い。同様の手法が1993年5月13日に公表された国際公開広報第93/08829号およびTrauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991)において開示されている。

10

## 【0149】

異なるより好ましいアプローチに従い、所望の結合特異性を伴う抗体可変ドメイン(抗体 抗原結合部位)を免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合させる。融合は、好ましくは、ヒンジ、CH<sub>2</sub>領域、およびCH<sub>3</sub>領域の少なくとも部分を含む免疫グロブリン重鎖の定常ドメインとである。融合物の少なくとも1つにおいて存在する軽鎖結合のために必要な部位を含む第一の重鎖定常領域を有することが好まれる。免疫グロブリン重鎖融合物および、所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコード化するDNAを別々の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物中に同時導入する。これは、構築において使用される3つのポリペプチドの不等比率(unequal ratios)が最適収率を提供する場合、実施態様において3つのポリペプチドフラグメントの相互割合を調整する際に大きな柔軟性を提供する。しかし、等比率における少なくとも2つのポリペプチド鎖の產生が高収率をもたらす場合、または、比率が特に重要ではない場合、1つの発現ベクターにおいて2または3つすべてのポリペプチドのためのコード配列を挿入できる。このアプローチの好ましい実施態様において、二重特異性抗体は、1つのアームにおいて第一の結合特異性、および他のアームにおいてハイブリッド免疫グロブリン重鎖 軽鎖のペア(第二の結合特異性を提供する)を伴うハイブリッド免疫グロブリン重鎖からなる。二重特異性分子の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在によって分離の手軽な方法が提供されるため、この非対象構造により不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の二重特異性化合物の分離が促進されることが見出された。二重特異性抗体を作成することのさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)を参照されたい。

20

## 【0150】

## (vii)ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体も本発明の範囲内である。ヘテロコンジュゲートは、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、不要な細胞に対する免疫系細胞を標的とすること(米国特許第4,676,980号)、およびHIV感染の処置のためであること(国際公開広報第91/00360号; 国際公開広報第92/00373号; および欧州特許第03089号)が提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋方法を使用して作製できる。適当な架橋剤は当技術分野において周知であり、多くの架橋技術と共に、米国特許第4,676,980号において開示される。

30

## 【0151】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達媒体において利用できる。遺伝子送達媒体はウイルス由来または非ウイルス由来でありうる(一般的に、Jolly, *Cancer Gene Therapy* 1: 51-64 (1994); Kimura, *Human Gene Therapy* 5:845-852 (1994); Connelly, *Human Gene Therapy* 1: 185-193 (1995); およびKaplitt, *Nature Genetics* 6: 148-153 (1994)を参照されたい)。本発明の治療剤のコード配列を含む構築物の送達

40

50

そのための遺伝子治療媒体は、局所的または全身的のいずれかで投与できる。これらの構築物では、ウイルスまたは非ウイルスベクターアプローチを利用できる。このようなコード配列の発現は、内因性の哺乳動物または異種プロモーターを使用して誘発できる。コード配列の発現は、構成的である、または制御される、のいずれかでよい。遺伝子治療のための好ましい媒体として、レトロウイルスベクターおよびアデノウイルスベクターが挙げられる。

#### 【0152】

アデノウイルスベクターの代表例として、Berkner, Biotechniques 6:616-627 (Biotechniques) ; Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991) ; 国際公開広報第93/19191号 ; Kolls et al., P.N.A.S. 91:215-219 (1994) ; Kass-Bisleret et al., P.N.A.S. 90: 11498-11502 (1993) ; Guzman et al., Circulation 88: 2838-2848 (1993) ; Guzman et al., Circ. Res. 73: 1202-1207 (1993) ; Zabner et al., Cell 75: 207-216 (1993) ; Li et al., Hum. Gene Ther. 4: 403-409 (1993) ; Cailaud et al., Eur. J. Neurosci. 5: 1287-1291 (1993) ; Vincent et al., Nat. Genet. 5: 130-134 (1993) ; Jaffe et al., Nat. Genet. 1: 372-378 (1992) ; およびLevrero et al., Gene 101: 195-202 (1992) に記載のものが挙げられる。本発明において用いることのできる例示的なアデノウイルス遺伝子治療ベクターとして、国際公開広報第94/12649号、国際公開広報第93/03769号；国際公開広報第93/19191号；国際公開広報第94/28938号；国際公開広報第95/11984号および国際公開広報第95/00655号において記載のものも挙げられる。Curiel, Hum. Gene Ther. 3: 147-154 (1992)において記載されている通り、アデノウイルスを殺すために連結されたDNAの投与を用いてよい。  
10  
20

#### 【0153】

以下を含む他の遺伝子送達媒体および方法を用いてよい；アデノウイルスのみを殺すために連結された、または連結されていないポリカチオン性凝縮DNA、例えば、Curiel, Hum. Gene Ther. 3: 147-154 (1992)；リガンド連結DNA、例えば、Wu, J. Biol. Chem. 264: 16985-16987 (1989)を参照；真核細胞送達媒体細胞、例えば、1994年5月9日に出願された米国特許出願第08/240,030号、および米国特許出願第08/404,796号を参照されたい；光重合ハイドロゲル物質の沈着；米国特許第5,149,655号において記載される携帯遺伝子トランスクファーラー粒子ガン；米国特許第5,206,152号および国際公開広報第92/11033号において記載される電離放射線；核酸電荷中和または細胞膜との融合。追加のアプローチは、Philip, Mol. Cell Biol. 14: 2411-2418 (1994)において、およびWoffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 1581-1585 (1994)において記載されている。  
30

#### 【0154】

裸の (Naked) DNAを用いてもよい。例示的な裸のDNA導入方法は、国際公開広報第90/11092号および米国特許第5,580,859号において記載されている。取り込み効率は、生物分解性ラテックスビーズを使用して改善できる。DNAコートラテックスビーズは、ビーズによるエンドサイトシスの開始後に細胞内に効率的に輸送される。疎水性を上昇させるためのビーズの処置により方法をさらに改善させ、これによりエンドソームの破壊および細胞質中へのDNAの放出を促進できる。遺伝子送達媒体として作用できるリポソームは、米国特許第5,422,120号、PCT特許公報国際公開広報第95/13 796号、国際公開広報第94/23697号、および国際公開広報第91/14445号、および欧州特許第0 524 968号において記載される。  
40

#### 【0155】

使用のために適したさらなる非ウイルス送達として、Woffendin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(24): 11581-11585 (1994)において記載されるアプローチなどの機械的送達系が挙げられる。さらに、コード配列およびその発現の産物を光重合ハイドロゲル物質の沈着を通じて送達できる。コード配列の送達のために使用できる遺伝子送達のための他の従来の方法として、例えば、米国特許第5,149,655号において記載される携帯遺伝子トランスクファーラー粒子ガンの使用；米国特許第5,206,152号およびPCT特許公報国際公開広報第92/11033号において記載される活性化トランスクファーラー遺伝子のための電離放射線の使  
50

用が挙げられる。

【0156】

対象となる抗体または抗体フラグメントは、有効成分、例えば、放射性核種、毒素、化学療法剤、プロドラッグ、細胞分裂インヒビター、酵素などに直接的または間接的に結合できる。好ましい実施態様において、抗体またはフラグメントは、直接的またはキレート化剤の使用により治療用または診断用の放射標識に結合される。適当な放射標識の例は周知であり、<sup>90</sup>Y、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>I、<sup>105</sup>Rh、<sup>153</sup>Sm、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>166</sup>Ho、<sup>177</sup>Lu、<sup>186</sup>Re、および<sup>188</sup>Reが挙げられる。

【0157】

抗体に結合できる適当な薬物の例として、メトトレキサート、アドリアマイシン、およびインターフェロン、インターロイキンなどのリンフォカインが挙げられる。結合できる適当な毒素として、リシン、コレラ、およびジフテリア毒素が挙げられる。

【0158】

好ましい実施態様において、対象となる抗体は、治療用の放射標識に結合され、放射免疫治療のために使用される。

【0159】

#### アンチセンスオリゴヌクレオチド

特定の状況において、前立腺細胞により発現されるタンパク質の量をモデュレーションまたは低下することが望まれる。このように、本発明の別の局面において、アンチセンスオリゴヌクレオチドを作製でき、方法では、細胞による本発明の前立腺抗原の発現のレベルを低減させるために、1以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与を含むことを利用した。遺伝子の発現が減少するように、標的の発現に関与する特異的な相補的核酸配列との塩基対形成を通じて相互作用するヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドレファレンスを作製する。好ましくは、遺伝子の発現に関与する特異的な核酸配列は、ゲノムDNA分子または遺伝子をコード化するmRNA分子である。このゲノムDNA分子は、遺伝子の制御領域、または成熟遺伝子に対するコード配列を含んでよい。

【0160】

アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび方法との関連でのヌクレオチド配列に対して相補的という用語は、このような配列に対して十分に相補的であり、細胞において、すなわち、生理学的条件下におけるその配列に対するハイブリダイゼーションを可能にすることを意味する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、約8個～約100個のヌクレオチドを含む配列を含み、より好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは約15個～約30個のヌクレオチドを含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、改変インターヌクレオシド結合 [Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543-548 (1990); Schneider and Banner, Tetrahedron Lett. 31: 335, (1990) これは参照により組み入れられる]、第5,958,773号および本明細書において開示される特許において開示される改変核酸塩基、および／または糖などの核酸分解に対する耐性を与える様々な改変を含んでもよい。

【0161】

アンチセンス技術に広く適用可能となるように、当技術分野において公知であるアンチセンス分子の任意の改変または変異が、本明細書の範囲に含まれる。このような改変として、米国特許第5,536,821号；第5,541,306号；第5,550,111号；第5,563,253号；第5,571,799号；第5,587,361, 5,625,050号、および第5,958,773号において開示されるリン酸含有連結の調製が挙げられる。

【0162】

本発明のアンチセンス化合物には改変塩基が含まれてよい。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1以上の成分またはコンジュゲートに対して化学的に連結することにより改変し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを増強することもできる。このような成分またはコンジュゲートとして、コレステロール、

10

20

30

40

50

コール酸、チオエーテル、脂肪鎖、リン脂質、ポリアミン、ポリエチレングリコール(PEG)、パルミチル成分、ならびに、例えば、米国特許第5,514,758号、第5,565,552号、第5,567,810号、第5,574,142号、第5,585,481号、第5,587,371号、第5,597,696号、および第5,958,773号において開示される他の者が挙げられる。

#### 【0163】

キメラアンチセンスオリゴヌクレオチドも本発明の範囲内であり、例えば、米国特許第5,013,830号、第5,149,797号、第5,403,711号、第5,491,133号、第5,565,350号、第5,652,355号、第5,700,922号、および第5,958,773号に記載されている方法を使用して本発明のオリゴヌクレオチドから調製できる。

#### 【0164】

アンチセンス技術において、特定の標的に対する最適なアンチセンス分子を選択するためにある程度の日常的な実験が必要とされる。有効にするために、アンチセンス分子は、好ましくは、標的RNA分子の接近可能な、または露出された部分を標的とする。一部の場合において、標的RNA分子の構造に関する情報を入手可能であるが、アンチセンスを使用した阻止に対する現行のアプローチは実験を介している。細胞におけるmRNAレベルは、mRNAの逆転写およびcDNAレベルをアッセイすることにより処理済み細胞およびコントロール細胞において日常的に測定できる。生物学的效果は、当技術分野において公知の通りに、細胞増殖または生存を測定することにより日常的に測定できる。

#### 【0165】

cDNAレベルをアッセイし、分析することによりアンチセンス活性の特異性を測定することは、アンチセンスの結果を検証する当技術分野において認識されている方法である。処理済み細胞およびコントロール細胞からのRNAを逆転写させ、得られたcDNA集団を分析することが示されている。[Branch, A. D., T. I. B. S. 23:45-50 (1998)]

#### 【0166】

本発明の治療用組成物または医薬的組成物は、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、経皮、髄腔内、または脳内を含む、当技術分野において公知の任意の適当な経路により投与できる。投与は、注入により迅速に、または低速注入もしくは徐放製剤の投与により一定時間にわたり、それらのいずれかでよい。

#### 【0167】

加えて、対象となる前立腺腫瘍タンパク質は、望ましい医薬的特性または薬力学的特性を提供する薬剤と連結または結合できる。例えば、タンパク質を、トランスフェリンレセプターに対する抗体などの血液脳関門を超える浸透または輸送を促進させる当技術分野において公知の任意の物質に結合させ、静脈内注入により投与できる(例えば、参照により組み入れられるFriden et al., Science 259:373-377 (1993)を参照されたい)。さらに、対象となるタンパク質Aまたはタンパク質Bをポリエチレングリコールなどのポリマーに安定的に連結させ、溶解性、安定性、半減期、および他の医薬的に有利な特性といった望ましい特性が得られる。[例えば、参照により組み入れられるDavis et al., Enzyme Eng. 4: 169-73 (1978); Buruham, Am. J. Hosp. Pharm. 51: 210-218 (1994)を参照されたい]

#### 【0168】

組成物は医薬的調製物の型において通常用いられる。このような調製物は、医薬技術において周知の方法で作製される。例えば、Remington Pharmaceutical Science, 18th Ed., Merck Publishing Co. Eastern PA, (1990)を参照されたい。1つの好ましい調製物では生理食塩水液の媒体を利用するが、しかし、生理学的濃度の他の無毒性塩、5%グルコース水溶液、滅菌水などの他の医学的に許容可能な担体も使用できることを検討する。適当なバッファーが組成物中に存在することも望まれうる。このような溶液は、適宜、凍結乾燥させ、注入準備のための滅菌水の添加による再構成のために準備された滅菌アンプル中に保存できる。一次溶剤は水溶性または非水溶性でよい。対象となる前立腺腫瘍抗原、そのフラグメントまたは変異体は、処置を必要とする組織中に移植できる固形または半固形の生物学的に適合するマトリクス中に組み入れることもできる。

10

20

30

40

50

**【 0 1 6 9 】**

担体は、製剤のpH、浸透圧、粘性、透明度、色、無菌性、安定性、分解速度、または臭いを改変または維持するための他の医薬的に許容可能な賦形剤を含むこともできる。同様に、担体は、血液脳関門を超える放出または吸収または浸透を改変または維持するためのさらに他の医薬的に許容可能な賦形剤を含んでよい。このような賦形剤は、単位用量または複数用量の型のいずれかの非経口投与のため、または持続注入もしくは定期注入による脳脊髄液中への直接注入のための用量を製剤化するために通常および習慣的に用いられる物質である。

**【 0 1 7 0 】**

用量の投与は、使用する剤形および投与経路の薬物動態パラメーターに応じて反復できる。

10

**【 0 1 7 1 】**

対象となる抗体または核酸のアンタゴニストを含む特定の製剤を経口投与することも検討できる。このような製剤は、好ましくは、封入し、固体剤形において適当な担体とともに製剤化する。適当な担体、賦形剤、および希釈剤の一部の例として、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ガムアカシア、リン酸カルシウム、アルギン酸、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、ゼラチン、シリップ、メチルセルロース、メチル-およびプロピルヒドロキシ安息香酸エステル、タルク、マグネシウム、ステアリン酸、水、鉱油が挙げられる。製剤は、加えて、潤滑剤、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、保存剤、甘味剤または香味剤を含んでよい。組成物は、当技術分野において周知の手順を用いることにより患者への投与後に活性成分の迅速放出、持続放出、または遅延放出を提供するように製剤化できる。製剤は、例えば、界面活性剤など、タンパク質分解を低減させ、吸収を促進する物質を含むこともできる。

20

**【 0 1 7 2 】**

特定用量は、患者の概算の体重または体表面積または占められる体空間の容積に応じて計算される。用量は選択された特定の投与経路に応じても計算されうる。処置用の適当な用量を決定するために必要な計算のさらなる改良が、当業者により日常的に作製される。このような計算は、標的細胞のアッセイ調製物中の本明細書において開示される活性に照らして、当業者による過度の実験なしに作製できる。厳密な用量は、標準的な用量反応試験との併用で決定できる。実際に投与される組成物の量は、処置しようとする病状または病状群、投与しようとする組成物の選択、個々の患者の年齢、体重、および反応、患者の症状の重症度、および選んだ投与経路を含む関連する状況に照らして、実施医により決定されることが理解される。

30

**【 0 1 7 3 】**

本発明の一実施態様において、タンパク質は、生物活性型のタンパク質またはタンパク質の前駆体、すなわち、身体により容易に生物活性型に変換できる分子を産生できるベクターまたは細胞を患者に移植することにより治療用に投与できる。1つのアプローチにおいて、タンパク質を分泌する細胞は患者への移植のための半透性膜中に封入できる。細胞はタンパク質またはその前駆体を通常発現する細胞でよく、または、細胞はタンパク質またはその前駆体を発現するように形質転換できる。患者がヒトの場合、細胞はヒト由来であり、タンパク質はヒトのタンパク質であることが好ましい。しかし、以下に考察されるタンパク質のヒト以外の靈長類のホモログも有効であり得ることが予測される。

40

**【 0 1 7 4 】**

対象となる前立腺タンパク質または核酸の検出

多くの状況において、患者におけるタンパク質または対応するmRNAのレベルを決定することが望まれうる。以下に開示される証拠は、対象となる前立腺タンパク質が、一部の疾患、例えば、癌の間に異なるレベルで発現されうることを示唆し、これらのタンパク質の存在が細胞の増殖および生存に関連する正常な生理機能の役割を果たすとの結論のための基礎を提供する。本発明の内因性に產生されたタンパク質は、特定の病状においても役割を

50

果たしうる。

【0175】

患者においてタンパク質の存在を検出することとの関連で本明細書において使用される「検出」という用語は、患者におけるタンパク質の量またはタンパク質の量を発現するための能力を決定すること、疾患の起り得る転帰および回復の見込みという観点からの予後の推定、病状の状態の測定値としての一定の時間にわたるタンパク質レベルのモニタリング、および患者、例えば、前立腺癌を伴う患者のための好ましい治療計画を決定するためのタンパク質レベルのモニタリングを含むことを意図する。

【0176】

患者において本発明の前立腺タンパク質の存在を検出するために、患者からサンプルを得る。サンプルは、組織生検サンプルまたは血液、血漿、血清、CSF、尿などのサンプルでよい。対象となるタンパク質は一部の癌において高レベルで発現されることが見出されている。タンパク質を検出するためのサンプルは、前立腺組織から採取できる。末梢でのタンパク質レベルを評価する際、サンプルは血液、血漿、または血清のサンプルであることが好ましい。中枢神経系においてタンパク質レベルを評価する際、好ましいサンプルは脳脊髄液または神経組織から得られるサンプルである。サンプルは組織採取または培養から、または直接的に入手可能な組織材料（尿、唾液、便、毛髪など）を使用して、非侵襲性の方法により得られる。

【0177】

一部の場合において、遺伝子は患者または患者内の組織もしくは細胞株においてインタクトであるか否かを決定することが望ましい。インタクトな遺伝子により、それは、点突然変異、欠失、挿入、染色体切断、染色体再配列などの遺伝子における変化が存在しないことを意味し、ここでこのような変化は、対応するタンパク質の産生を変化させ、または生物活性、安定性などを変化させて、疾患過程を招きうる。このように、本発明の一実施態様において、方法は、遺伝子における任意の変化を検出し、特性付けするための方法を提供する。方法には、遺伝子、ゲノムDNA、またはそれらのフラグメント、またはそれらの派生物を含むオリゴヌクレオチドを提供することが含まれる。オリゴヌクレオチドの派生物により、それは、生成された配列が、それが由来する配列と十分な配列相補性を有し、遺伝子に対して特異的にハイブリダイズする点で、生成されたオリゴヌクレオチドが、それが由来する配列と実質的に同じであることを意味する。得られたヌクレオチド配列は、必ずしも物理的にヌクレオチド配列に由来しないが、しかし、例えば、化学合成またはDNA複製または逆転写または転写を含む任意の方法で作成されうる。

【0178】

典型的に、患者のゲノムDNAは患者からの細胞サンプルから単離され、例えば、TaqIおよびAluIなどの1以上の制限エンドヌクレアーゼで消化される。当技術分野において周知であるサザンプロットプロトコルを使用して、このアッセイによって患者または患者における特定の組織が本発明のインタクトな前立腺遺伝子または遺伝子異常を有するか否かが決定される。

【0179】

遺伝子に対するハイブリダイゼーションには、染色体DNAを変性させて一本鎖DNAを得ること；一本鎖DNAを遺伝子配列に関連する遺伝子プローブと接触させること；および、少なくとも遺伝子の部分を含む染色体DNAを検出するためにハイブリダイズしたDNA-プローブを同定することが含まれる。

【0180】

本明細書において使用する「プローブ」という用語は、プローブ配列と標的領域における配列との相補性に起因して、標的配列とハイブリッド構造を形成するポリヌクレオチドからなる構造を指す。プローブとしての使用のために適したオリゴマーには、標的となる配列に対して相補的である約8~12個、および、好ましくは最低約20個の連続ヌクレオチドである。

【0181】

10

20

30

40

50

本発明の遺伝子は、DNAオリゴヌクレオチドまたはRNAオリゴヌクレオチドでよく、例えば、切除、転写、または化学合成などの当技術分野において公知の任意の方法により作製できる。プローブは、例えば、放射標識または蛍光標識または酵素マーカーなどの当技術分野において公知の任意の検出可能な標識で標識してよい。プローブの標識は、PCR、ランダムプライミング、末端標識、ニックトランスレーションなどの当技術分野において公知の任意の方法により達成できる。当業者は、標識プローブを用いない他の方法を使用してハイブリダイゼーションを決定できることも認識する。ハイブリダイゼーションを検出するために使用できる方法の例として、サザンプロットティング、蛍光in situハイブリダイゼーション、およびPCR増幅を伴う一本鎖高次構造多型が挙げられる。

#### 【0182】

ハイブリダイゼーションは、典型的に、25 ~ 45 、より好ましくは32 ~ 40 、および、より好ましくは37 ~ 38 で行われる。ハイブリダイゼーションのために必要とされる時間は、約0.25時間 ~ 約96時間、より好ましくは約1時間 ~ 約72時間、および、最も好ましくは約4時間 ~ 約24時間である。

#### 【0183】

遺伝子異常は、PCR方法、および遺伝子に隣接する、または遺伝子内に位置するプライマーを使用して検出することもできる。PCR方法は当技術分野において周知である。簡単に説明すると、この方法は、遺伝子内に位置する標的配列に隣接する核酸配列に対してハイブリダイズし、標的配列を増幅できる2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して実施される。本明細書において使用する「オリゴヌクレオチドプライマー」という用語は、約8塩基 ~ 約30塩基の長さの範囲の短鎖のDNAまたはRNAを指す。上流および下流のプライマーは、典型的に、約20塩基対 ~ 約30塩基対の長さであり、ヌクレオチド配列の複製のための隣接領域に対してハイブリダイズする。重合は、デオキシヌクレオチド三リン酸またはヌクレオチド類似体の存在下においてDNAポリメラーゼにより触媒され、二本鎖DNA分子を産生する。次に、二本鎖は、物理的方法、化学的方法、または酵素的方法を含む任意の変性方法により分離される。一般に、約1分 ~ 約10分までの範囲の時間にわたり、典型的に約80 ~ 105までの温度に核酸を加熱することを含む、物理的変性の方法が使用される。所望のサイクル数で過程を反復する。

#### 【0184】

増幅中のDNAの鎖に対して実質的に相補的となるようにプライマーを選択する。したがって、プライマーが鑄型の厳密な配列を反映する必要はないが、しかし、増幅中の鎖と選択的にハイブリダイズするように十分に相補的でなければならない。

#### 【0185】

PCR増幅後、次に、遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA配列を直接的に配列決定し、配列と本明細書において開示される配列との比較により分析して活性または発現レベルなどを変えうる変化を同定する。

#### 【0186】

別の実施態様において、遺伝子を発現する組織の分析に基づき、本発明の腫瘍タンパク質を検出するための方法が提供される。前立腺組織などの特定の組織が、対象となる遺伝子を過剰発現することが見出されている。方法には、遺伝子を通常発現する組織のサンプルからのmRNAに対してポリヌクレオチドをハイブリダイズすることが含まれる。サンプルは、遺伝子において異常を有することが疑われる患者から得られる。

#### 【0187】

タンパク質をコード化するmRNAの存在を検出するために、患者からサンプルを得る。サンプルは、血液から、または組織生検サンプルからでよい。サンプルを処置し、そこに含まれる核酸を抽出できる。サンプルからの得られた核酸をゲル電気泳動または他のサイズ分離技術にかける。

#### 【0188】

サンプルのmRNAはプローブとしての役割を果たすDNA配列と接触させ、ハイブリッド二本鎖を形成する。上で考察した標識プローブの使用によって、得られた二本鎖の検出が可

10

20

30

40

50

能になる。

【0189】

プローブとしてタンパク質をコード化するcDNAまたはcDNAの派生物を使用する際、実際には、インタクトであり、機能している遺伝子が存在しない場合に遺伝子スクレオチド配列のハイブリダイゼーションおよび見掛け上の検出である偽陽性を防止するために高ストリンジエンシー条件を使用できる。遺伝子cDNAに由来する配列を使用する場合、ストリンジエンシーのより低い条件を使用できるが、しかし、これは偽陽性の可能性のために好ましくないアプローチでありうる。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、温度、イオン強度、時間、およびホルムアミドの濃度を含む、ハイブリダイゼーション中および洗浄手順中の多くの因子により決定される。これらの因子は、例えば、Sambrook et al.において概説されている。 [ Sambrook et al. (1989)、前記 ]

10

【0190】

タンパク質Aまたはタンパク質Bをコード化するmRNAのサンプルにおける検出の感度を上昇させるために、逆転写 / ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) の技術を使用し、前立腺腫瘍抗原をコード化するmRNAから転写されたcDNAを増幅できる。RT / PCR方法は当技術分野において周知であり、以下の通りに実施できる。全細胞RNAは、例えば、標準的なグアニジンイソチオシアネート方法により単離され、全RNAは逆転写される。逆転写方法には、逆転写酵素および3'末端プライマーを使用したRNAの錆型上でのDNAの合成が含まれる。典型的に、プライマーにはオリゴ(dT)配列が含まれる。次に、このようにして産生されたcDNAは、PCR方法および遺伝子Aまたは遺伝子B特異的プライマーを使用して増幅される。 [ Bel'yavsky et al., Nucl. Acid Res. 17: 2919-2932 (1989); Krug and Berger, Methods in Enzymology, 152:316-325, Academic Press, NY (1987)、これらは参照により組み入れられる ]

20

【0191】

ポリメラーゼ連鎖反応方法は、増幅しようとするDNAセグメントの2つの隣接領域に対して実質的に相補的である2つのオリゴスクレオチドプライマーを使用して上記の通りに実施される。増幅後、次に、PCR産物を電気泳動し、エチジウムプロマイド染色により、またはホスホイメージング (phosphoimaging) により検出する。

【0192】

本発明は、患者から得られたサンプルにおけるタンパク質の存在を検出するための方法をさらに提供する。タンパク質を検出するための当技術分野において公知の任意の方法を使用できる。このような方法として、限定はされないが、免疫拡散、免疫電気泳動、免疫化学的方法、バインダー - リガンドアッセイ、免疫組織化学的技術、凝集アッセイ、および補体アッセイが挙げられる。 [ Basic and Clinical Immunology, 217-262, Sites and Terr, eds., Appleton & Lange, Norwalk, CT, (1991)、これは参照により組み入れられる ]。前立腺腫瘍抗原タンパク質のエピトープまたはエピトープ群との反応抗体を含み、本発明の標識前立腺抗原またはその派生物を競合的に置き換えるバインダー - リガンドイムノアッセイが好ましい。

30

【0193】

本明細書において使用される通り、対象となる前立腺腫瘍抗原の派生物は、特定のアミノ酸が、欠失された、または変更アミノ酸または異常アミノ酸に置き換えられた、または変化されたポリペプチドを含むことを意図しており、ここで派生物は遺伝子と生物学的に同等であり、および、ここでポリペプチド派生物はタンパク質に対して生じた抗体と交差反応する。交差反応により、それは抗体がその形成を誘導する抗原以外の抗原と反応することを意味する。

40

【0194】

多数の競合および非競合のタンパク質結合イムノアッセイが、当技術分野において周知である。このようなアッセイにおいて用いられる抗体は、例えば、凝集検査において使用されるように標識されない、または様々なアッセイ方法における使用のために標識できる。ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素イムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着検定

50

法（ELISA）、蛍光イムノアッセイなどにおける使用のために使用できる標識として、放射性核種、酵素、フルオレセイン、化学発光、酵素基質または補因子、酵素インヒビター、粒子、色素などが挙げられる。

#### 【0195】

本発明のさらなる局面は、候補化合物が、上に開示した標的分子に、好ましくは選択的に、結合するか否かを決定することを含む、生物活性化合物を選択、同定、スクリーニング、特性付け、または最適化するための方法に関する。このような標的分子として、核酸配列、ポリペプチドおよびそのフラグメント、典型的に、前立腺特異的抗原、さらに好ましくはその細胞外部分が挙げられる。結合は、インピトロまたはインピボ、典型的にインピトロにおいて、細胞系または無細胞系において評価できる。典型的に、標的分子は任意の適當なデバイスにおいて候補化合物と接触させ、複合体の形成を決定する。標的分子および／または候補化合物は、支持体上に固定化できる。同定または選択された化合物は、癌疾患、特に前立腺癌を処置するための薬物候補またはリードを表す。

10

#### 【0196】

好ましい実施態様を含め、本発明が上に記載されているが、本発明をさらに例証するために以下の実施例を提供する。

#### 【実施例】

#### 【0197】

##### 組織材料：

研究プロトコルの評価のために適當な患者のサンプルを調達した。サンプルは関連する臨床パラメーターおよび患者の同意と共に提供された。すべてのサンプルについて組織学的評価を実施し、病理による診断によって各サンプル内での悪性腫瘍の存在および／または非存在が確認された。臨床データには、一般的に、病歴、生理病理、および前立腺癌の生理に関するパラメーターが含まれた。入手可能な臨床情報と共に、10の正常サンプルおよび10の悪性サンプルを調達した。加えて、エピトープの組織特異的発現プロファイルを決定するために正常前立腺および前立腺癌以外の器官からの10のサンプルを調達した。周知の商業的材料から正常組織サンプルに由来するRNAを得た。

20

#### 【0198】

細胞傷害性Tリンパ球（CTL）アッセイのために追加の患者サンプルを調達した。関連する臨床パラメーターおよび患者の同意を伴う患者から採取した血液から末梢血単核球（PBMC）を単離した。臨床データには、一般的に、病歴、生理病理、および前立腺癌の生理に関するパラメーターが含まれた。試験の必要条件を満たした6人の前立腺癌患者からPBMCを採取した。一人の患者から2重でのサンプルを得た。

30

#### 【0199】

##### DATASライブラリーの作成；

それらの病理学的診断に基づいてサンプルをプールした（正常対腫瘍）。等量の全RNAに基づき、サンプルをプールし、100 μgの全プールRNAサンプルを作製した。以前に米国特許第6,251,590号において開示された通りにDATASライブラリーを構築したが、その開示はそのすべてが参照により組み入れられる。簡単に説明すると、正常プールサンプルおよび腫瘍プールサンプルから全RNAを単離し、続いて各プールサンプルについて全RNAからmRNAを精製した。ビオチン化オリゴ(dT)プライマーを使用してcDNAの合成を実施した。ビオチン化cDNAを反対側のサンプルのmRNAとハイブリダイズし、cDNAとmRNAの間のヘテロ二本鎖を形成した。例えば、プールした正常前立腺サンプルのビオチン化cDNAを前立腺腫瘍mRNAとハイブリダイズした。同様に、前立腺腫瘍ビオチン化cDNAを前立腺正常RNAとハイブリダイズし、二次DATASライブラリーを作成した。ストレプトアビジンコートされたビーズを使用し、cDNA上に存在するビオチンを結合することにより複合体を精製した。ヘテロ二本鎖をRNase Hで消化し、cDNAに対して相補的であるRNAを分解した。cDNAとは異なるすべてのmRNA配列はインタクトのままであった。続いて、これらの一本鎖RNAフラグメントまたは「ループ」を縮重プライマーで増幅し、pGEM-TベクターまたはpCR II TOPOベクター（市販）のいずれかにクローニングし、DATASライブラリーを產生した。

40

50

## 【0200】

クローンの配列決定およびバイオインフォマティクス分析；

DATASライブラリーを使用してE.coliを形質転換し、標準的な分子生物学技術を使用して個々のクローンを単離できた。これらのライブラリーから、10,665の個々のクローンを単離し、自動Applied Biosystems 3100シーケンサーを使用して配列決定した。得られたスクレオチド配列は、分析のためにバイオインフォマティクスパイプラインに提出した。DATASライブラリーをPCR増幅DNAで調製したため、ライブラリーから単離されたクローンにおいて同じ配列の多くのコピーが存在する。したがって、クローンの重複性を減少し、単離された1つしか存在しない非反復配列の数を同定することが重要である。この大きなDATASフラグメントのセットから、1699の1つしか存在しない非重複配列を同定し、各DATASフラグメントに候補遺伝子の注釈をつけた。2つの方法によりヒトゲノム配列に対するDATASフラグメントを整列することにより注釈を実施した；1) 公的に入手可能なアラインメントおよびゲノムビューアツールBlat (Kent et al., 2002)；および2) 市販のゲノムアラインメントおよびビューアツールProphecy (Doubletwist)。各DATASフラグメント配列には、DATASフラグメントを含むゲノム配列とオーバーラップする対応する遺伝子で注釈をつけた。遺伝子には、RefSeqアクセッション番号、または異なるアルゴリズム、例えば、Genscan、Twinscan、またはFgenesh++からの仮定に基づく遺伝子予測のいずれかで注釈をつけた。同定された遺伝子は、DATASフラグメントの配列に対して適合する（フラグメントに対するエクソンの適合の場合において）、またはDATASフラグメントとオーバーラップする（フラグメントに対するイントロンの適合の場合において）のいずれかであり、遺伝子の完全長配列が同定された。これらの配列をさらに分析し、すべての潜在的な膜貫通タンパク質を検出した。公的に入手可能な異なるアルゴリズムの使用を通じて膜タンパク質を予測した。例えば、候補遺伝子のアミノ酸配列内に存在する膜貫通ドメインを同定するためにTMHMM (CBS)を使用した。スプライシング事象が細胞内ドメインまたは細胞外ドメインに影響を与えるか否かを決定するための試みにおいて、DATASフラグメントは配列内に位置付けられた。配列に関連する遺伝子をランク付けし、成功した治療薬剤の同定を最大限にした。

10

20

30

## 【0201】

モノクローナル抗体の標的の選択：

抗体治療薬の開発のために最も高く優先付けされる遺伝子は、遺伝子が公知の膜タンパク質であり、遺伝子の機能が公知であり、および、タンパク質の細胞外ドメイン上のイントロンにマッピングされるDATASフラグメントが、DATASフラグメントが細胞外に提示されることを示し、モノクローナル抗体による治療介入のために入手可能である場合での特性を有する。

30

## 【0202】

バイオインフォマティクス分析に基づき、モノクローナル抗体治療薬の開発に関連するクローンを優先付けした。

## 【0203】

CTLエピトープの同定：

CTLスクリーニングアッセイにおける包含のために最も高く優先付けされるDATASフラグメントは、新規のエクソンまたはエクソン伸長を含むものなど、新規配列情報を含むものであった。好ましいDATASフラグメントのクローンは癌のイニシエーションまたは進行に関連付けられ、細胞質タンパク質をコード化する。

40

## 【0204】

ライブラリーベクターの中から192の選択されたDATASフラグメントをPCR増幅させ、真核生物発現ベクター中に、ねじれ型 (staggered) 開始部位イニシエーションコドンから下流に一方向にクローニングした。この配置によってDATASフラグメントがすべてのオープンリーディングフレームにおいて発現でき、正確なリーディングフレームが常に容易に明らかではないために、これは必要とされる。

## 【0205】

50

プラスミド調製を実施し、選択されたDATASフラグメントクローンを含む発現ベクターを96ウェルプレート中に再配列し、続いてこれを使用し、その全体が参照により組み入れられる国際公開広報第2005/032392号において過去に開示されたCTLアッセイにおける使用のためにガラススライドにスポットした。

#### 【0206】

DATAS発現ベクターの所望のマイクロアレイ位置を含むデザインファイルを高分解能スキャナー中にアップロードした。DATASフラグメントを含む発現ベクターをゼラチンおよびリポフェクタミンと混合し、次に、高分解能マイクロアレイスキャナー中にアップロードしたデザインファイルに適合するパターンにおいて2重でスポットした。以下の陽性コントロール、陰性コントロール、および実験サンプルをアレイ上にスポットした。  
10

- a) インサートなしのベクトル（陰性コントロール）
- b) 増強緑色蛍光タンパク質（EGFP）をコード化するベクター
- c) DATASフラグメントインサートを含むベクター
- d) cDNAをコード化するインフルエンザNPを含むベクター（陽性コントロール）

#### 【0207】

次に、スポットしたアレイにHLAクラスI（例、HLA-A2）を発現する付着性293Tを重ねて48～72時間にわたり培養し、ベクターによりコード化される転写物を発現する時間を細胞に与えた。

#### 【0208】

次に、培養したリバーストランスクレプト・マイクロアレイスライド上で健常患者および前立腺癌患者からのHLA適合CD8<sup>+</sup>T細胞を4時間にわたりインキュベートさせることによりCTL反応性のアッセイを実施した。アレイとのインキュベーション前に、健常者または患者からのT細胞は、大幅にまたは小幅にインビトロで拡大させ、応答性T細胞の頻度を増強する必要がある。活性化カスパーーゼのインヒビターである蛍光タグ付き（スルホーローダミン）-Z-VADは、細胞のインキュベーションを通じて存在し、特定のスポット上の抗原発現付着細胞がCTLにより死亡が誘導された場合に活性化されるカスパーーゼに結合する。次に、スライドを洗浄して未結合蛍光Z-VADを除去し、マイクロアレイスキャナーでマイクロアレイスライドの2色（緑および赤）蛍光画像を得る。  
20

#### 【0209】

次に、スキャン画像の目視検査によりデータの分析および確認を決定する。EGFPベクターコントロールスポットで緑色蛍光を観察することによりリバーストランスクレーションの成功を評価する。次に、マイクロアレイスキャナー上で蛍光閾値を適宜調整し、関連するバックグラウンドおよび陽性コントロールシグナル強度を確立する。次に、赤色蛍光シグナルの存在によりT細胞が陽性応答を有したDATASスポットを同定する。スポットのための座標位置を使用し、陽性応答を生じるcDNAを同定する。  
30

#### 【0210】

発現モニタリング：  
前立腺癌のための有効なエピトープ標的は、エピトープの発現が前立腺組織、または好ましくは前立腺組織に限定されることを要求する。優先付けされた各配列のための発現プロファイルの評価は、当技術分野において周知の手法であるRT-PCRにより実施した。GeneAmpl PCR system 9700, Applied Biosystemsのためのユーザーマニュアルにおいて記載される、タッチダウンPCRとして公知のプロトコルを使用した。簡単に説明すると、DATASフラグメントに対するPCRプライマーをデザインし、エンドポイントRT-PCR分析のために使用した。各RT反応は、5 μgの全RNAを含み、Archive RT Kit (Applied Biosystems)を使用して100 μL容積中で実施した。RT反応物を水で1:50に希釈し、4 μLの希釈ストックを50 μLのPCR反応中にいて使用し、PCR反応は94℃ 3分間の1サイクル、94℃ 30秒、60℃ 30秒、および72℃ 45秒の5サイクルからなり、各サイクルでアニーリング温度を0.5℃ ずつ減少した。この後に94℃ 30秒、55℃ 30秒、および72℃ 45秒の30サイクルが続く。分析のために各反応から15 μLを取り、反応を追加の10サイクル続行した。これは30サイクルおよび40サイクルでの分析のための反応を產生し、40サイクルの反応が飽和した場合での発現における  
40

差異の検出を可能にした。正常前立腺および腫瘍前立腺の全RNA、ならびに、脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、大腸、骨髄、筋肉、脾臓、および睾丸の正常サンプルからの全RNAにおいてDATASフラグメントの発現プロファイルのレベルを決定した。発現プロファイルは、前立腺腫瘍における特異的発現および正常前立腺を含む正常組織において見出される低発現に応じて優先付けされる。

#### 【0211】

##### RNA構造の検証：

DATASによって実験サンプル間で変化した配列が同定される。しかし、単離されたDATASフラグメント配列から、DATASフラグメントが表す接合部または境界の厳密な配列を直接的に決定できない。一方、DATASフラグメントを使用し、各サンプル中に存在する各転写物の配列を解明する実験をデザインした。提示されたDATASフラグメント配列よりも大きな遺伝子の領域を増幅するためにプライマーをデザインした。続いて、すべてのエクソンおよびイントロンの厳密な接合部の同定のために、これらの単位複製配列をクローニングし、配列決定した。これは、アイソフォームの一次構造（配列）を検証するために、同定されたサンプルからのアイソフォームの部分的クローニングを要求した。優先付けした遺伝子のmRNA構造の検証のために、DATASライブラリーを作成するために最初に使用した20サンプル（10の正常サンプルおよび10の腫瘍サンプル）すべてを使用した。

10

#### 【0212】

##### アイソフォームの全長クローンの単離：

構造の検証過程の間に作成された情報およびDNAフラグメントを利用して、両方のアイソフォームを含む全長クローンの単離が達成された。全長クローンの単離に対していくつかの方法を適用可能である。コード配列に関する完全な配列情報を入手可能である場合、配列から遺伝子特異的プライマーをデザインし、組織サンプルの全RNAから直接的にコード配列を増幅するために使用した。これらの遺伝子特異的プライマーを使用してRT-PCR反応を準備した。以下に記載した通りに、cDNAのプライマーとしてオリゴdTを使用してRT-PCR反応を実施した。標準方法により第二鎖を產生し、二本鎖cDNAを产生した。遺伝子特異的プライマーを使用して遺伝子のPCR増幅を達成した。PCRは、94 30秒、55 30秒、および72 45秒の30サイクルからなった。反応産物を1%アガロースゲル上で分析し、単位複製配列のクローニングのためのAオーバーハングを伴う調製ベクター中に単位複製配列を連結した。単位複製配列のクローニングおよび単離のために1μLのライゲーション混合物を使用し、E. coliを形質転換した。精製された時点で、ABI 3100自動シークエンサーで単位複製配列を含むプラスミドを配列決定した。

20

30

#### 【0213】

限定された配列情報を入手可能な場合、オリゴプリーリング（oligo pulling）方法を利用した。簡単に説明すると、DATASフラグメントに基づいて遺伝子特異的オリゴヌクレオチドをデザインした。オリゴヌクレオチドをビオチンで標識し、Sambrook et al. (1989)の手順に従って、正常前立腺組織または前立腺腫瘍組織のいずれかから調製した一本鎖プラスミドDNAライブラリーとハイブリダイズするために使用した。ハイブリダイズしたcDNAをストレプトアビジンコンジュゲートビーズにより分離し、加熱により溶出した。溶出されたcDNAを二本鎖プラスミドDNAに変換し、E. coli細胞を形質転換するために使用し、最も長いcDNAクローンをDNA配列決定にかけた。

40

#### 【0214】

##### 結果

上記の方法を使用し、前立腺腫瘍組織により発現されるエクソン（新規スプライス変異体）に対応すると推定され、生産的CTL応答を誘発する23のDNAフラグメントを同定した。陽性結果を生んだ配列IDおよび対応する患者IDを表1においてまとめている。表1においてDATASフラグメントクローンにより表わされる反復レスポンダーおよびスプライス事象も列挙する。

#### 【0215】

表2においてこれらのDNA配列が含まれ、配列番号：1～23を有する核酸配列に対応する

50

。BLATおよびUCSC Genome Browserを使用し、March 2006ヒトゲノムアセンブリーを参照して、ゲノム配列位置を作成した。

【0216】

予測アルゴリズムを使用し、記載されたCTLアッセイにおいてモニターされるCTL応答を刺激する、各DATASフラグメントクローニング中に含まれる抗原ペプチドに対応しうる潜在的なHLA-A2結合ペプチドを同定する。表3において、この分析の結果が含まれる。発現ベクター中にクローニングされたフラグメントによりコード化される可能な各フレームについてペプチドを列挙する。予測された各ペプチドエピトープの左には、左に列挙された親タンパク質におけるそのペプチドのN末端アミノ酸の位置を示す数がある。各ペプチドの右には1から30までのスコアがあり、これは数が30に向かって上昇するにつれてHLA-A2に対するより高い親和性結合の可能性を示す。10

【0217】

【表1】

表1. CTL アッセイ陽性ヒット

特許 配列番号	陽性ヒットを伴う 患者 ID	反復陽性 ヒット	事象タイプ
No. 1	EYGRT		エクソン伸長
No. 2	EYGRT; MSMPB		エクソン伸長
No. 3	MSMPB		エクソン伸長
No. 4	P72		エクソン伸長
No. 5	EYGRT		エクソン伸長
No. 6	EYGRT		エクソン伸長
No. 7	P72	P72	エクソン伸長
No. 8	MSMPB		エクソン伸長
No. 9	EYGRT		新規エクソン
No. 10	MSMPB		新規エクソン
No. 11	MSMPB; P72		新規エクソン
No. 12	P72		新規エクソン
No. 13	MSMPB		エクソン伸長
No. 14	MSMPB		エクソン伸長
No. 15	MSMPB		ゲノムヒット
No. 16	P72	P72	エクソン伸長
No. 17	P72	P72	ゲノムヒット
No. 18	FRJY5		エクソン伸長
No. 19	EYGRT		新規エクソン
No. 20	P72		エクソン伸長
No. 21	EYGRT		エクソン伸長
No. 22	P72		エクソン伸長
No. 23	P72	P72	ゲノムヒット ゲノムヒット

10

20

30

40

【0218】

## 【表2】

表2. DATAS フラグメントの配列情報

配列番号: No. 1

EntrezGene ID: 51016

ゲノム配列: chr14:23,680,141-23,680,474

配列定義: 染色体 14 オープンリーディングフレーム 122

検証配列:

CTACCGGGGAAAGGGTCAAAGAGCGTGCGAAGCGCTGGAGGGAGCTTCACGGACGCGAGCTAGGCACCGGCT  
 CGCCTAATCCGGTACTAATCCGGCTTGCTGCTCCCGTCCAGGCCCGCTGCCATGGGGAGGTGGAGATCT  
 CGGCCCTGGCCTACGTGAAGATGTGCCTGCATGCTGCCGGTACCCACACGCCGAGTCACGGCTGTTTT  
 GGCGCCAGGCCGCGGTCTGGAGAATGCCTGTGCCTCACCGACTGTGTGCCCTCTTCCACAGGCCACCTGGAC  
 CTGTCCCGTCATGTTGGAGGTGCCCTCAACCAGGTGCCCTCGTTGCAT

10

配列番号: No. 2

EntrezGene ID: 84939

ゲノム配列: chr19:1,327,655-1,328,088

配列定義: メラノーマ関連抗原 (突然変異) 1

検証配列:

GGCTCAGGGGGCACGTTGCGTTGGACCTGCTGCGCGTCTCCTGCGTGGCAGTCCTGATTCCATACTTC  
 TGGAGAACCTCATTCGTTAACACTGAAAGCCAGTTCTCTTCTGGCAGTTTTTCATTATTTGGCA  
 TTTTTACAAGATAACCGTTGGAAAGGCTTGAAAGGACGGAAGCGTATTCACTGTGCAGCAGTACTCTG  
 GCTGTGCTGGTTCTCCGACGTGCACATCGATCTCGTATGTGTGGCATCTGATATTAAACGGGAGGTTT  
 AAGAACGCTCTGCCGTGATCATGGAGCTCGGAAGCGGAAATGGTCTCCGGGTTGCTGTTGTCTGTT  
 CCCCTTGTGTGGTTCCGCCTGCGACAGTCCAGAATTGCTCTCCACTCAGTGTGCTCTGCAGCTG

20

配列番号: No. 3

EntrezGene ID: 95

ゲノム配列: chr3:51,996,641-51,996,968

配列定義: アミノアシラーーゼ 1

検証配列:

CCAGGCAGCTGGCGAGGGGGTCACCCCTAGAGTTGCTCAGGTATGGACTTGGGACATGTGATGGGAGAGTGTG  
 GGAGCCGGGGAGACCAAGTGTGCAACAGTGGAGTGTGCTGGTGTGCATATGTCTGGCATTCT  
 TTATCTGTGACAGACACATTATCCAACAAGCATTGATGTAGAGGCCACTGTGGTGCTGGGAATGCTG  
 TGGGAGTAAAATTAGGCACAGTTCATGCCCTGTATGGTGAACACGGGAGATATAATCAAACATTATGTG  
 ATATTACTTTCTGAGAGAATCTCACTCCGTAC

30

配列番号: No. 4

EntrezGene ID: 5110

ゲノム配列: chr6:150,159,247-150,165,314

配列定義: プロテイン-L-イソアスパラギン酸 (D-アスパラギン酸) O-メチルトランスフェラーゼ (PCMT1)

検証配列:

GTAAGGGATGGAAGAATGGGATATGCTGAAGAAGCCCCTATGATGCCATTGATGGGAGCTGCAGCCCTG  
 TTGTACCCCCAGGCCTAATAGATCAGTTAAAGCCCAGGAAGATTGATATTGCTGTTGGCTGCAGGC  
 AAACCAAATGTTGGAGCAGTATGACAAGCTACAAGATGGCAGCATAAAATGAAGCCTGATGGGGGTGATA  
 TACGTGCCTTAACAGATAAAAGAAAAGCAGTGGTCCAGGTGGAAGTGAATTATCTTCTGCTCTTCTTC  
 CACACATGCAAGGTGAAAGGGTGGATTAAAGACATTAGACTACAAGAGCTGTTGGTTGTCACCTTA  
 TGCTCCTCAGA

配列番号: No. 5

EntrezGene ID: 24142

40

ゲノム配列: chr3:50,309,814-50,311,728

配列定義: N-アセチルトランスフェラーゼ 6

検証配列:

GTAAGGCATGTGGAATCCAGGGGCAGCTTGGCTGGCACGGCAGGATCCAGAGTCAGCTCAGCTGGGCTGGTA  
 CTCAGGATCAGCTCCATCCGGTGTAGGGTCTAGTGTAGGGTCACTGGCTGGGCCAGGGCTCAGAGTC  
 GCTCTGCCTATGCACAGGATCCAGGTTAGCTCAGGTGAGTCAGGCTGGGAGCCAAGGTCACCTGCTGCTAGGTTG  
 AGGTGGCTCAGTGCCAGGCTGGAGGTTAAGACCCCCAGTCTCCAGGCAGTAGCATCTCTCAGACACAGTGGC  
 TCTCCTCATGTTGATGCTGGCCTCTGGGATGTTCCGCGCTTAGCTCCGCACAGCTGGGTATCTCACTCAGTC  
 GCCACCTCGGCCTCCAAACA

配列番号: No. 6

EntrezGene ID: 7113

ゲノム配列: chr21:41,762,326-41,762,782

配列定義: 膜貫通プロテアーゼ, セリン 2

検証配列:

```
GCCGAGGTCTTCCCTAAGGACAGGGAGACTTGGTGGCTCAGCTCTGCAGGGAGAGCA  
CACTTCCCTCCCTGAGACCTCCACACGCACTACACAGATGGTCACAGCCCTATTCTCCAGCCCTGCCCGTC  
AGCTCATCCCAGCACCAACCCCTCTCCTGGGAAACCTGGATTCTCCTTACAACACTGGCGGTGCCTGCTGAAT  
GCAGCTCTGGAGTTCAGCTCAGGGAAAGAAATTCCCAGCTGAAACTATAGGGCTCTATCAGTGCATGG  
ATCCCCCTTATTACACCAACGGCTGGTCTGCTGAACCAATTCCCACACTCCTCACTGAACCCCCACCCAGG  
ACACACAGGCCTGTTCCCCCTGGCATGCACACACTCTTCTGGAGCACCGCACCCCTAGGCCGCC  
TGCTTCTCGGCTCCCCCTGCACA
```

10

配列番号: No. 7

EntrezGene ID: N/A

ゲノム配列: chr10:76,837,410-76,837,825

配列定義: GenBank ヒト mRNA BC029963

検証配列:

```
CCGATGGGGAAAGTTGCAGGGCAGGGCGGCAAGTTATTAAAGCACTGGCTGAAGTGAGGACAGAGAACT  
GGCAGGAGGTTACCCAGGCCAATTCTGGGCCATTCCGCCAACAGAACATGGGAGCTGCCCCAAGCTTTC  
TTGAGCCCCGCCGGCGGACGCTTCTCGGCTAATCTTCTGCAACTTTACAAAGCTGCCCTCTCCCCAGTT  
GATCTCTGCAAACACATCCTGGCGTCCGCGCAGATTGGAAACTATTTTACCGTCTGGGGCGAGGAGGTG  
CATTGAAATAAGGAAGGCAGGGCGCTCTAGCGTTCACCCCGACCAGGCTGGTCACCCAGTGGTCTC  
TTGCTCCCCCGCCCCACCCCTCGCGCCTCCAGAGCGCCATCGAATCTCTTGC
```

20

配列番号: No. 8

EntrezGene ID: 11273

ゲノム配列: chr16:28,750,682-28,751,068

配列定義: アタキシン 2-様

検証配列:

```
GTAGCAGGGCAGCAGACTTGGGAGAACGCGGGGATAACATCCGGCCACTGGAAGAAAAGGGGAGCTGTAGG  
ATGGTTACTGCTGGTCAACAGCAGTGAGTACAAGGCCTTACTCAAACAGCAAGAAAGTTACACACTATAC  
AACCAGAGTCACCAACTAAATGCTAGAACGCTAACAGCAGGTAATGGCCTATGGCCTATGGCA  
TCATCGACAACGGATGCTAAAGGAGTGGCAGGGATTCTGTTCCAGTCAACTCAAGCTACGCAGCAAGGCA  
AGCTCAGTTGACAGAATTCTGTAAATTCAAAAGAAACTAAAATTTCTATGGCTTCTATTGATTATTAT  
TTAGAGACAGGGTATCGCTCTGTTCCCC
```

配列番号: No. 9

EntrezGene ID: 5590

ゲノム配列: chr1:2,047,301-2,047,449

30

配列定義: プロテインキナーゼ C, ゼータ

検証配列:

```
GGCAAAGGATGTTGCCCTGTCCTGAAGGCTGTCGCCGATCGCTCTATCCAAGGCTGCCCTGGGGCAGCGT  
CACCTGGGGGTCTGCGGGGCTCTCAGCACAGCATCCAGCACTGCCACCTAGTGTGTTCCGTACGTCTC  
CTCCCCCG
```

配列番号: No. 10

EntrezGene ID: 7037

ゲノム配列: chr3:197,286,590-197,293,338

配列定義: トランスフェリンレセプター (p90, CD71)

検証配列:

```
GTGGCGAGGCGGTTGGGACGGAGGACGCGCTAGTGTCTTCTGTTGGCAGTTCAGAATGATGGATCAAGCT  
AGATCAGCATTCTCTAACTGTTGGTGGAGAACATTGTCATATAACCGGTTAGCCTGCTCTCC
```

40

配列番号: No. 11

EntrezGene ID: 64072

ゲノム配列: chr10:73,173,842-73,174,176

配列定義: カドヘリン -様 23

検証配列:

```
GACACCCTAGCTGCAAGGGAGGTTAGAAAAAATGAGGGACAGGATTATCATGGTCAGCATATTACTGGGGC  
CAGATATATCACTCCCACACAAAGCAGGCCTCTGTCAGTGAGGAAGAAGTGGAGAATGGATTGGGTGG  
CATCTGACAGCATTGCCACACTGCCCTCCCCAACCTTAATGCAGGCCAGTCAACGCACCACCCACTCCCC
```

ACCCACACTCCAACCCCCACAGTCCTAGGGTCTCTCAGGGAGACCATCGGTGGAATCCATAACATTCTAAGAC  
CCTGCAGTTGTAGGCAAATCAGGCTCCTTGGGTGCCCG

配列番号: No. 12

EntrezGene ID: 65217

ゲノム配列: chr10:56,047,284-56,047,451

配列定義: ホモサピエンス プロトカドヘリン 15 (PCDH15)

検証配列:

GTGAGAGACCTCGAATTACAGGCATGAGCCACCGTGCCTGGCCTTTCTTTAAGCTACTTTTAATAT  
ATAGTAATGACTGTTAATATAGTATATACTATGCTATTCAATGCTGTAACTTCTAGTTCATTTCTC  
ACTCAATTGAAGTCCAGGTACCCAGGTCCACACG

10

配列番号: No. 13

EntrezGene ID: 57194

ゲノム配列: chr15:23,479,621-23,484,596

配列定義: ATPアーゼ, クラス V, タイプ 10A

検証配列:

GGAGGAGGTGGCATCACAGTAACAGGAATCCCTCTCCCTTGAAAGGCAGTGATGGCCAGCGACTTGCAGT  
GCCGAAATTCCGATACCTGGAGAGGCTTGTGATTCTCACGGGCATTGGTGCCTCCGACTTGCAACATG  
GTGCTGACTCTCTACAAAAACACAATGTCGTGGCCTCTGTTGGTCCAGTTCTGTGGCTTCT  
CTGCATCTACCATGATTGACAGTGGTATCTAATCTCTTAATCTGCTCTCGTACCTCCAACGA

配列番号: No. 14

EntrezGene ID: 7701

ゲノム配列: chr2:219,231,947-219,232,130

配列定義: ジングルフィンガー プロテイン 142 (クローナ pHZ-49)

20

検証配列:

CGGACCAAGGACAAAATCATGACGATGCTCCATCCAAAGCCTCCAGGTTACAAACCGCCTTCCAGTTCGCTG  
GCTCTTATGATCCAGCTCTGCCAGATGTGGACACTGTCATCACCTCCATTACAGATAGGAAAGCTGA  
GCCAGAGAACGAAAGCGACTGTGTCTGTCCAAGACCACGCGCCCTCCCTGTC

配列番号: No. 15

EntrezGene ID: N/A

ゲノム配列:

配列定義: GenBank ヒト mRNA AF116698 (イントロンヒット)

検証配列:

CGCGCACCTGGTACGGGTATGTTCCATTGTGCTGGCCACGGTGATGATGATGATGCCATCTCTCC  
GGCTACACTGCGAGCACAGATCACAGCTCTGTAGCTGATGCTGGCTCTACCCACTGTATCGGG

30

配列番号: No. 16

EntrezGene ID: 26993

ゲノム配列: chr19:15,372,085-15,372,898

配列定義: A キナーゼ (PRKA) アンカープロテイン 8-様, AKAP8L

検証配列:

GGGGAGGCACCCCAGGAAACTCACCTCTGGATCCTCTTGCCTCTCTCCCACCTCTTTCC  
CCTCATCCTCTCCGTCCACTCTGGAGCCCTCTCCACAGCCTCGCACCC

配列番号: No. 17

EntrezGene ID: N/A

ゲノム配列: chr4:171,259,069-171,259,517

配列定義: ゲノムヒット

検証配列:

GCCGCAGGATTGAAACGTTATACAGCGGACCCAGTGAGACACCAGCTGGGTGGCAAAGGAGTGCTAGTGTC  
ACCCCTCTCTAACTCCAGAAAGCACAGCTTGAGCTAGGAGAGACTCCTTTGGTGAGGAAAGGAAAGG  
GAAGAGTAAAGAGGATTGTCTGGCAACTGGGATACCAGCCCAGCCACAGTAACATAAAACAAGCAGAT  
CCCTGAAGTCTCCATTCCAGGCCCTAGCTCTGGATAACATTCTAGACCCACCTGGCCAGAAAAGAACCT  
GTTACCTGAAGGAAAAACAAAGTCTGGAGAAACTCACCACCTGCTGACTAAAGAGCCGTAGTCCTTGAA  
TAAACATTAGTAGCAGCCAGGCAGTACTCATCACAGACCTAGAACAGTGACGGCATGGAAAAGACTCTTT  
TGAAGAAAGGAGAGGGAGGTAAAAGGACTTTGTCT

40

配列番号: No. 18

EntrezGene ID: 9570

ゲノム配列: chr17:42,371,388-42,371,614

配列定義: ゴルジ SNAP レセプター 複合体 メンバー 2

検証配列:

```
GGCCTAGGGCACGAGGATGTGAATCGACCTACTACTTAATATAATGGCTGTGAGAAAAGGCCTTTCCCTT  
TCCTTCCACTTGCTCCACCCTATCAGGAGCCAGAAAGGCCTGATGGTGACAAGGTGTGAACCGTGTGGAC  
AGTCCTGCACACAGGGCTCACTGTGGACACCTCCCAGGGCACGCATCAGCTGTGAACAAAGCCACCAAAG  
CCATTCTTCCTCCCCCGC
```

配列番号: No. 19

EntrezGene ID: N/A

ゲノム配列: chr13:21,727,184-21,727,549

配列定義: GenBank ヒト mRNA AK054845

検証配列:

```
GGGGACAGGCAGAGGTTGCACTGCACTCCAGCCTGGTGACAGATCAAGATTCTGTCTCAAGTAATAATAATG  
ATGATGATGATGATGATGATGATAATAACACACCTGTTAATGTTAATTCAGTGTAAATCAATT  
AACTCATTTCTCATAATTACCCCTGAACGAGTAAGTTATTGACATTCTCCATGGGAAAAAAACCCCTTGG  
AGAAAGGTAACCTGAATATGCCAATGGCAATTGGATAGAACACTGGGATTGAACCTAGGACATCTGATT  
CACATCCTTCATGAGCCACAATGCTCTACATGTGGTTATTCTGGATCACATGTAACACATCCATAAA  
AGTGCCTCCCCCG
```

10

配列番号: No. 20

EntrezGene ID: 29091

ゲノム配列: chr14:24,351,679-24,351,865

配列定義: ホモサビエンス シンタキシン結合 ダンパク質 6 (アミシン) (STXBP6)

検証配列:

```
CTCCCGGCCATGGCGCGGATGTCCCGAATTCTGTAAACTGCTGAACAAACTCTCCAGTTCTCTTA  
AGAAGAGTCACCAGGATAGGCAGTTCTAACATTGTGCTCATGGCAAGCTAAGGAGAGAGAGGAATGAGA  
AAAGTAAGACTTATTAGCAGGTATTAGCAGAGAGATTCACTGTGCTGCTCCCTCTCACCTCCCC
```

20

配列番号: No. 21

EntrezGene ID: N/A

ゲノム配列: chr6:146,238,220-146,238,476

配列定義: GenBank ヒト mRNA AK123820

検証配列:

```
GGCGGCAGGTCTAATCTGGCACACTTGCTAACTTCTAAATAAGAATCAAATGGCTTCCAACTCACATAATGA  
CTAATTCTAAAGCATGCAACCTCAAAGTACTACATTCTCCCTGTTCTAGAAATACAACCCCTAGAGGGCCAGTC  
TTCCTCAGCATTCAAATATTGAGTAGAACAACTGAACTGTAAGGTTCAACTAAAGGAATGCAACTGTGACTT  
GAGCTGTGGAACGGCTATGGCCTAAGTCAAGAATTCTCACACCTCCCCAC
```

30

配列番号: No. 22

EntrezGene ID: 4343

ゲノム配列: chr1:113,044,178-113,044,827

配列定義: ホモサビエンス モロニー 白血病 ウィルス 10, (MOV10) - ID

検証配列:

```
GTTAGGAGGTAGAGGGCTGAGCTGCTCAGACCTTGAGTAAATTCTGTCCCTGTTGCAGGTCCAGTTGGC  
AGGGAAAGGGACACCCGGTATACCCCTCGTTCTTACAGAACTCCAGGAATCTGTGGGTACAGAGGAGTGC  
CAGCAGAGACTGGAGGCTAACGCCACGGCTGTCCCCTGAGCTGTACTGCTAACCTCTGGATGTCAATT  
AACTTATAAAATACAATAGTGTGCTGTGAAAATGGACACATCTGGGATTAACTGAGCGATAAGCAAGCGCTT  
AAAAAAGATCCACCTGCC
```

40

配列番号: No. 23

EntrezGene ID: N/A

ゲノム配列: chr15:78,115,339-78,115,450

配列定義: ゲノムヒット

検証配列:

```
GCCCCCACCTGCTGCCAGTTCTCTATGATCCAGCTCTAAATGCTTCCAAATTATAAGGTGAATAAAAATCC  
TTAAGGACCTGTCAAAATGACAACACTGATTAGGTCCGCACG
```

表3. HLA-A2結合ペプチド分析

No.1	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチドF1	HLA-A2ペプチド2	HLA-A2ペプチド3	HLA-A2ペプチド4	HLA-A2ペプチド5	HLA-A2ペプチド6	HLA-A2ペプチド7
フレーム1	LPGEGSKSYPKRWRELHGREI GTGSPNPFVLLRAASRPGLARHGGGGDGLPGLREDV PACCVPTRRSQ	(32)IRLAASRPGL(24)	(71)AVFGASAAG(22)	(48)DLGGLIREDV(21)	(25)SPNPVLURL(19)	(52)GLREDV/PAC(19)	(8)SV/PKRWREL(18)	(91)PLPQQPGPV(18)
フレーム2	YRGKGKORACRSAAGGSFTDAS	(11)SAGGSFTD(12)	(10)RSAGGSFTD(8)	(4)KGQFACRSA(7)	(3)GKRSAGGSFT(6)	(12)AGGSFTDAS(6)	(7)RACRSAGGSF(6)	
フレーム3	TGGRVYKERAEEALLEGASRTRARRHLA	(11)ALEGASRTRA(17)	(4)RVERAEAL(16)	(15)ASRTRARRHL(13)	(16)SRTRARRHL(12)	(3)GVRVERAEAL(12)	(10)EAELEGASRT(11)	(6)KERAEALEGA(10)
No.2	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチドF1	HLA-A2ペプチド2	HLA-A2ペプチド3	HLA-A2ペプチド4	HLA-A2ペプチド5	HLA-A2ペプチド6	HLA-A2ペプチド7
フレーム1	GSGGTFAFGPVCAFSCAVLISILNPFR	(12)CAFSCAVL(21)	(16)CVAVLISIL(21)	(19)YLISILLEN(20)	(11)YCAFSCLVAVL(18)	(15)SCVAVLISIL(16)	(6)FAFGPVCAF(14)	(2)SGGGTFAFGPV(12)
フレーム2	AQGARLRLDSARSAPAWQS	(5)PLRLDLSARI(15)	(2)QGARLRLDL(14)	(7)RLDLSARSAPA(14)	(1)AQGARLRLDL(13)	(4)ARLRLDSA(12)	(9)DLSARSAPAW(11)	(3)GARLRLDLs(9)
フレーム3	LRGHIVCVWTCLRVLLRGSPDFHTSGESISITLKAS SLFLAVFFILFLAFFTRVSGKAFFTEASYSLCAST PGCAVSPDVHIDLVCASDIKREVLRVSRCRDHGA SEAGNMVLPGLLCEFPCLVSACDSSRICSPQCA LQL	(112)MLPGLLFC(28)	(38)JFLAVFFILFL(28)	(36)JSLFLAVFFI(25)	(119)CLFPPCVUSA(25)	(29)ISLTLLKASSL(24)	(91)DIKREVLRSV(22)	(107)SEAGMVLPLGL(22)
No.3	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチドF1	HLA-A2ペプチド2	HLA-A2ペプチド3	HLA-A2ペプチド4	HLA-A2ペプチド5	HLA-A2ペプチド6	HLA-A2ペプチド7
フレーム1	PGSWRGHHPRVCSGMDLGHV/MGECGSRRGPCKCA	(33)ATVECVLGIV(24)	(37)CVLGIVSAV(22)	(3)SWRGHHHRV(17)	(27)RGRPKCA(17)	(11)VCSGMIDLGHV(17)	(14)GMOLGH/MGE(14)	(43)AYVWAFYL(13)
フレーム2	QAAGEGVTLFAQQVWTWDM	(2)QOAAAGEGVTL(1)	(6)GVTLFEFAQVWTWDM	(2)AAGEGVTL(14)	(8)TLEFAQVWV(14)	(11)FAQVWVWDM(11)	(7)VTLEFAQVW(10)	(4)GEGVTEFA(9)
フレーム3	RQLARGSP	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.4	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチドF1	HLA-A2ペプチド2	HLA-A2ペプチド3	HLA-A2ペプチド4	HLA-A2ペプチド5	HLA-A2ペプチド6	HLA-A2ペプチド7
フレーム1	VRDGRMGYAAEAPYDAIHVGAAAPVVPOALIDQL KPGGRILLPVPGAGGNOMLEQYDKLQDGSIKMKP MGIVYYPLTDKERQWSRWK	(5)1QMLEQYDKL(24)	(63)SIKMKPLMGV(24)	(69)LMGVIVYPL(22)	(16)AAHVGAAPV(22)	(33)QLKPGGGRIL(22)	(21)AAAAPVWPOAL(21)	(25)VVPDQALIDQL(19)
フレーム2	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	KGWKNIGIC	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.5	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチドF1	HLA-A2ペプチド2	HLA-A2ペプチド3	HLA-A2ペプチド4	HLA-A2ペプチド5	HLA-A2ペプチド6	HLA-A2ペプチド7
フレーム1	CWEAEVATE	(1)CWEAEVATE(7)	(2)WEAEVATE(6)	(1)CWEAEVATE(1)	(2)GRPWRLSEIPSCAEL(15)	(8)LEIPSCAEL(15)	(20)GTSQRPAST(13)	(13)ISCAELGRGT(12)
フレーム2	VGRPRWRLSEIPSCAELGRGTSORPAST	(9)SEIPSCAEL(20)	(7)RLSEIPSCA(16)	(2)GRPWRLSEIPSCA(16)	(1)CWEAEVATE(1)	(2)GRPWRLSEIPSCAEL(15)	(20)GTSQRPAST(13)	(16)ELGRGT(SQR(11)
フレーム3	LGGRGGD	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.6	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチドF1	HLA-A2ペプチド2	HLA-A2ペプチド3	HLA-A2ペプチド4	HLA-A2ペプチド5	HLA-A2ペプチド6	HLA-A2ペプチド7
フレーム1	CAGEPRSRRPREGRVCSRRVACQGNRRRLCVLG GVQ	(28)IRRLCVLGGV(17)	(25)RGNRRLCVL(15)	(7)SRPRREGRV(14)	(22)ACQORGNRRL(14)	(24)QRGNRRLCVL(14)	(21)CAQORGNRRL(14)	(14)RVCSRRVCA(10)
フレーム2	VQGSREAGGLGRVYCAPEECVYHARGETGACVSW	(5)REAGGLGRV(20)	(13)YACAPEECV(16)	(23)ARGETGACY(16)	(22)HARGETGACY(18)	(43)GSAEFSRWV(16)	(25)GETGACY(SWV(16)	(8)GGLGRVAC(15)
フレーム3	CRGAEKOAA	(2)CRGAEKOAA(5)	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.7	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチドF1	HLA-A2ペプチド2	HLA-A2ペプチド3	HLA-A2ペプチド4	HLA-A2ペプチド5	HLA-A2ペプチド6	HLA-A2ペプチド7
フレーム1	AREIRWRLWKAHEGWGGGAKRPLCDPAWSGVKR	(2)PLGDPAWSGV(19)	(3)EIRWRLWKA(15)	(23)LGDPAWSGV(15)	(14)GWGGGAKRPL(13)	(7)RLWKAHEGW(12)	(2)REIRWRLWKA(12)	(10)KAHEGWGGGA(12)
フレーム2	QERFDGGSGRRTKGGAEQRDHWTQPGPG	(15)GAGEQRDHWV(18)	(16)AGEQRDHWV(15)	(11)RTKGGAEQE(9)	(4)FDGGSGRR(7)	(8)ISGRRRTKGGA(7)	(3)RFDGGSGRRT(6)	(7)GSGRRRTKGG(6)
フレーム3	KRDMSMAALEGARRVGRGSKETTG	(6)ALEGARRV(22)	(5)MAALEGARRV(16)	(7)ALEGARRV(16)	(4)SMAALEGAR(4)	(13)RVGRGSKET(11)	(3)DSMAALEG(9)	(2)RDMSMAALEGA(9)

(46)

JP 2009-540852 A 2009.11.26

表3. HLA-A2結合ペプチド分析（続き）

No.8	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチド1 (1)GEOSDTLSLN(16)	HLA-A2ペプチド2 (2)EQSDTLSLN(2)	HLA-A2ペプチド3 (3)EQSDTLSLNK(2)	HLA-A2ペプチド4 (4)EQSDTLSLNK(-1)	HLA-A2ペプチド5 (5)EQSDTLSLNK(-1)	HLA-A2ペプチド6 HLA-A2ペプチド7
フレーム1	GEOQDTLSLNK	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム2	GNRAIPCL	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	GTERYPVSK	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.9	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチド1 (1)ALGQRHLGV(26)	HLA-A2ペプチド2 (2)ALRGLLSTA(24)	HLA-A2ペプチド3 (3)YLRGLLGVL(22)	HLA-A2ペプチド4 (4)AALGQRHLGV(22)	HLA-A2ペプチド5 (5)HGLVLRGLL(21)	HLA-A2ペプチド6 HLA-A2ペプチド7
フレーム1	GQRMLPLS	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム2	ASSTAT	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	AQHPALPPSVPSRLLPP	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.10	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチド1 (1)ALAVFFCVA(25)	HLA-A2ペプチド2 (2)ARRFGTEDALV(15)	HLA-A2ペプチド3 (3)DALVFFCVA(18)	HLA-A2ペプチド4 (4)RFFGTEDALV(12)	HLA-A2ペプチド5 (5)GTEDALVFF(11)	HLA-A2ペプチド6 HLA-A2ペプチド7
フレーム1	VARRFGTEDALVFFCVA(NDGSS	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム2	WRGGSGRRTR	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	GEAVRDGRASVLLCGSSE	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.11	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチド1 (1)DTLAAREVRKNEGDDYHGQHTWGPDISLPTQKQA	HLA-A2ペプチド2 (2)SLPLPTQKQDASV(26)	HLA-A2ペプチド3 (3)TWGPDISL(22)	HLA-A2ペプチド4 (4)HTWGPDISL(19)	HLA-A2ペプチド5 (5)PTQKQDASV(16)	HLA-A2ペプチド6 HLA-A2ペプチド7
フレーム1	SVSSEEVENGGVGVI	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム2	TP	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	HPSCKGG	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.12	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチド1 (1)CLAFSFLSY(18)	HLA-A2ペプチド2 (2)CLAFSFLSY(18)	HLA-A2ペプチド3 (3)CLAFSFLSY(18)	HLA-A2ペプチド4 (4)CLAFSFLSY(15)	HLA-A2ペプチド5 (5)CLAFSFLSY(14)	HLA-A2ペプチド6 HLA-A2ペプチド7
フレーム1	VETSNYRHPEPCLAFSFLSYFLIYSND	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム2	LRPRITGMSSHRAWPFLFF	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.13	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチド1 (1)EVGITSNRPNSPFEFGSDGORICSAEPIPGEALDSS	HLA-A2ペプチド2 (2)RALVLPITCQHGVLLQKHNVRGPPVLPVFLL	HLA-A2ペプチド3 (3)ALDSSRALV(24)	HLA-A2ペプチド4 (4)VLLQKHNV(24)	HLA-A2ペプチド5 (5)VLLQKHNV(24)	HLA-A2ペプチド6 HLA-A2ペプチド7
フレーム1	GGGRHHHQ	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム2	LICIYHD	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	RSSASPVVTGIPPLKAVMASDFAVPKFRYLERLLI	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム4	HGHWCYSRLANMVLYFFYKNTMFYGLFWFQFC	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム5	GFSASTMDQWYLFNNLFSSSPT	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.14	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチド1 (1)MLHPKPSRL(23)	HLA-A2ペプチド2 (2)MLHPKPSRL(23)	HLA-A2ペプチド3 (3)MLHPKPSRL(20)	HLA-A2ペプチド4 (4)MLHPKPSRL(17)	HLA-A2ペプチド5 (5)MLHPKPSRL(15)	HLA-A2ペプチド6 HLA-A2ペプチド7
フレーム1	RTRTKS	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム2	GPQNHHDDAAPSQAOFQVNRSSLALIMQLLPDDV	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	DVTISILQIGKLRPREAKRLCISKTRPPC	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム4	DQDKIMTMLHPKPSRLQTAPVWRLL	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
No.15	アミノ酸配列	HLA-A2ペプチド1 (1)MLHPKPSRL(23)	HLA-A2ペプチド2 (2)MLHPKPSRL(20)	HLA-A2ペプチド3 (3)MLHPKPSRL(17)	HLA-A2ペプチド4 (4)MLHPKPSRL(15)	HLA-A2ペプチド5 (5)MLHPKPSRL(15)	HLA-A2ペプチド6 HLA-A2ペプチド7
フレーム1	RRTWYYVVVPFLATVMMMMPSRLHOEHRSQL	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム2	LSVADAGSTHCIR	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム3	GAPGTWCMFHLCWPR	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし
フレーム4	AHLVRGVCSICAGHDLCS	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし	データなし

(47)

JP 2009-540852 A 2009.11.26

表3. HLA-A2結合ペプチド分析（続き）

No.16	アミノ酸配列 GCEAVEKGSRV/DGEDEEGKEDGREGEEKGPKGEF フレーム 1 SWGAS	HLA-A2ペプチド1 (3)EAIVEKGSRV(14) (2)CEAVEKGSRV(12)	HLA-A2ペプチド2 (10)RVDGEDEEG(8)	HLA-A2ペプチド3 (4)AVEKGSRVD(7)	HLA-A2ペプチド4 (9)SRVDGEDEE(7)	HLA-A2ペプチド5 (5)VEKGSRVDGE(7)	HLA-A2ペプチド6 (18)GKEDGREENG(5)
フレーム 2 FPGVPP	CARLWRRAPEWTERMREKRMGEKKAKRQRRVS	(20)RMGEKKAKR(17) (3)RLWRRAPEWTERMREKRMGEKKAKRQRRVS	(29)QRRYSPFGV(14) (25)KAKRIORRV(14)	(24)KAKRIORRV(13) (7)RAPEWTERM(12)	(28)RQRRYSPF(12)	(5)VEKGSRV(13)	(6)RAPEWTERM(12)
フレーム 3 VRGGCGEGLQSGRRG	(3)GC(GEGI QSG(11) (2)RGCGEGI QSG(8)	(1)VRGGCGEGI Q(3)	(4)CGEGI QSG(3)	(5)GEGLQSGRG(1)	(6)EGI QSGRGRG(1)	(7)RAPEWTERM(12)	(8)RQRRYSPF(12)
No.17	アミノ酸配列 RQSPFYSSLSFLQKESFPMAVT/LGL	HLA-A2ペプチド1 (18)PMAVTVLGL(23)	HLA-A2ペプチド2 (17)FPMAVTVLGL(18)	HLA-A2ペプチド3 (16)SFPMAVTVL(16)	HLA-A2ペプチド4 (11)SPEVSSLSEL(16)	HLA-A2ペプチド5 (11)FLOKESEPM(16)	HLA-A2ペプチド6 (15)ESFPMAVT(15)
フレーム 2 DKLVLTPPSPFKKSFLPWPSSLF	(14)KSLFPWPSSL(16) (15)SLFPWPSSL(15)	(3)VLFTPSPF(13)	(7)PPSPFFKKS(10)	(2)KVLFTTPSP(9)	(5)FTPPSPFFKK(9)	(8)PSRPFKKSL(8)	(9)PSRPFKKSL(8)
フレーム 3 TKSFLPLLSSSKRVSFHGRHCSRSYMSATAWLLM FQQLRAL	(32)LLMFIQGL(30) (31)WLLMFQIGL(27)	(34)LMFQQLRAL(26)	(5)LLPLLSSK(23)	(4)FLLPLLSS(21)	(6)LLPLLSKRV(21)	(26)VMSTAWLL(20)	(26)VMSTAWLL(20)
No.18	アミノ酸配列 AGEGKGNGFGGFVHTADACPQKV/STVSPV/ORTVHTV/HT LSPSGLSGS	HLA-A2ペプチド1 (17)ACPGKV/STV(21)	HLA-A2ペプチド2 (30)RTVHTV/HTL(21)	HLA-A2ペプチド3 (16)DACPQKV/STV(21)	HLA-A2ペプチド4 (13)HTADACPQKV(19)	HLA-A2ペプチド5 (26)SPV/CRTVHTV(19)	HLA-A2ペプチド6 (24)TV/SPV/CRTV(18)
フレーム 2 RGRRMVALVLTQLMRALGRCPQ	(10)ALFTOLMRA(24) (7)ALVALFTQL(23)	(3)RERMALVAL(17)	(2)GRERMALVAL(17)	(5)RMALVALFTQ(16)	(6)MALVALFTQL(16)	(14)QLMRALGR(15)	(14)QLMRALGR(15)
フレーム 3 GGGKEWLWNLCSHS	(2)GGKEWLWNL(16) (1)GGKEWLWNLCSHS	(1)GGGKEWLWNL(15)	(6)WLLWWLCSHS(12)	(4)KEWLWNLCSH(8)	(5)EWLWWLCSH(5)	(3)GEKEWLWNL(1)_	(3)GEKEWLWNL(1)_
No.19	アミノ酸配列 RGGEALLWMCYM	HLA-A2ペプチド1 (3)GEALLWMCYM(7)	HLA-A2ペプチド2 (2)GEALLWMWCY(4)	HLA-A2ペプチド3 (1)RGEALLWMWCY(4)	HLA-A2ペプチド4 (2)GEALLWMWCY(4)	HLA-A2ペプチド5 (1)RGEALLWMWCY(4)	HLA-A2ペプチド6 (23)ISTVSPV/CRTV(18)
フレーム 2 GGRHFYGCVTCDPRNKTTCRALWLMKRMWNQMS	(23)WLMKRMWNQMS(16) (15)KTTCRALWLM(16)	(9)YTCDCPRNKT(14)	(24)LMKRMWNQMS(14)	(2)ALWLMKRMWNQMS(14)	(1)ALWLMKRMWNQMS(13)	(1)GGRHFYGCV(12)	(17)ITCCRALWLM(12)
フレーム 3 GGGTFMDVLLHV/QEIKPHV/EHCGS	(11)YQEIKPHV(22) (3)GTFMDFDVLLHV(21)	(7)DVLLHV/QEIKPHV(19)	(10)HVIQEIKPHV(17)	(4)TFMDVLLHV(15)	(2)GGTFMDVLLHV(14)	(6)MDVLLHV(14)	(6)MDVLLHV(14)
No.20	アミノ酸配列 GGGGGEAAQ	HLA-A2ペプチド1 GGGGGEAAQ(6)	HLA-A2ペプチド2 GGGGGEAAQ(6)	HLA-A2ペプチド3 GGGGGEAAQ(6)	HLA-A2ペプチド4 GGGGGEAAQ(6)	HLA-A2ペプチド5 GGGGGEAAQ(6)	HLA-A2ペプチド6 GGGGGEAAQ(6)
フレーム 2 GEVEREQHSEISLIPANKVLLFSFLSLLSLP	(12)SLIPANKV(28) (1)GRWRGSSTV(16)	(2)LLFSFLSLL(28)	(13)LIPANKVLL(28)	(20)VLLFSFLSLL(28)	(14)LPANKVLL(22)	(23)FSFLSLLSL(19)	(19)YVLLFSFLSLL(20)
フレーム 3 GRWRGSSTV/KSLC	(4)RGSSSTV/KSL(15)	(3)WRGSSSTV/KS(6)	(2)WRGSSSTV/KS(6)	(3)WRGSSSTV/KS(6)	(2)RWRGSSSTV/K(2)	(5)GSSTV/KSLC(1)	(5)GSSTV/KSLC(1)
No.21	アミノ酸配列 VCG	HLA-A2ペプチド1 (13)STAQTVAF(24)	HLA-A2ペプチド2 (14)TAQTVAF(24)	HLA-A2ペプチド3 (15)LDLGHSRST(20)	HLA-A2ペプチド4 (11)SRSTAQVTV(18)	HLA-A2ペプチド5 (4)RILDLGHSR(15)	HLA-A2ペプチド6 (7)DLGHSRSTA(15)
フレーム 1 WEWENS	HLA-A2ペプチド1 VCG	HLA-A2ペプチド2 VCG	HLA-A2ペプチド3 VCG	HLA-A2ペプチド4 VCG	HLA-A2ペプチド5 VCG	HLA-A2ペプチド6 VCG	HLA-A2ペプチド6 VCG
フレーム 2 GRLRILDGHSSRSTAQVTVAF	(13)STAQTVAF(24)	(14)TAQTVAF(24)	(15)LDLGHSRST(20)	(11)SRSTAQVTV(18)	(4)RILDLGHSR(15)	(7)DLGHSRSTA(15)	(9)GHSRSTAQV(15)
No.22	アミノ酸配列 RADILNQCCHFDKVLKDFFSYSPYNLGSIRAGS	HLA-A2ペプチド1 (18)YSPYNLGS(17)	HLA-A2ペプチド2 (19)YSPYNLGS(15)	HLA-A2ペプチド3 (4)LNQCCHFDF(14)	HLA-A2ペプチド4 (5)LNQCCHFDF(14)	HLA-A2ペプチド5 (6)NQCCHFDF(12)	HLA-A2ペプチド6 (14)VLKDFYSPY(12)
フレーム 2 GGRWIFFKRLLIAQLIRRCCVHFHSITIVFIS	(11)IAQLIRRCCV(22) (4)WIFFKRLL(18)	(7)FKRLLIAQL(18)	(10)LLIAQL(18)	(14)QLIQLRHF(17)	(19)CVHFHSITV(17)	(12)IAQLIRRCCV(16)	(14)QLIQLRHF(17)
フレーム 3 GAGGSFLSAICLSSL	(5)SFLSAICLSSL(17) (6)JFLSAICLSSL(15)	(4)GSFISACLSSL(15)	(2)AGGSFLSAICL(14)	(1)GAGGSFLSAICL(13)	(3)GGSFLSAICL(13)	(1)GAGGSFLSAICL(12)	(1)GAGGSFLSAICL(12)
No.23	アミノ酸配列 CGPTKSVLSF	HLA-A2ペプチド1 CGPTKSVLSF(7)	HLA-A2ペプチド2 CGPTKSVLSF(7)	HLA-A2ペプチド3 CGPTKSVLSF(7)	HLA-A2ペプチド4 CGPTKSVLSF(7)	HLA-A2ペプチド5 CGPTKSVLSF(7)	HLA-A2ペプチド6 CGPTKSVLSF(7)
フレーム 1 RADILNQCCHFDKVLKDFFSYSPYNLGSIRAGS	(18)YSPYNLGS(17)	(19)YSPYNLGS(15)	(4)LNQCCHFDF(14)	(5)LNQCCHFDF(14)	(6)NQCCHFDF(12)	(6)NQCCHFDF(12)	(6)NQCCHFDF(12)
フレーム 2 VRTY	HLA-A2ペプチド1 VRTY	HLA-A2ペプチド2 VRTY	HLA-A2ペプチド3 VRTY	HLA-A2ペプチド4 VRTY	HLA-A2ペプチド5 VRTY	HLA-A2ペプチド6 VRTY	HLA-A2ペプチド6 VRTY
フレーム 3 CGPTKSVLSF	(2)GPTKSVLSF(7)	(1)CGPTKSVLSF(7)	(1)CGPTKSVLS(3)	(1)CGPTKSVLS(3)	(1)CGPTKSVLS(3)	(1)CGPTKSVLS(3)	(1)CGPTKSVLS(3)

(48)

JP 2009-540852 A 2009.11.26

## 【表4】

## 参考文献

Akiyama et al., Gene Ther., 7:2113–2121, 2000.

Alcaraz et al., Cancer Res., 55:3998-4002, 1994.

Allhoff et al., World J. Urol., 7:12-16, 1989.

An et al., Proc. Amer. Assn. Canc. Res., 36:82, 1995.

10

An et al., Molec. Urol., 2: 305-309, 1998.

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.

Ashley et al., J. Exp. Med., 186:1177–1182, 1997.

Ashton-Richardt, Crit. Rev. Immunol., 25:161-82, 2005.

Babian et al., J. Urol., 156:432-437, 1996.

20

Badalament et al., J. Urol., 156:1375-1380, 1996.

Baichwal and Sugden, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), Plenum Press, New York, pp 117-148, 1986.

Banchereau and Steinman, Nature, 392:245–252, 1998.

Bangharn et al., J. Mol. Biol. 13: 238-252, 1965.

Barinaga, Science, 271: 1233, 1996.

30

Bedzyk et al., J. Biol. Chem., 265:18615, 1990

Bell et al., "Gynecological and Genitourinary Tumors," In: Diagnostic Immunopathology, Colvin, Bhan and McCluskey (Eds.), 2nd edition, Ch. 31, Raven Press, New York, pp 579-597, 1995.

Bellus, J Macromol. Sci. Pure Appl. Chem., A31(1):1355-1376, 1994.

Benvenisty and Neshif, Proc. Nat. Acad Sci. USA, 83:9551-9555, 1986.

Berzofsky et al., J. Clinical Invest., 11:1515-1525, 2004.

40

Bittner et al., Methods in Enzymol, 153:516-544, 1987.

Bonifaz et al., J. Exp. Med., 196:1627–1638, 2002.

Bookstein et al., Science, 247:712-715, 1990a.

Bookstein et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 87:7762-7767, 1990b.

Bova et al., Cancer Res., 53:3869-3873, 1993

Brawn et al., *The Prostate*, 28:295-299, 1996.

Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Vol.13:75-83, Elsevier, Amsterdam, 1984.

Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 76:425, 1977.

Carter and Coffey, In: *Prostate Cancer: The Second Tokyo Symposium*, J. P. Karr and H. Yamanak (Eds.), Elsevier, New York, pp 19-27, 1989.

10

Carter and Coffey, *Prostate*, 16:3948, 1990.

Carter et al., *Proc. Nat'l Acad Sci. USA*, 87:8751-8755, 1990.

Carter et al., *Proc. Nat'l Acad Sci. USA*, 93: 749-753, 1996.

Carter et al., *J. Urol.*, 157:2206-2209, 1997.

Cech et al., *Cell*, 27:487496, 1981.

Chang et al., *Hepatology*, 14: 124A, 1991.

20

Chaudhary et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 87:9491, 1990

Chen and Okayama, *MoL Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.

Chen et al., *Clin. Chem.*, 41:273-282, 1995a.

Chen et al., *Proc. Am. Urol. Assn*, 153:267A, 1995.

Chen et al., *Int. Immunol.*, 15:427–435, 2003.

30

Chinault and Carbon, "Overlap Hybridization Screening: Isolation and Characterization of Overlapping DNA Fragments Surrounding the LEU2 Gene on Yeast Chromosome III," *Gene*, 5:111-126, 1979.

Chomczynski and Sacchi, *Anal. Biochem.*, 162:156-159, 1987.

Christensson et al., *J. Urol.*, 150:100-105, 1993.

Coffin, In: *Virology*, Fields et al. (Eds.), Raven Press, New York, pp 1437-1500, 1990.

Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1, 1981.

40

Colvin et al., *Diagnostic Immunopathology*, 2nd edition, Raven Press, New York, 1995.

Cooner et al., *J. Urol.*, 143:1146-1154, 1990.

Couch et al., Am. Rev. Resp. Dis., 88:394-403, 1963.

Coupar et al., Gene, 68:1-10, 1988.

Culver et al., Science, 256:1550-1552, 1992.

Davey et al., EPO No. 329 822.

Deamer and Uster, "Liposome Preparation: Methods and Mechanisms," In: Liposomes, M. Ostro (Ed.), 1983.

10

Diamond et al., J. Urol., 128:729-734, 1982.

Donahue et al., J. Biol. Chem., 269:8604-8609, 1994.

Dong et al., Science, 268:884-886, 1995.

Drugs R D, 7:197-201, 2006.

Dubensky et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:7529-7533, 1984.

Dumont et al., J. Immunol., 152:992-1003, 1994.

20

Elledge et al., Cancer Res. 54:3752-3757, 1994

Esslinger et al., Hum. Gene Ther., 13:1091-1100, 2002.

European Patent Application EPO No. 320 308

Fearon et al., Science, 247:47-56, 1990.

Fechheimer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.

Flutter et al., Cell Mol. Immunol., 1:22-30, 2004.

30

Fong and Engleman, Annu. Rev. Immunol., 18:245-273, 2000.

Fong et al., J. Immunol., 167:7150-7156, 2001.

Forster and Symons, Cell, 49:211-220, 1987.

Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 76:3348-3352, 1979.

Friedmann, Science, 244:1275-1281, 1989.

40

Freifelder, In: Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2nd ed., Wm. Freeman and Co., New York, N.Y., 1982.

Frohman, In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York,

1990.

Gabrilovich et al., *Cell Immunol.*, 170:111–119, 1996.

Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Gerlach et al., *Nature (London)*, 328:802-805, 1987.

Ghosh-Choudhury et al., *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.

Gingeras et al., PCT Application WO 88/10315.

10

Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, New York, pp 87-104, 1991.

Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2nd ed., Academic Press, Orlando, Fla., pp 60-61, 65-66, 71-74, 1986.

Gomez-Foix et al., *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.

Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

20

Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.

Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

Graham and Prevec, In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols 7*, E. J. Murray (Ed.), Humana Press, Clifton, N.J., pp 205-225, 1991.

Gregoriadis (ed.), In: *Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp 287-341, 1979.

Grunhaus and Horwitz, *Sem. Virol.*, 3:237-252, 1992.

30

Guermonprez et al., *Springer Semin. Immunopathol.*, 26:257-271, 2005.

Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.

Harris et al., *J. Urol.*, 157:1740-1743, 1997.

Heng et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89: 9509-9513, 1992.

Hermonat and Muzycska, *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 81:6466-6470, 1984.

Hersdorffer et al., *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.

40

Herz and Gerard, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.

Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149, 1968.

Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073, 1980.

Holland et al., Biochemistry, 17:4900, 1978.

Horoszewicz, Kawinski and Murphy, Anticancer Res., 7:927-936, 1987.

Horwich, et al., J. Virol., 64:642-650, 1990.

Huang et al., Prostate, 23: 201-212, 1993.

Innis et al., In: PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego Calif., 1990.

Inouye et al., Nucl. Acids Res., 13:3101-3109, 1985.

10

International Patent Application No. PCT/US2005/032392

Isaacs et al., Cancer Res., 51:4716-4720, 1991.

Isaacs et al., Sem. Oncol., 21:1-18, 1994.

Israeli et al., Cancer Res., 54:1807-1811, 1994.

Jacobson et al., JAMA, 274:1445-1449, 1995.

20

Johnson et al., In: Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto et al., (Eds.), Chapman and Hall, New York, 1993.

Jones, Genetics, 85:12, 1977.

Jones and Shenk, Cell, 13:181-188, 1978.

Joyce, Nature, 338:217-244, 1989.

Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989.

30

Kato et al., J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.

Kent, et al., Genome Res. 12:996-1006 (2002).

Kim and Cech, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8788-8792, 1987.

Kingsman et al., Gene, 7:141, 1979.

Klein et al., Nature, 327:70-73, 1987.

Knutson et al., Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord., 5:365-371.

40

Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975.

Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976.

Kwoh et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86:1173, 1989.

Landis et al., CA Cancer J. Clin., 48: 6-29, 1998.

Le Gal La Salle et al., Science, 259:988-990, 1993.

Levrero et al., Gene, 10 1: 195-202, 1991.

Liang and Pardee, Science, 257:967-971, 1992.

Liang and Pardee, U.S. Pat. No. 5,262,311, 1993.

10

Liang et al., Cancer Res., 52:6966-6968, 1992.

Lifton, Science, 272:676, 1996.

Lilja et al., Clin. Chem., 37:1618-1625, 1991.

Lithrup et al., Cancer, 74:3146-3150, 1994.

Lowy et al., Cell, 22:817, 1980.

20

Macoska et al., Cancer Res., 54:3824-3830, 1994.

Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983.

Markowitz et al., J. Virol., 62:1120-1124, 1988.

Marley et al., Urology, 48(6A): 16-22, 1996.

Mayordomo et al., J. Exp. Med., 183:1357-1365, 1996.

McCormack et al., Urology, 45:729-744, 1995.

30

Michel and Westhof, J. Mol. Biol. 216:585-610, 1990.

Miki et al., Science, 266:66-71, 1994.

Miller et al., PCT Application, WO 89/06700.

Mok et al., Gynecol. Oncol., 52:247-252, 1994.

Morahan et al., Science 272:1811, 1996.

Mulligan et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 78:2072, 1981.

40

Mulligan, Science, 260:926-932, 1993.

Murphy et al., Cancer, 78: 809-818, 1996.

Murphy et al., Prostate, 26:164-168, 1995.

Nair et al., Int. J. Cancer, 70:706–715, 1997.

Nakamura et al., In: *Handbook of Experimental Immunology*, (4th Ed.), Weir, E., Herzenberg, L. A., Blackwell, C., Herzenberg, L. (Eds.), Vol. 1, Chapter 27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.

Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Butterworth, Stoneham, p 494-513, 1988.

10

Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

O'Dowd et al., *J. Urol.*, 158:687-698, 1997.

O'Hare et al., *Proc. Nat'l Acad Sci. USA*, 78:1527, 1981.

Oesterling et al., *J. Urol.*, 154:1090-1095, 1995.

Ohara et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.

Orozco et al., *Urology*, 51:186-195, 1998.

20

Paglia et al., *J. Exp. Med.*, 183:317–322, 1996.

Parker et al., *CA Cancer J. Clin.*, 65:5-27, 1996.

Partin and Oesterling, *Urology*, 48 (6A):1-3, 1996.

Partin and Oesterling, *J. Urol.*, 152:1358-1368, 1994.

Partin and Oesterling (Eds.), *Urology*, 48(6A) Supplement:1-87, 1996.

30

Paskind et al., *Virology*, 67:242-248, 1975.

PCT Application No. PCT/US87/00880

Pettersson et al., *Clin. Chem.*, 41(10):1480-1488, 1995.

Piironen et al., *Clin. Chem.* 42:1034-1041, 1996.

Potter et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

Racher et al., *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.

40

Ragot et al., *Nature*, 361:647-650, 1993.

Ralph and Veltri, *Advanced Laboratory*, 6:51-56, 1997.

Ralph et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(22):10710-10714, 1993.

Reinhold-Hurek and Shub, *Nature*, 357:173-176, 1992.

Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.

Ribas de Pouplana and Fothergill-Gilmore, *Biochemistry*, 33:7047-7055, 1994.

Rich et al., *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.

Ridgeway, In: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez R L, Denhardt D T (Eds.), Butterworth, Stoneham, pp 467-492, 1988.

10

Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

Rosenfeld et al., *Science*, 252:431-434, 1991.

Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155, 1992.

Roux et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.

Sager et al., *FASEB J.*, 7:964-970, 1993.

Sambrook et al., (ed.), In: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

20

Santerre et al., *Gene*, 30: 147-156, 1984.

Sarver, et al., *Science*, 247:1222-1225, 1990.

Scanlon et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:10591-10595, 1991.

Schuler et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 15:138–147, 2003.

Siders et al., *Mol. Ther.*, 7:498–505, 2003.

30

Sidransky et al., *Science*, 252:706-709, 1991.

Sidransky et al., *Cancer Res.*, 52:2984-2986, 1992.

Silver et al., *Clin. Cancer Res.*, 3:81-85, 1997.

Slamon et al., *Science*, 224:256-262, 1984.

Slamon et al., *Science*, 235:177-182, 1987.

Slamon et al., *Science*, 244:707-712, 1989.

40

Smith, U.S. Pat. No. 4,215,051.

Soh et al., *J. Urol.*, 157:2212-2218, 1997.

Stenman et al., *Cancer Res.*, 51:222-226, 1991.

Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39, 1979.

Stratford-Perricaudet and Perricaudet, In: *Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenauer et al., (Eds.), John Libbey Eurotext, France, pp 51-61, 1991.

Stratford-Perricaudet et al., *Hum. Gene Ther.*, 1:241-256, 1990.

Sun and Cohen, *Gene*, 137:127-132, 1993.

10

Szoka and Papahadjopoulos, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 75: 4194-4198, 1978.

Szybalska et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 48:2026, 1962.

Takahashi et al., *Cancer Res.*, 54:3574-3579, 1994.

Taparowsky et al., *Nature*, 300:762-764, 1982.

Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R. (Ed.), Plenum Press, New York, pp 149-188;, 1986.

Tooze, In: *Molecular Biology of DNA Tumor Viruses*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1991.

20

Top et al., *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.

Tschemper et al., *Gene*, 10:1 57, 1980.

Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

U.S. patent application Ser. No. 08/692,787

U.S. Pat. No. 4,196,265

30

U.S. Pat. No. 4,215,051

U.S. Pat. No. 4,683,195

U.S. Pat. No. 4,683,202

U.S. Pat. No. 4,800,159

U.S. Pat. No. 4,883,750

U.S. Pat. No. 5,354,855

40

U.S. Pat. No. 5,359,046

Varmus et al., *Cell*, 25:23-36, 1981.

Veltri et al., J. Cell Biochem., 19(suppl):249-258, 1994.

Veltri et al., Urology, 48: 685-691, 1996.

Veltri et al., Sem. Urol. Oncol., 16:106-117, 1998.

Veltri et al., Urology, 53:139-147, 1999.

Visakorpi et al., Am. J. Pathol., 145:1-7, 1994.

Wagner et al., Science, 260:1510-1513, 1993.

10

Walker et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:392-396, 1992.

Wan et al., Hum. Gene Ther., 8:1355-1363, 1997.

Watson et al., Cancer Res., 54:4598-4602, 1994.

Welsh et al., Nucl. Acids Res., 20:4965-4970, 1992.

Wigler et at, Cell, 11:223, 1977.

20

Wigler et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 77:3567, 1980.

Wingo et al., CA Cancer J. Clin., 47: 239-242, 1997.

WO 90/07641, filed Dec. 21, 1990.

Wong et al., Int. J. Oncol., 3:13-17, 1993.

Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987.

30

Wu and Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988.

Wu and Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12: 159-167, 1993.

Wu el al., Genomics, 4:560, 1989.

Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568-9572, 1990.

Yokoda et al., Cancer Res. 52, 3402-3408, 1992.

Zitvogel et al., J. Exp. Med., 183:87-97, 1996.

Zlotta et al., J. Urol., 157:1315-1321, 1997.

40

## 【配列表】

2009540852000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2007/056584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/113571 A (EXONHIT THERAPEUTICS SA [FR]; EINSTEIN RICHARD [US]; MCGOWAN KEVIN M () 29 December 2004 (2004-12-29) claims 1-34; example 1	1,2, 4-16, 18-38
X	WO 03/076610 A (EXONHIT THERAPEUTICS SA [FR]; BRACCO LAURENT [FR]; BRINKMAN BRIGITTA () 18 September 2003 (2003-09-18) claims 1-24	1,2, 4-16, 18-38
Y	WO 99/43710 A (BECKMAN COULTER INC [US]) 2 September 1999 (1999-09-02)  page 1, line 9 - line 13 page 2, line 24 - page 8, line 11	1,2, 4-16, 18-38  -/-

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

17 January 2008

01/02/2008

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Offermann, Stefanie

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/056584

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/46403 A (EXONHIT THERAPEUTICS S A [FR]; SCHWEIGHOFFER FABIEN [FR]; BRACCO LAURE) 16 September 1999 (1999-09-16) the whole document -----	1,2, 4-16, 18-38
X	DATABASE EMBL [Online] 8 June 2000 (2000-06-08), "EST389181 MAGE resequences, MAGO Homo sapiens cDNA, mRNA sequence." XP002455626 retrieved from EBI accession no. EMBL:AW977072 Database accession no. AW977072 the whole document	1,2,10, 11,16,36
Y	-----	4-9, 12-15, 18-35, 37,38
X	DATABASE EMBL [Online] 1 April 2002 (2002-04-01), "AGENCOURT_6825715 NIH_MGC_99 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5807076 5', mRNA sequence." XP002455627 retrieved from EBI accession no. EMBL:BQ054986 Database accession no. BQ054986 the whole document	1,2,10, 11,16,36
Y	-----	4-9, 12-15, 18-35, 37,38
X	DATABASE EMBL [Online] 3 July 2000 (2000-07-03), "Homo sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1743294." XP002464863 retrieved from EBI accession no. EMBL:AL360266 Database accession no. AL360266 the whole document	1,2,10, 11,16,36
Y	-----	4-9, 12-15, 18-35, 37,38
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2007/056584
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 3 June 2004 (2004-06-03), "Homo sapiens full open reading frame cDNA clone RZPD0834E0810D for gene MUM1, melanoma associated antigen (mutated) 1; complete cds, incl. stopcodon." XP002464864 retrieved from EBI accession no. EMBL:CR457395 Database accession no. CR457395 the whole document	1,2,10, 11,16,36
Y	-----	4-9, 12-15, 18-35, 37,38
X	DATABASE EMBL [Online] 30 November 1995 (1995-11-30), "yu98h01.r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS Homo sapiens cDNA clone IMAGE:241297 5', mRNA sequence." XP002464865 retrieved from EBI accession no. EMBL:H91235 Database accession no. H91235 the whole document	1,2,10, 11,16,36
Y	-----	4-9, 12-15, 18-35, 37,38
X	US 2003/099974 A1 (LILLIE JAMES [US] ET AL) 29 May 2003 (2003-05-29)  paragraphs [0046], [0047], [0107], [0130], [0148], [0150], [0189], [0315]	1,2, 10-13, 15,16, 18,36,38
Y	-----	4-9,14, 19-35,37
A	WO 2004/058146 A (SAGRES DISCOVERY INC [US]; MORRIS DAVID W [US]; MALANDRO MARC S [US]) 15 July 2004 (2004-07-15) sequence 258	
A	PORKKA K P ET AL: "DETECTION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN PROSTATE CANCER BY COMBINING SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION AND cDNA LIBRARY ARRAY" JOURNAL OF PATHOLOGY, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 193, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 73-79, XP008010824 ISSN: 0022-3417 the whole document	
	-----	-/-

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No  
PCT/EP2007/056584

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVID A ET AL: "Unusual alternative splicing within the human kallikrein genes KLK2 and KLK3 gives rise to novel prostate-specific proteins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 277, no. 20, 17 May 2002 (2002-05-17), pages 18084-18090, XP002241550 ISSN: 0021-9258 the whole document	

International Application No. PCT/EP2007/056584

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 19-35 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 3, 17

Claim 3 only relates to primers defined by their capability of specifically amplifying one of the sequences disclosed in claim 1. However, this sole feature does not allow the definition of the structural features of the claimed primers since in the absence of any definition of the sequence from which the primers have to be derived, the primer could be located anywhere, provided they bracket the sequence to be amplified. Claim 3, thus, lacks clarity (Article 6 PCT) to such an extent that a meaningful search over its whole scope is impossible. Moreover, in view of the absence of any indication in the description which could help define the sequence of the claimed primers, no search at all is possible with respect to the subject-matter of claim 3. The same applies for claim 17 dependent thereon.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/EP2007/056584

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Although claims 19–35 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.**
2.  Claims Nos.: 3, 17 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210**
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see additional sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
**1–2, 4–16, 18–38 (all partially with regard to SEQ ID NOS:1, 2)**
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2007/056584

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: 1-2, 4-16, 18-28 (all partially)

a nucleic acid having SEQ ID NO:1. Provided is related subject-matter, such as homologous sequences and fragments thereof, primer mixtures for amplifying said sequence, methods using said sequence, and antibodies.

-----  
Invention 2-23: 1-2, 4-16, 18-28 (all partially)

as for invention I wherein the nucleic acid is defined by any one of SEQ ID NOs:2-23. For related subject-matter, see Invention 1.

-----

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No PCT/EP2007/056584
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 2004113571	A 29-12-2004	EP JP	1636379 A2 2007527699 T		22-03-2006 04-10-2007
WO 03076610	A 18-09-2003	AU CA EP JP US	2003242820 A1 2478572 A1 1483381 A2 2005519606 T 2005112705 A1		22-09-2003 18-09-2003 08-12-2004 07-07-2005 26-05-2005
WO 9943710	A 02-09-1999	AU	3305699 A		15-09-1999
WO 9946403	A 16-09-1999	CA US	2323231 A1 6881571 B1		16-09-1999 19-04-2005
US 2003099974	A1 29-05-2003	NONE			
WO 2004058146	A 15-07-2004	AU CA EP US	2003299645 A1 2508944 A1 1581542 A2 2004126762 A1		22-07-2004 15-07-2004 05-10-2005 01-07-2004

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 7
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/574	A

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 アインシュタイン, リチャード

アメリカ合衆国、メリーランド 20878、ゲイザーズバーグ、ゲールズビル・ドライブ  
421

(72) 発明者 ケイン, ケビン・ポール

カナダ国、アルバータ ティー6アール 2アール8、エドモントン、ヘンダーソン・ストリート  
668エー

(72) 発明者 パンド, マシュー・ポール

アメリカ合衆国、バージニア 22201、アーリントン、エヌ・クリーブランド・ストリート  
2004

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA20 CA25 DA13 DA14 DA36 DA78 FB02 FB03 FB07  
FB08  
4B024 AA01 AA12 BA36 CA06 CA11 DA06 EA04 GA11 HA14 HA17  
4B063 QA19 QQ08 QQ43 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR55 QR66  
QR77 QS03 QS33 QS34 QX01  
4C076 AA95 CC17 CC27 EE41N EE59N FF34 GG44  
4C084 AA02 AA13 NA14 ZA811 ZB261  
4C085 AA03 AA13 AA14 AA21 BB01 BB11 CC02 DD62 DD63 EE01  
4C086 AA01 AA02 EA16 HA05 MA01 MA02 MA04 MA05 NA13 NA14  
ZA81 ZB26  
4C087 AA01 AA02 BB64 CA04 NA14 ZA81 ZB02 ZB26  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 CA42 DA76 DA86 EA26 EA31  
EA51 FA71