(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
G01N 33/574

(11) 공개번호 10-2004-0062534
(43) 공개일자 2004년07월07일

(21) 출원번호 10-2004-7003017
(22) 출원일자 2004년02월27일
번역문 제출일자 2004년02월27일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2002/009653
(87) 국제공개번호 WO 2003/021273
(86) 국제출원출원일자 2002년08월29일
(87) 국제공개일자 2003년03월13일

(30) 우선권주장 60/316,537 2001년08월29일 미국(US)

(71) 출원인 퍼시픽 노쓰웨스트 리서치 인스티튜트
미국 워싱턴주 98122 시애틀 브로드웨이 720

(72) 발명자 슈머미첼
미국워싱턴주98122시애틀이제퍼슨스트리트#비1920

헬스트롬잉게드
미국워싱턴주98105시애틀노쓰이스트수버드라이브3925

헬스트롬칼에릭
미국워싱턴주98105시애틀노쓰이스트수버드라이브3925

레드베터제프리에이
미국워싱턴주98177쇼어라인릿지필드로드엔더블유18798

하이덴-레드베터마르타
미국워싱턴주98177쇼어라인릿지필드로드엔더블유18798

(74) 대리인 이병호

심사청구 : 없음

(54) 암 진단

요약

본 발명은 악성종양 증상의 검출용 조성물 및 방법에 관한 것이고 난소암에서 과발현되는 HE4a를 포함하는, 가용성 형태 및 세포 표면 형태의 HE4a 폴리펩타이드의 전달에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 HE4a를 암호화하는 핵산 서열을 제공하고 또한 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 항체와, 당해 대상체 기원의 샘플내에 가용성 및/또는 세포 표면 형태로 천연적으로 존재하는 분자의 반응성을 검출하고 HE4a 뉴클레오타이드 서열을 사용하는 하이브리드화 스크리닝에 의해 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법 및 이와 관련된 잇점을 제공한다.

대표도

도 1A

색인어

HE4a 폴리펩타이드, 메소텔린, 암 진단, 악성종양 증상

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 암과 같은 악성종양 증상에 관한 것이고 특히, 난소암과 같은 특정 암종을 진단하는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

암은 전세계적으로 대략 4명당 1명에게 영향을 주는 광범위한 질환이다. 암의 역효과의 심각성이 일반적으로 상당하여 의료 정책 및 과정 뿐만 아니라 사회에 영향을 미치고 있다. 특정한 많은 유형의 암은 악성 세포가 신속하고 비조절 방식으로 증식하는 것이기 때문에 암에 대한 방법을 개선시키는데 있어서 당면 과제는 조기 검출하고 진단하는 것이다. 악성종양 증상의 존재를 진단하기 위해 정확하고 신뢰 가능한 기준을 개발하기 위한 수많은 시도가 있어왔다. 특히, 암 세포에 의해 유일하게 발현되거나 악성종양 증상을 갖는 환자에서 현저하게 고농도로 존재하는 종양 관련 항원으로서 공지된 혈청학적으로 정의된 항원성 마커를 사용하기 위한 노력에 편중되어 왔다.

그러나, 종양 관련 항원 발현의 높은 이종성 때문에, 예를 들어, 암 항원이 상당히 다양하여, 암 진단에 유용한 추가의 종양 마커가 필요하다. 암 관련 항원 과 반응성인 많은 모노클로날 항체가 공지되어 있다[문헌참조: Papsidero, 1985 Semin. Surg. Oncol. 1:171, Allum et al., 1986 Surg. Ann. 18:41]. 이들 및 기타 기재된 모노클로날 항체는 당단백질, 당지질 및 뮤신을 포함하는 다양하게 상이한 암 연관된 항원에 결합한다[문헌참조: e.g., Fink et al., 1984 Prog. Clin. Pathol. 9: 121; 미국 특허 제4,737, 579호; 미국 특허 제4,753, 894호; 미국 특허 제4,579, 827호; 미국 특허 제4,713, 352호]. 많은 당해 모노클로날 항체는 특정 세포 계열 또는 조직 유형에서 기원하는 기타 종양에서만 발현이 제한되어 있는 종양 연관 항원을 인지한다.

특정 유형의 악성종양을 동정하는데 유용한 것으로 밝혀진 종양 관련 항원에 대한 예가 거의 없다. 예를 들어, 모노클로날 항체 B72.3은, 거의 대부분 난소암 및 압도적으로 대다수의 비소형 세포 폐 암, 결장 암 및 유방암을 포함하는, 많은 상이한 암에서 선택적으로 발현되는 고분자량(>10 ^{6} Da)의 종양 관련 뮤신 항원에 특이적으로 결합한다[문헌참조: Johnston, 1987 Acta Cytol. 1:537; 미국 특허 제4,612,282호]. 그럼에도 불구하고, 종양의 수술 절개 후 B72.3에 의해 인지되는 뮤신 항원과 같은 세포 관련 종양 마커의 검출은 실질적인 종양 매쓰가 축적되기 전에 악성종양 증상의 조기 검출이 바람직한 진단 스크리닝에 있어서 이의 유용성이 제한될 수 있다 .

축적된 종양 매쓰를 검출한 후에만이 침해성 수술이 통상적으로 요구되는 종양 관련 항원에 대한 수술적으로 절개된 표본을 스크리닝함에 의해 특정 유형의 암 을 진단하는 대체법은 비-침해성 또는 최소 침해성 과정에 의해 환자로부터 수득한 샘플중의 당해 항원을 검출하기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것이다. 예를 들어, 난소 및 기타 암종에서, 현재 혈청 또는 점막 분비물과 같은 용이하게 수득된 생물학적 유체의 샘플중에서 검출가능한 많은 가용성 종양 연관 항원이 있다. 하나의 당해 마커는 혈류로 침투되어 혈청에서 검출가능한 암 관련 항원인 CA125이다[문헌참조: Bast et al., 1983 N. Eng. J. Eng. J. Med. 309:883; Lloyd et al., 1997 Int. J. Canc. 71:842]. 혈청 및 기타 생물학적 유체중의 CA125 농도는 난소 및 긴타 암의 진단 및/또는 예후 프로필을 제공하고자하는 노력의 일환으로 기타 마커, 예를 들어, 태아성암 항원(CEA), 편평세포암종 항원(SCC), 조직 폴리펩타이드 특이적 항원(TPS), 시알릴 TN 뮤신(STN) 및 태반 알칼린 포스파타제(PLAP)의 농도와 함께 측정되어 왔다[문헌참조: Sarandakou et al., 1997 Acta Oncol. 36:755; Sarandakou et al., 1998 Eur. J. Gynaecol. Oncol. 19:73; Meier et al., 1997 Anticanc. Res. 17(4B): 2945; Kudoh et al., 1999 Gynecol. Obstet. Invest. 47:52; Ind et al., 1997 Br. J. Obstet. Gynaecol. 104:1024; Bell et al. 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136; Cioffi et al., 1997 Tumori 83:594; Meier et al. 1997 Anticanc. Res. 17(4B); 2949; Meier et al., 1997 Anticanc. Res. 17(4B): 3019].

그러나, 단독의 또는 공지된 지시제와 배합된 상승된 수준의 혈청 CA125는 악성종양, 특히 난소암과 같은 특정 난소암의 명확한 진단을 제공하지 못한다. 예를 들어, 질 유체 및 혈청중의 상승된 CA125, CEA 및 SCC는 경부암 및 생식기관 암보다는 양성 부인과 질환내 염증과 가장 강한 연관성이 있다[문헌참조: Moore et al., 1998 Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 6: 182; Sarandakou et al., 1997 Acta Oncol. 36: 755]. 또 다른 예로서, 상승된 혈청 CA125는 또한 신경모세포종[문헌참조: Hirokawa et al., 1998 Surg. Today 28: 349]를 수반할 수 있고 무엇보다 상승된 CEA 및 SCC는 결장 직장암[문헌참조: Gebauer et al. , 1997 Anticanc. Res. 17 (4B): 2939]을 수반할 수 있다. 또 다른 마커인 분화 항원 메소텔린은 정상적인 중피 세포의 표면 및 또한 상피 난소 종양 및 중피암을 포함하는 특정 암 세포상에서 발현된다. 메소텔린에 속하는 조성물 및 방법[문헌참조: Chang et al., 1992 Canc. Res. 52: 181; Chang et al.,

1992 Int J Canc. 50: 373; Chang et al., 1992 Int. J. Canc. 51: 548; Chang et al. , 1996 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 136; Chowdhury et al. , 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 669; Yamaguchi et al. , 1994 J. Biol. Chem. 269: 805; Kojima et al., 1995 J. Biol. Chem. 270: 21984] 및 구조적으로 연관된 메소텔린 관련 항원[문헌참조: MRA; Scholler et al., 1999 Proc. Nat. Acad. Sci USA 96: 11531]이 WO 00/50900 및 미국 특허원 제09/513,597호에 기재된 바와 같은 암 검출 및 치료에서의 용도를 포함하여 기술 분야에 공지되어 있다. 따라서, 다중 인자 진단 스크리닝에서 유용한 마커를 포함하는 추가의 마커가 사용되어야만 한다는 필요성은 명백하다[문헌참조: Sarandakou et al., 1998; Kudoh et al., 1999; Ind et al., 1997].

하기에 상세하게 기재된 바와 같이, 당해 추가의 마커는 다양한 기능을 갖는 이종성 그룹의 소형 산 및 열 안정한 분자를 포함하고 사람 부고환 4개의 디설파이 드 코어 단백질 또는 'HE4'를 포함하는 '4개의 디설파이드 코어 계열의 단백질내에서 유용하게 제공될 수 있다[문헌참조: Kirchhoff et al., 1991 Biol. Reprod. 45:350-357; Wang et al., 1999 Gene 229: 101; Schummer et al., 1999 Gene 238: 375]. 4개의 디설파이드 코어 계열 구성원의 폴리펩타이드의 아미노산 서열내 8개의 코어 시스테인 잔기의 보존된 공간이 이들 분자가 보다 촘촘하고 안정한 구조로 폴딩되도록 하는 것으로 사료된다. 많은 4개의 디설파이드 코어 계열의 구성원은 프로테아제 억제제이지만 HE4를 포함하는 몇몇 계열의 구성원에 대해서는 어떠한 기능도 아직 구체적으로 동정되지 않았다. 4개의 디설파이드 코어 계열의 단백질의 기타 구성원은 Wp 단백질, SLP-1 및 ps20을 포함하고 4개의 설파이드 코어 계열의 단백질의 추가의 구성원은 여러 종으로부터 분리되었다. 이들 단백질은 분비 세포에 의해 생성되고 정장, 우유, 귀밑 및 경부 분비물과 같은 점막 분비물에서 발견된다.

4개의 디설파이드 코어 계열의 원형 분자인 Wp-단백질은 또한 유장 인단백질로서 공지되어 있고 클로닝되었다[문헌참조: Dandekar et al., 1982 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3987-3991]. 유장 인단백질은 대략 1 내지 2mg/ml로 우유에서 발현되지만 유전자가 과메틸화되어 있는 유방암에 의해서는 발현되지 않는다. 프로테아제에 대한 어떠한 억제 활성도 유장 인단백질에서는 발견되지 않았다. 그러나, 형질전환된 동물에서 유전자의 과발현은 포유동물의 포유동물의 폐포성 세포의 발육을 손상시키고[문헌참조: Burdon et al, 1991 Mechanisms Dev. 36: 67-74] 이것은 당해 단백질이 수유기동안에 중요한 역할을 하는 것임을 시사한다. 분비성 백혈구 프로테아제 억제제(SLP-1)인 또 다른 4개의 디설파이드 코어 계열의 단백질은 사람 자궁경으로부터 클로닝되었지만 정장 및 귀밑 분비물을 포함하는 기타 점막 분비물에도 존재한다[문헌참조: Heinzel et al, 1986 Eur. J. Biochem. 160:61-67]. SLP-1은 트립신, 키모트립신, 엘라스타제 및 카뎁신 G의 강력한 억제제인 12kDa의 2개의 도메인 단백질이다. 키모트립신과 복합체화된 SLP-1의 결정 구조가 공개되었다[문헌참조: Grutter et al., 1988 EMBO J. 7:345-351]. 이들 데이타는 SLP-1 도메인이 동시에 독립적으로 작용하여 상이한 프로테아제를 억제할 수 있음을 보여주고 키모트립신과 결합하는 2개의 도메인중의 소형(8개의 아미노산) 활성 부위를 동정하였다.

엘라핀은 당해 폴리펩타이드의 아미노산 분석을 결정하기 위해 사람 건선성 피부로부터 분리된 4개의 디설파이드 코어 계열의 단일 도메인 단백질 구성원이다[문헌참조: Wiedow et al., 1990 J. Biol. Chem. 265: 14791-14795]. 엘라핀은 엘라스타제의 강력한 억제제이지만 트립신, 키모트립신, 카뎁신 G 또는 플라스민과 같은 기타 프로테아제에 대한 명백한 억제 활성을 나타내지 않는다. 엘파핀의 아미노산 서열은 SLP-1의 C-말단 영역(도메인 1)과 38%의 상동성을 나타낸다. ps20 단백질을 암호화하는 유전자는 최근에 평활근으로부터 분리되었고 ps20 단백질은 당해 유전자를 포유동물 세포에 형질감염시켜 발현된다[문헌참조: Larsen et al., 1998 J. Biol. Chem. 273: 4574-4584]. ps20은 암 세포의 성장을 억제하는 것으로 밝혀졌고 ps20은 성장 억제제로서 언급되지만 프로테아제의 억제와 같은 어떠한 직접적인 기능 활성이 당해 단백질에 대해 기재되어 있지 않다.

상기 주지된 바와 같이, 처음에 부고환 상피 세포에서 동정된 HE4의 어떠한 프로테아제 억제 활성이 동정되지 않았지만 기타 소형 산 및 열 안정성 프로테이나제 억제제가 정장으로부터 특성화되었고 정자와 결합하여 난의 세포외 매트릭스와정자의 상호작용을 조절하여 수정능력에 역할을 수행하는 것으로 사료된다[문헌참조: Fitz et al., in Proteases and Biological Controls, Reich, E., Rifkin, D., Shaw, E. (eds), 1975 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 737-766; Saling, 1989 Oxf. Rev. Reprod. Biol. 11: 339-388]. HE4 cDNA는 이후에 난소암으로부터 작제된 cDNA 라이브러리내에서 높은 빈도수로 검출되었다[문헌참조: Wang et al., 1999 Gene 229:101; Schummer et al., 1999 Gene 238:375].

상기 해당 이유 때문에, 암종과 같은 악성종양 증상의 검출 및 치료를 위한 개선된 진단 마커 및 치료학적 표적물이 명백하게 필요하다. 본 발명의 조성물 및 방법은 HE4 및/또는 HE4 관련 항원에 대해 특이적인 항체를 사용하여 가용성 형태로 천연적으로 존재하고/하거나 세포 표면상의 폴리펩타이드를 검출함으로써 악성종양 증상의 존재에 대한 스크리닝 방법을 제공하여 선행 기술 분야의 이들 한계를 극복하고 또 다른 관련 잇점을 제공한다.

발명의 요약

본 발명은 대상체에서 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는데 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 본원에서 HE4a로서 언급되는 HE4 폴리펩타이드의 의 가용성 및 세포 표면 형태 또는 가용성 형태로 존재하고 HE4 폴리 펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체에 반응성인 항원 결정 인자를 갖는 HE4a 분자가 대상체의 생물학적

샘플에서 검출될 수 있다는 예상치 않은 발견에 관한 것이다.

본 발명의 한 측면은, 항체와 항원성 결정 인자의 결합을 검출하는 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안, 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 하나 이상의 세포를 포함한다)중에, 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하거나 특정 양태에서 세포 표면 분자로서 존재하는, 하나 이상의 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 분자의 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체와 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다. 몇몇 양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 장막 유체, 혈장, 림프, 뇨, 뇌척수 유체, 침액, 점막 분비물, 질 분비물, 복수 유체, 흉막 유체, 심막 유체, 복막 유체, 복부 유체, 배양 배지, 조건화된 배양 배지 또는 세척 유체이다.

특정 기타 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드는 서열 5, 7, 9 또는 11중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함한다. 또 다른 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드 변이체는 스플라이싱 변이체이다. 본 발명의 특정 양태에서, 항체는 폴리클로날 항체를 포함하고 또 다른 양태에서, 항체는 친화성 정제된 항체를 포함한다. 특히, 바람직한 양태에서, 항체는 모노클로날 항체를 포함한다. 또 다른 양태에서, 항체는 재조합 항체를 포함 하고 또 다른 양태에서, 항체는 키메릭 항체를 포함한다. 또 다른 양태에서, 항체는 사람화된 항체를 포함한다. 또 다른 양태에서, 항체는 단일쇄 항체를 포함한다.

본 발명의 특정 양태에서, 항원 결정 인자에 대한 항체의 결합 검출은 방사선핵종의 검출을 포함한다. 또 다른 양태에서, 항원 결정인자에 대한 항체의 결합 검출은 형광단의 검출을 포함한다. 또 다른 양태에서, 항원 결정인자에 대한 항체의 결합 검출은 아비딘 분자와 비오틴 분자사이의 결합 반응의 검출을 포함하고 또 다른 양태에서, 항원 결정인자에 대한 항체 결합 검출은 스트렙트아비딘 분자와 비오틴 분자사이의 결합 반응의 검출을 포함한다. 특정 양태에서, 항원 결정인자에 대한 항체의 결합 검출은 효소 반응의 생성물에 대한 분광학적 검출을 포함한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 최소한 하나의 항체는 검출가능하게 표지되고 특정 또 다른 양태에서, 최소한의 하나의 항체는 검출가능하게 표지되지 않고 항원 결정인자에 대한 항체의 결합 검출은 간접적이다.

본 발명의 특정 양태에 따라, 악성종양 증상은 선암종, 중피암, 난소암, 췌장암 또는 비소형 세포 폐암일 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 항원성 결정인자에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 2H5, 3D8 또는 4H4인 모노클로날 항체의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하는 항원 결합 부위이고 하나 이상의 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 세포를 포함한다)내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플과 하나 이상의 항체를 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 측면은, 항원성 결정인자에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 모노클로날 항체 3D8의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하는 항원 결합 부위이고 당해 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 세포를 포함한다)내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플과 하나 이상의 항체를 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 측면은, 항원성 결정인자에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 세포를 포함한다)내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플과 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체를 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악 성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다. 특정 양태에서, HE4a 항원은 또한 모노클로날 항체 3D8, 2H5 또는 4H4에 면역특이적으로 반응한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 항원성 결정인자에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 2H5 또는 4H4의 모노클로날 항체의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하는 항원 결합부위이고 하나 이상의 항체(여기서, 하나 이상의 항체는 면역특이적으로 HE4a 항원에 결합한다)와 반응하는 항원성 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 세포를 포함한다)내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플과 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체를 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다. 특정

양태에서, 메소텔린 관련 항원은 또한 모노클로날 항체 3D8에 면역특이적으로 반응한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은, 하나 이상의 고정화된 제1 항체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합시켜 면역 복합체를 형성하기 위한 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안 샘플내에 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자의 생물학적 샘플내 존재 유무를 결정하기 위해 대상체 기원의 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 고정화된 제1 항체와 접촉시키는 단계, 하나 이상의 고정화된 제1 항체에 특이적으로 결합하지 않는 샘플의 성분을 제거하는 단 계 및 하나 이상의 제2 항체의 HE4a 항원 폴리펩타이드로의 특이적 결합을 검출하는 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 면역 복합체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 제2 항체(여기서, 하나 이상의 제2 항체의 항원 결합 부위는 하나 이상의 고정화된 제1 항체의 항원 결합 부위를 경쟁적으로 억제하지 않는다)와 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

여전히, 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하나 이상의 고정화된 제1 항체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합시켜 면역 복합체를 형성하기 위한 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안 샘플내에 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자의 생물학적 샘플내 존재 유무를 결정하기 위해 대상체 기원의 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 고정화된 제1 항체(여기서, 하나 이상의 제1 항체의 항원 결합 부위는 모노클로날 항체 3D8의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제한다)와 접촉시키는 단계, 하나 이상의 고정화된 제1 항체에 특이적으로 결합하지 않는 샘플의 성분을 제거하는 단계 및 하나 이상의 제2 항체의 HE4a 항원 폴리펩타이드로의 특이적 결합을 검출하는 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 면역 복합체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 제2 항체(여기서, 하나 이상의 제2 항체의 항원 결합 부위는 모노클로날 항체 2H5의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는다)와 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은, 하나 이상의 고정화된 제1 항체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합시켜 면역 복합체를 형성하기 위한 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안 샘플내에 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자의 생물학적 샘플내 존재 유무를 결정하기 위해 대상체 기원의 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 고정화된 제1 항체(여기서, 하나 이상의 제1 항체의 항원 결합 부위는 모노클로날 항체 3D8의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제한다)와 접촉시키는 단계, 하나 이상의 고정화된 제1 항체에 특이적으로 결합하지 않는 샘플의 성분을 제거하는 단계 및 하나 이상의 제2 항체의 메소텔린 관련 항원 폴리펩타이드로의 특이적 결합을 검출하는 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 면역 복합체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 제2 항체(여기서, 하나 이상의 제2 항체의 항원 결합 부위는 모노클로날 항체 4H4의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는다)와 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

특정 양태에서, 본 발명의 방법은 악성종양 증상의 하나 이상의 가용성 마커(여기서, 마커는 메소텔린 관련 항원, 태아성암 항원, CA125, 시알릴 TN, 편평 세포 암 항원, 조직 폴리펩타이드 항원 또는 태반 알칼린 포스파타제이다)의 샘플내 존재 유무를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 항체의 항원 결정인자로의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 하나 이상의 항체와 반응하는 항원 결정인자 를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 제1 및 제2 생물학적 샘플(여기서, 제1 및 제2 생물학적 샘플은 각각 제1 및 제2 대상체 기원의 세포를 포함한다) 각각에서의 존재 유무를 결정하기 위해, (i) 악성종양 증상을 갖는 것으로 의심되는 제1 대상체 기원의 제1 생물학적 샘플 및 (ii) 악성종양 증상이 없는 것으로 공지된 제2 대상체 기원의 제2 생물학적 샘플 각각을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체와 접촉시키는 단계, 제1 생물학적 샘플내 항체의 항원 결정인자로의 검출가능한 결합 수준과 제2 생물학적 샘플내 항체의 항원 결정인자로의 검출가능한 결합 수준과 비교하는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 생물학적 샘플내에서 HE4a 항원 폴리펩타이드에 면역특이적으로 결합하는 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 메소텔린 관련 항원 폴리펩타이드는 서열 5, 7, 11 또는 13중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 5, 7, 11 또는 13중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 면역글로불린 가변 영역을 포함하는, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 항체를 제공한다. 특정 양태에서, 항체는 융합 단백질이고 특정 또 다른 양태에서, 항체는 단일쇄 항체이다. 특정 또 다른 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드는 추가로 당화된 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 양태에서, 항체는 서열 11에 제시된 HE4a 항원 폴리펩타이드 서열에 특이적으로 결합하지만 서열 9에 제시된 폴리펩타이드 서열에 특이적으로 결합하지 않거나 당해 항체는 서열 11에 제시된 HE4a 항원 폴리펩타이드 서열 및 서열 9에 제시된 폴리펩

타이드 서열 둘다에 특이적으로 결합한다. 특정 양태에서, 항체는 모노클로날 항체 2H5, 3D8 또는 4H4이다.

여전히 또 다른 측면에서, 본 발명은 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 항체의 HE4a 폴리펩타이드로의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안 대상체 기원의 생물학적 샘플을 검출가능하게 표지된 HE4a 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계 및 이로부터 악성종양 증상의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 5, 7, 11 또는 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HE4a 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자이거나 HE4a 항원 폴리펩타이드 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자 또는 약간의 엄중 조건하에서, HE4a 항원을 암호화하는 당해 핵산 분자와 하이브리드화할 수 있는 분리된 핵산 분자(여기서, 분리된 핵산 분자는 서열 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산 분자가 아니다)를 제공한다. 특정 양태에서, 본 발명은 HE4a 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자에 상보적인 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 HE4a 항원 폴리펩타이드에 융합된 폴리펩타이 드 서열을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 특정 추가의 양태에서, 융합 도메인은 면역글로불린 또는 변이체 또는 이의 단편이다. 특정 추가의 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 융합된 폴리펩타이드 서열은 프로테아제로 절단될 수 있다. 또 다른 양태에서, 폴리펩타이드 서열은 리간드에 대해 친화성을 갖는 친화성 태그 폴리펩타이드이다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 상기된 바와 같은 HE4a 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자에 작동적으로 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함하는 재조합 발현 작제물을 제공한다. 특정 양태에서, 프로모터는 조절성 프로모터이고 특정 또 다른 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드는 제2 핵산 서열의 폴리펩타이드 생성물과 융합 단백질로서 발현된다. 추가의 양태에서, 제2 핵산 서열의 폴리펩타이드 작제물은 면역글로불린 불변 영역이다. 또 다른 양태에서, 발현 작제물은 재조합 바이러스 발현 작제물이다. 기타 양태에 따라, 본 발명은 본원에서 제공되는 바와 같은 재조합 발현 작제물을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 한 양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포이고 또 다른 양태에서 숙주 세포는 진핵 세포이다.

또 다른 측면에서, 본 발명은, 본원에서 제공되는 바와 같은 HE4a 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자에 작동적으로 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함하는 재조합 발현 작제물을 포함하는 숙주 세포를 배양함에 의해 재조합 HE4a 항원 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 당해 프로모터는 조절성 프로모터이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 제공되는 바와 같은 재조합 바이러스 발현 작제물로 감염된 숙주 세포를 배양하고 재조합 HE4a 항원 폴 리펩타이드를 발현함으로써 재조합 HE4a 항원 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 또 다른 양태에서, 서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 샘플과 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 접촉시키는 단계 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 HE4a 폴리펩타이드 암호화 핵산의 양을 샘를중에서 검출하는 단계 및 이로부터 샘플내 HE4a 발현을 검출하는 단계에 의해 샘플내 HE4a 발현을 검출하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 HE4a 폴리펩타이드 암호화 핵산의 양은 폴리머라제 연쇄 반응을 사용하여 결정된다. 또 다른 측면에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 HE4a 폴리펩타이드 암호화 핵산의 양은 하이브리드화 분석법을 사용하여 결정한다. 또 다른 측면에서, 샘플은 RNA 또는 cDNA 제제를 포함한다.

본 발명의 특정 또 다른 양태에 따라, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 항체(여기서, 서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 면역글로불린 가변 영역을 포함한다)를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하여 악성종양 증상을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하여 악성종양 증상을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 추 가의 양태에서, 당해 조성물은 서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 생산을 환자에게 유도하고 특정 또 다른 추가의 양태에서, 당해 조성물은 환자에게 서열 11에 제시된 아미노산 서열 갖는 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 특이적으로 인지할 수 있는 T 임파구를 유도한다. 특정 또 다른 양태에 따라, HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체를 투여하거나 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 조성물을 투여함을 포함하여, 임신, 피임 및/또는 수정능을 변화(예를 들어, 적절한 대조군과 상대적인 통계적으로 유의적인 방식으로 감소 또는 증가)시키는 조성물 및 방법이 제공된다.

본 발명의 이들 측면 및 또 다른 측면은 하기의 발명의 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조로 보다 명백해질 것이다. 추가로, 본 발명의 특정 측면을 보다 상세하게 기재하고 있는 다양한 참조문헌이 본원에 제시되어 있고 따라서 이의 전반적인 내용이 참조문헌으로서 인용된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 사람 샘플의 판넬에서 HE4a 암호화 cDNA의 실시간 PCR 검출을 보여준다.

도 2는 발현된 HE4a 융합 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다.

도 3은 ELISA에 의한, 2 마리의 면역 마우스(1605 및 1734) 기원의 혈청내 HE4a-mIg 융합 단백질에 반응성인 항체의 검출을 도시한다.

도 4는 ELISA를 사용하여 하이브리도마 상등액을 스크리닝하고 HE4a-특이적 하이브리도마 항체를 검출한 대표적인 결과를 도시한다.

도 5는, 포획 시약으로서 고정화된 HE4a 특이적 모노클로날 항체를 사용하고 검출 시약으로서 비오티닐화된 HE4a 특이적 모노클로날 항체 2H5를 사용하는 이중 결정 샌드위치 ELISA에 의한 HE4a-hIgG 융합 단백질의 검출을 보여준다. 또한, 난소 암 세포 주 4007(△) 기원의 상등액 유체내 가용성 HE4a의 검출을 보여준다.

도 6은 난소 암 환자 기원의 연속 희석된 복수액내의 HE4a 항원의 샌드위치 ELISA에 의한 검출을 보여준다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 부분적으로 본원에 기재된 바와 같이, HE4(문헌참조: Kirchhoff et al., 1991 Biol. Reproduct. 45:350-357)와 고도로 유사하지만 이로부터 확실히 구별되는 서열을 갖는, '4개의 디설파이드 코어' 계열의 단백질의 신규 구성원인 HE4a의 발견에 관한 것이다. 본원에 기재된 바와 같이, HE4a(HE4가 아님)는 예상치 않게, 사람 부고환 상피 세포에서 제한적으로 발현되는 HE4(Kirchhoff et al., 1991)와는 명백하게 반대되는 특정 악성종양, 예를 들어, 난소암 뿐만 아니라 또 다른 다수의 사람 조직에서 과발현되는 것으로 밝혀졌다. 본 발명은 또한 부분적으로, 특정 암(예를 들어, 난소암)을 갖는 환자내에서 상승된 농도의 HE4a 폴리펩타이드를 포함하는, 환자내에 천연적으로 존재하는 본원에서 HE4a 폴리펩타이드로 서 언급되는 특정 유전자 생성물의 세포 표면 및/또는 가용성 형태의 검출을 제공하는, 본원에 기재된 조성물 및 방법으로부터 유래하는 놀라운 잇점에 관한 것이다. 본 발명은 따라서 환자내에서, 당해 세포 표면 및/또는 가용성 HE4a 폴리펩타이드의 특이적 검출에 의해 악성종양 증상의 검출 및 진단에 유용한 조성물 및 방법을 제공한다.

하기에 상세하게 기재된 바와 같이, 본 발명의 특정 양태는 HE4 및 HE4a 폴리펩타이드 항원 및 융합 단백질을 포함하는, 가용성 형태 및 세포 표면 형태의 HE4a 및 HE4 폴리펩타이드를 포함하는 HE4a 폴리펩타이드에 관한 것이다. 특정 또 다른 양태에서, 본 발명은 HE4a 폴리펩타이드의 단편, 유도체 및/또는 유사체에 관한 것이다. 간략하게, 본 발명의 특정 양태에 따라, 사람 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 항체와 대상체 기원의 생물학적 샘플을 접촉시킴에 의해 환자내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법이 제공된다. HE4a 폴리펩타이드 및 HE4a-Ig 융합 단백질에 대한 완전한 아미노산 서열 및 핵산 암호화 서열이 본원에 기재되어 있고 놀랍게도 난소 암 cDNA로부터 유래하는 핵산 분자가 문헌[참조: kirchhoff et al.(1881)에 기재된 바와 같은 HE4와는 확실히 구분되는 서열을 갖는 발현 생성물을 암호화한다는 것이 관찰되었고 추가로 예상치 않게, 문헌[참조: Kirchhoff et al]에 기재된 바와 같이 HE4 발현이 부고환 상피 세포에 제한되어 있는 반면 본 발명에 따른 HE4a 발현이 난소암에서 용이하게 검출될 수 있는 것으로 관찰되었다.

본원에 기재된 바와 같이, HE4a 폴리펩타이드를 특이적으로 인지하는 모노클로날 항체가 제공됨으로써 당업자는 과도한 실험없이 통상적으로 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법과 함께 당해 기술을 사용하여 숙주를 면역화시키고 HE4a 폴리펩타이드 특이적 항체 생성물을 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, 재조합 HE4a 융합 단백질을 포함하는, 재조합 HE4a 발현 벡터 및 숙조 세포의 작제는 본원에 기재되어 있고 HE4a 특이적 항체를 제공한다.

본원에 기재된 HE4a 폴리펩타이드의 물리화학적 및 면역화학적 성질로부터 및 본원에 기재된 HE4a 암호화 핵산 서열을 사용하여, 당업자는 또한 재조합 HE4a 폴리펩타이드를 제조할 수 있고 이를 사용하여 널리 공지된 방법에 따라 특이적 항체를 생산하고 특징을 밝힐 수 있다. HE4a 폴리펩타이드는 적절한 프로모터의 통제하에 포유동물 세포, 효모, 세균 또는 기타 세포에서 발현될 수 있다. 무세포 해독 시스템이 본원에 기재된 HE4a 폴리펩타이드 DNA 암호화 영역으로부터 기원하는 RNA를 사용하여 당해 단백질을 제조하는데 사용될 수 있다. 원핵 및 진핵 숙주에 사용하는데 적합한 클로닝 및 발현 벡터는 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989)]에 기재되어 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, HE4a 폴리펩타이드는 포유동물에서 발현된다.

본 발명의 핵산 분자는 RNA 또는 DNA 형태일 수 있고 DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함한다. 당해 D

NA는 이본쇄 또는 일본쇄일 수 있고 일본쇄인 경우 암호화 쇄 또는 비암호화(안티센스) 쇄일 수 있다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 암호화 서열은 서열 3, 4, 6, 10 또는 12에 제공된 암호화 서열과 동일할 수 있거나 유전자 코드의 중복 또는 축퇴성의 결과로 서 동일한 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는, 예를 들어, 서열 10 및 12의 cDNA와 같은 상이한 암호화 서열일 수 있다. 따라서, 본 발명은 서열 5, 7, 11 또는 13의 아미노산 서열을 갖는 HE4a 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자 또는 당해 HE4a 폴리펩타이드 암호화 핵산과 하이브리드화할 수 있는 핵산 분자 또는 이와 상보적인 서열을 갖는 핵산 분자를 제공한다.

변이체는 바람직하게 고유 HE4a 항원 폴리펩타이드 또는 이의 일부를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 서열 10 및 12에 제시된 핵산 서열과 약 70% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 약 80% 내지 85% 이상 및 가장 바람직하게는 약 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 나타낸다. 상동성 %는 당업자에게 널리 공지된 컴퓨터 알고리듬, 예를 들어, NCBI 웹 사이트(http://www/ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)에서 제공되는 정렬 또는 블라스트 알고리듬(문헌참조: Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992)을 사용하여 서열을 비교분석함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 디폴트 계수가 사용될 수 있다.

특정 변이체는 실질적으로, 고유 유전자와 상동성이다. 당해 폴리뉴클레오타이드 변이체는 중간정도의 엄중 조건하에서 고유 HE4a 항원을 암호화하는 천연적으로 존재하는 DNA 또는 RNA 서열(또는 이의 상보적인 서열)과 하이브리드화할 수 있다. 적합한 중간정도의 엄중 조건은 예를 들어 하기의 단계 또는 이와 동등한 단계를 포함한다: 5X SSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA(pH 8.0)의 용액중에서 예비 세척; 50℃ 내지 65℃, 5 X SSC에서 밤새 하이브리드화; 이어서, 0.1% SDS를 함유하 는 2X, 0.5X 및 0.2X SSC 각각으로 20분동안 65℃에서 2회 세척. 추가로 엄중하게 하기 위해, 조건은 예를 들어, 15분동안 60℃에서 0.1X SSC 및 0.1% SDS에서 세척하거나 이와 동등한 단계를 포함할 수 있다. 당업자는, 몇몇 방식에서 목적하는 특정 핵산에 선택적인 적합한 엄중 하이브리드화 조건을 설정하기 위해 통상적으로 다양화 될 수 있는 계수를 용이하게 평가할 수 있고 당해 조건이 하이브리드화에 관여하는 특정 핵산 서열, 예를 들어, HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 서열 10 및 12에 기재된 바와 같은 서열의 함수일 수 있음을 추가로 평가할 수 있다. 핵산 하이브리드화 조건의 선택에 관하여 문헌[참조: Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1995]을 참조한다.

서열 11의 아미노산 서열을 갖는 사람 HE4a 폴리펩타이드 또는 본 발명에 따라 사용하기 위한 임의의 기타 HE4a 폴리펩타이드와 같은 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 단독의 HE4a 폴리펩타이드의 암호화 서열, HE4a 폴리펩타이드의 암호화 서열 및 추가의 암호화 서열, HE4a 폴리펩타이드의 암호화 서열(및 임의의 추가의 암호화 서열) 및 비암호화 서열(예를 들어, 인트론) 또는 HE4a 폴리펩타이드의 암호화 서열의 5' 및/또는 3'의 비암호화 서열(이것은 추가로 조절된 또는 조절가능한 프로모터, 인핸서, 기타 전사 조절 서열, 리프레서 결합 서열, 해독 조절 서열 또는 임의의 기타 조절 핵산 서열을 포함할 수 있지만 이에 제한될 필요는 없다)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 따라서, 용어 'HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산'은 폴리펩타이드의 암호화 서열만을 포함하는 핵산 뿐만 아니라 암호화 및/또는 비암호화 서열을 포함하는 핵산을 포함한다.

본 발명은 추가로, HE4a 폴리펩타이드, 예를 들어, 서열 11의 추정 아미노산 서열을 갖는 사람 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 본원에 기재디ㅗㄴ 핵산의 변이체에 관한 것이다. HE4a를 암호화하는 핵산의 변이체는 천연적으로 존재하는 핵산의 대립형질 변이체 또는 비천연적으로 존재하는 변이체일 수 있다. 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, 대립형질 변이체는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환, 결실 또는 부가(이것은 암호화된 HE4a 폴리펩타이드의 기능을 실질적으로 변화시키지 않는다)를 가질 수 있는 핵산 서열의 또 다른 형태이다. 따라서, 예를 들어, 본 발명은 서열 5, 7 또는 11에 나타낸 것과 동일한 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 뿐만 아니라 당해 핵산의 변이체(여기서, 변이체는 당해 폴리펩타이드의 단편, 유도체 또는 유사체를 암호화할 수 있다)를 포함한다.

HE4a의 변이체 및 유도체는 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 돌연변이시켜 수득될 수 있다. 고유 아미노산 서열의 변형은 다수의 통상적인 방법중 하나로 성취될 수 있다. 돌연변이는, 고유 서열의 단편으로의 연결을 가능하게 하는 제한 부위에 의해 플랭킹된, 돌연변이 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 합성함에 의해 특정 위치에 도입될 수 있다. 연결 후, 수득한 작제된 서열은 목적하는 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 갖는 유사체를 암호화한다.

또한, 올리고뉴클레오타이드 지시된 부위 특이적 돌연변이 유발 방법을 사용하여 미리 결정된 코돈이 치환, 결실 또는 삽입에 의해 변형될 수 있는 변화된 유전자를 제공할 수 있다. 당해 변형을 생성시키기 위한 방법의 예는 문헌[참조: Walder et al. (Gene 42 : 133,1986) ; Bauer et al. (Gene 37: 73,1985) ; Craik (BioTechniques, January 1985,12-19) ; Smith et al. (Genetic Engineering : Principles and Methods, Plenum Press, 1981) ; Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 488,1985); Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154 : 367,1987) ; 및 미국 특허 제4,518,584호 및 제4,737, 462호]에 기재되어 있다.

HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 변이체 도는 단편을 암호화하는 핵산 서열에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 당해 핵산 서열에 특이적인 리보자임을 포함하는 안티센스 제제로서 사용하기 위한 핵산 분자 및 유전자 치료를 위해

표적화 전달용 HE4a 유전자를 암호화하는 DNA 올리고뉴클레오타이드의 동정은 당해 분야에 널리 공지된 방법을 포함한다. 예를 들어, 당해 올리고뉴클레오타이드의 목적하는 성질, 길이 및 기타 특징이 널리 공지되어 있다. 특정 바람직한 양태에서, 당해 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 본원에 제공된 바와 같은 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자에 상보적인 15개 30개 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함하고 또 다른 특정 바람직한 양태에서, 당해 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 본원에 제공된 바와 같은 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자에 상보적인 31개 내지 50개, 51개 내지 75개, 76개 내지 125개 또는 그 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 설폰, 설페이트, 케틸, 포스포로디티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스페이트 에스테르 및 기타 연결체를 결합시켜 내인성 핵산 분해 효소의 분해 작용에 내성을 갖도록 고안된다[문헌참조: Agrwal et al., Tetrehedron Lett. 28 : 3539-3542 (1987); Miller et al., J Am. Chem. Soc. 93 : 6657-6665 (1971); Stec et al., Tetrehedron Lett. 26 : 2191-2194 (1985); Moody et al., Nucl. Acids Res. 12 : 4769-4782 (1989); Uznanski et al., Nucl. Acids Res. (1989); Letsinger et al., Tetrahedron 40 : 137-143 (1984); Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 54 : 367-402 (1985); Eckstein, Trends Biol. 14:97-100 (1989); Stein In: Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, pp. 97-117 (1989); Jager et al., Biochemistry 27: 7237-7246 (1988)].

안티센스 뉴클레오타이드는 서열 특이적 방식으로 mRNA 또는 DNA와 같은 핵산에 결합하는 올리고뉴클레오타이드이다. 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 결합하는 경우, 안티센스는 mRNA의 해독을 차단한다[문헌참조: 알트만(Altman et al)등에게 허여된 미국 특허 제5,168, 053호 ; 이노우에(Inouye)에게 허여된 미국 특허 제5,190, 931호, 버흐(Burch)에게 허여된 미국 특허 제5,135, 917호; 스미쓰 (Smith et al)등에게 허여된 미국 특허 제5,087, 617호 및 덤벨 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 기술하는 Clusel et al. (1993) Nucl. Acids Res. 21 : 3405-3411]. 삼중나선 분자는 이본쇄 DNA와 결합하여 공동 선형 삼중나선 분자를 형성하여 전사를 차단하는 일본쇄 DNA를 언급한다[문헌참조: 이본쇄 DNA상의 표적 부위에 결합하는 합성 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 방법을 기술하는 호건(Hogan et al)등에게 허여된 미국 특허 제5,176,996호].

본 발명의 양태에 따라, 특히 유용한 안티센스 뉴클레오타이드 및 삼중나선 분자는 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA의 센스 스트랜드 또는 mRNA와 상보적 이거나 이게 결합하여 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA의 해독을 억제하는 분자이다.

리보자임은 mRNA와 같은 RNA 기질을 특이적으로 절단하여 세포 유전자 발현을 특이적으로 억제하거나 방해하는 RNA 분자이다. 5개 이상의 공지된 부류의 리보자임이 RNA쇄의 절단 및/또는 연결에 관여한다. 리보자임은 임의의 RNA 전사체에 표적화될 수 있고 촉매적으로 당해 전사체를 절단할 수 있다[문헌참조: 미국 특허 제5,272,262호; 미국 특허 제5,144,019호 및 세크(Cech)등에게 허여된 미국 특허 제5,168,053호, 제5,180,818호, 제5,116,742호 및 제5,093,246호]. 본 발명의 특정 양태에 따라, 당해 HE4a mRNA 특이적 리보자임 또는 당해 리보자임을 암호화하는 핵산이 숙주 세포로 전달되어 HE4a 유전자 발현을 억제시킬 수 있다. 따라서 리보자임 및 이의 유사체가 진핵 바이러스 프로모터와 같은 진핵 프로모터에 연결된 리보자임을 암호화하는 NDA에 의해 숙주 세포로 전달되어 핵으로 도입되는 즉시, 리보자임이 직접 전사된다.

생물학적 활성에 요구되지 않는 아미노산 잔기 또는 서열이 부가되거나 치환되거나 말단 잔기 또는 내부 잔기 또는 서열이 결실된 동등한 DNA 작제물이 또한 본 발명에 의해 포함된다. 예를 들어, 생물학적 활성에 필수적이지 않은 Cys 잔기를 암호화하는 서열이 변화되어 Cys 잔기가 결실되거나 기타 아미노산으로 대체됨으로써 재생시 분자내 디설파이드 브릿지가 부정확하게 형성되지 않도록 할 수 있다. 인접한 이염기성 아미노산 잔기를 변형시켜 KEX2 프로테아제 활성이 존재하는 효모 시스템내에서의 발현이 증진된 기타 등가물이 제조될 수 있다. EP 212,914는 단백질내 KEX2 프로테아제 프로세싱 부위를 불활성시키기 위한 부위 특이적 돌연변이 유발의 용도를 기재하고 있다. KEX2 프로테아제 프로세싱 부위는 이들 인접 염기성 잔기를 제거하기 위해 Arg-Arg, Arg-Lys 및 Lys-Arg 쌍을 변화시키기 위해 잔기를 결실, 부가 또는 치환시킴에 의해 불활성화된다. Lys-Lys 쌍은 KEX2 절단에 상당히 덜 민감하고 Arg-Lys 또는 Lys-Arg의 Lys-Lys로의 전환은 KEX2 부위를 불활성화시키는데 보존적이고 바람직한 방법이다.

적합한 DNA 서열은 다양한 방법에 의해, 선택된 숙주 세포에 다수의 널리 공지된 벡터중 하나로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA 서열은 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의해 적당한 제한 엔도뉴클레아제 부위로 삽입된다. DNA 리가제, DNA 폴리머라제, 제한 엔도뉴클레아제 등이 관여하는 효소 반응을 위한 클로닝, DNA 분리, 증폭 및 정제에 대한 표준 기술 및 다양한 분리 기술은 당업자에게 공지된 것이고 통상적으로 사용되는 것들이다. 다수의 표준 기술은 예를 들어 문헌[참조: Ausubel et al. (1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. amp; John Wiley amp; Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning, Second Ed. , Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)]에 기재되어 있다.

포유동물 발현 시스템의 예는 문헌[참조: Gluzman, Cell 23:175(1981)]에 기재된 몽키 신장 섬유아세포의 COS-7 세포주 및 양립가능한 벡터를 발현할 수 있는 기타 세포주, 예를 들어, C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주를 포함한다. 포유동물 발현 벡터는 복제 오리진, 적합한 프로모터 및 인핸서 및 또한 임의의 필요한 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여제 및 수용체 부위, 전사 종결 서열 및 5' 플랭킹 비전사 서열을 포함한다. 예를 들

어, SV40 스플라이스 및 폴리아데닐화 부위로부터 유래된 DNA 서열은 요구되는 비전사 유전자 요소를 제공하는데 사용될 수 있다. 작제물은, 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개 형질감염 또는 전기천공을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업자에게 친숙한 다양한 방법에 의해 숙주 세포로 도입될 수 있다[문헌참조: Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology].

본 발명은 추가로, HE4a 폴리펩타이드에 관한 것이고 특히, 악성종양 증상을 검출하기 위한 방법에 관한 것이다. 바람직한 양태에서, 악성종양은 천연적으로 가용성 분자로 존재하는 생물학적 샘플 또는 세포를 포함하는 샘플내에서의 존재 유무를 결정함에 의해 검출되고 이때, 당해 가용성 분자 및 세포 표면 분자는 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체와 반응하는 항원 결정인자를 갖는다. 또 다른 바람직한 양태에서, 악성 종양은 하나 이상의 천연적으로 존재하는 HE4a 폴리펩타이드의 생물학적 샘플내에서의 존재 유무를 결정함에 의해 검출된다. 본원에 제공된 바와 같이, 'HE4a 항원 폴리펩타이드' 또는 'HE4a 폴리펩타이드'는 서열 11의 아미노산 서열을 갖는 임의의 폴리펩타이드, 이의 단편, 유도체 및 유사체를 포함하고 또한 서열 10 또는 12를 포함하는 핵산 분자에 의해 암호화되거나 서열 10 또는 12의 핵산 분자에 하이브리드화할 수 있는 핵산 분자에 의해 암호화된 임의의 폴리펩타이드, 이의 단편, 유도체 또는 유사체를 포함한다. 본 발명의 특정 바람ㅈ기한 양태는 본원에 제공된 바와 같은 HE4a 서열(예를 들어, 서열 10 내 지 13)에 대한 조성물 및 방법을 고려하지만 구조, 기능 및/또는 세포 유형 발현 또는 조직 분포등(항체 한정된 검출가능한 에피토프를 포함하고 또한 올리고뉴클레오타이드 한정된 하이브리드화 검출을 포함함)의 차이를 기준으로 문헌[참조: Kirchoff et al.(e.g., 1991 Biol. Reproduct. 45:350; 서열 8 및 9)]에 기재된 HE4 서열을 배제한다.

본 발명의 HE4a 폴리펩타이드는 변형되지 않은 폴리펩타이드일 수 있거나 예를 들어, 당화, 인산화, 글리코포스패티딜이노시톨 앵커 변형등을 포함한 지방 아실화, 포스패티딜이노시톨 특이적 포스포리파제 c 매개된 가수분해등과 같은 포스포리파제 절단 또는 프로테아제 절단, 탈인산 또는 화학적 공유 결합의 형성 또는 절단을 포함하는 변형과 같은 임의의 기타 유형의 단백질 해독후 변형에 의해 변형된 폴리펩타이드일 수 있다.

HE4a 폴리펩타이드, HE4a 항원 폴리펩타이드 또는 HE4a 융합 단백질을 언급하는 경우, 용어 '단편' '유도체' 및 '유사체'는 당해 폴리펩타이드와 필수적으로 동일한 생물학적 기능 및/또는 활성을 보유한 임의의 HE4a 폴리펩타이드를 언급한다. 따라서, 유사체는 상이하게 해독후 변형되는 HE4a 폴리펩타이드와 같은 HE4a 항원 폴리펩타이드 이소형태 또는 스플라이스 변이체와 같은 변이체를 포함할 수 있다. 당해 기술분야에 널리 공지된 바와 같이, '스플라이스 변이체'는 RNA 전사체의 상이한 세포내 프로세싱으로부터 생성되는 폴리펩타이드의 변이체 또는 기타 형태를 포함한다. 예를 들어, 2개의 특징적인 mRNA는 이들이 단지 모든 RNA 종에서 특정 엑손에 상응하는 서열 모두 또는 일부를 내포하고 있다는 차이만 있고 기 타 종에는 부재인 경우 서로가 스플라이스 변이체일 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 기타 구조적 관련성이 일반적으로 스플라이스 변이체로서 간주되는 mRNA 종간에 존재할 수 있다. HE4a 폴리펩타이드는 추가로 프로단백질의 일부가 절단되어 활성 HE4a 폴리펩타이드를 생성하도록 활성화될 수 있는 프로단백질을 포함한다.

HE4a 폴리펩타이드 또는 HE4a 항원 폴리펩타이드의 단편, 유도체 및 유사체의 생물학적 기능 및/또는 활성은 본원에 기재된 바와 같은 대상체에서 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법에서 마커로서의 당해 폴리펩타이드의 용도를 포함하지만 이에 제한될 필요는 없다. 예를 들어, 대상체 기원의 샘플에서 가용성 형태로 천연적으로 존재하고 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체와 반응하는 항원성 결정인자를 갖는 분자를 검출함에 의해, 당업자는 HE4a 폴리펩타이드의 생물학적 기능 및/또는 활성을 모니터링할 수 있다. 추가로, 본 발명의 특정 양태에서, 본 발명의 스크리닝 방법은 악성종양 증상을 갖는 것으로 의심되는 제1 대상체 기원의 제1 생물학적 샘플 및 (ii) 악성종양 증상이 없는 것으로 공지된 제2 대상체 기원의 제2 생물학적 샘플 각각에서 가용성 형태로 천연적으로 존재하고 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 항체와 반응하는 항원 결정인자를 갖는 검출가능한 분자의 상대적 양, 수준 및/또는 양을 비교하는 것임을 주지해야만 한다. 따라서, 생물학적 샘플내에서 존재하는 HE4a 폴리펩타이드의 상대적인 정량적인 존재는 HE4a 폴리펩타이드의 생물학적 기능 및/또는 활성일 수 있지만 당해 기능 및/또는 활성이 제한되지 말아야 한다.

HE4a 폴리펩타이드의 단편, 유도체 또는 유사체는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존성 또는 비보존성 아미노산 잔기(바람직하게 보존성 아미노산 잔기)로 치환되는 폴리펩타이드, (ii) 추가의 아미노산(HE4a 폴리펩타이드 또는 프로단백질 서열의 정제를 위해 사용될 수 있는 아미노산을 포함)이 HE4a 폴리펩타이드에 융합된 폴리펩타이드 또는 (iii) 절단된 HE4a 폴리펩타이드일 수 있다. 당해 단편, 유도체 및 유사체는 본원의 교시로부터 당업자의 범위내에 있는 것으로 간주된다.

절단된 HE4a 폴리펩타이드는 완전한 길이 이하 버젼의 HE4a 폴리펩타이드를 포함하는 임의의 HE4a 폴리펩타이드 분자일 수 있다. 본 발명에 의해 제공된 절단된 분자는 절단된 생물학적 중합체를 포함할 수 있고 본 발명의 바람직한 양태에서, 당해 절단된 분자는 절단된 핵산 분자 또는 절단된 폴리펩타이드일 수 있다. 절단된 핵산 분자는 공기되거나 기재된 핵산 분자의 완전한 길이 히아의 뉴클레오타이드 서열을 갖고 이때, 공지되거나 기재된 핵산 분자는, 당업자가 이를 완전한 길이의 분자로서 간주하는 한, 천연적으로 존재하는 핵산 분자, 합성 핵산 분자 또는 재조합 핵산 분자일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 유전자 서열에 상응하는 절단된 핵산 분자는 완전한 길이 이하의 유전자를 포함하

고 이때 유전자는 유전자의 일부로서 인지되는, 암호화 및 비암호화 서열, 프로모터, 인핸서 및 기타 조절 서열, 플랭킹 서열등 및 기타 기능성 및 비기능성 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, mRNA 서열에 상응하는 절단된 핵산 분자는 완전한 길이 이하의 mRNA 전사체를 포함하고 이것은 다양게 해독된 영역 및 비해독된 영역 뿐만 아니라 기타 기능성 및 비기능성 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 바람직한 양태에서, 절단된 분자는 완전한 길이 이하의 특정 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드이다.

본원에 사용된 바와 같이, '결실'은 당업자가 이해하는 바와 같은 의미와 동일하고 예를 들어, 본원에서 제공된 바와 같은 절단된 분자의 경우에서 처럼 상응하는 완전한 길이의 분자에 상대적으로, 말단 또는 비말단 영역 기원의 서열의 하나 이상의 일부가 없는 분자를 언급할 수 있다. 핵산 분자 또는 폴리펩타이드와 같은 선형 생물학적 분자인 절단된 분자는 분자의 말단에서 또는 분자의 비말단 영역에서 하나 이상이 결실될 수 있고 이때, 당해 결실은 1 내지 1500개의 연속 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기, 바람직하게는 1 내지 500개의 연속 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 및 보다 바람직하게는 1 내지 300개의 연속 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

당해 분야에 공지된 바와 같이, 2개의 폴리펩타이드간의 '유사성'은 폴리펩타이드의 아미노산 서열 및 보존된 아미노산 치환체와 제2 폴리펩타이드의 서열과 비교하여 결정된다. 2개의 폴리펩타이드 또는 뉴클레오타이드 서열간의 유사성 또는 심지어 % 상동성은 NCBI 웹 사이트(http://www/ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)에서 구입할 수 있는 블라스트 알고리듬[문헌참조: Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565,1991; Henikoff and Henikoff, Proc, Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992]과 같은 당업자에게 널리 공지된 컴퓨터 알고리듬을 사용하여 서열을 비교함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 디폴트 계수가 사용될 수 있다. 또 다른 유용한 컴퓨터 알고리듬의 예는 예를 들어, 기관[Institut de Genetique Humaine, Montpellier, France]의 웹 사이트(www2.igh.cnrs.fr/home.eng.html)에서 구입할 수 있고 디폴트 계수로 사용되는 얼라인(Align) 및 FASTA와 같은 프로그램에서 사용되는 알고리듬이다. 본 발명의 폴리펩타이드의 단편 또는 일부는 펩타이드 합성에 의해 상응하는 전장의 폴리펩타이드를 제조하는데 사용될 수 있고 따라서 단편은 전장의 폴리펩타이드를 제조하기 위한 중간체로서 사용될 수 있다.

용어 '분리된'은 물질이 본래의 환경(예를 들어, 천연적으로 존재하는 천연 환경)으로부터 제거됨을 의미한다. 예를 들어, 생존 동물에 존재하는 천연적으로 존재하는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 분리되지 않지만 천연 시스템중에 공존하는 물질의 일부 또는 모두로부터 분리된 동일한 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 분리된다. 당해 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 조성물의 일부일 수 있고 당해 조성물이 천연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 분리되어 있다.

친화성 기술은 특히, 본 발명의 방법에 따라 사용하기 위한 HE4a 폴리펩타이드를 분리하는데 유용하고 HE4a 폴리펩타이드와 특이적 결합 반응을 사용하여 분리시키는 임의의 방법을 포함한다. 예를 들어, HE4a 폴리펩타이드는 공유적으로 결합된 올리고사카라이드 잔기(예를 들어, 실시예에 기재된 바와 같이 도 2 참조)를 포함할 수 있기 때문에, 렉틴에 의한 탄수화물의 결합을 허용하는 조건하에서 적합한 고정화된 렉틴으로의 HE4a 폴리펩타이드의 결합과 같은 친화성 기술이 특히 유용한 친화성 기술일 수 있다. 기타 유용한 친화성 기술은 HE4a 폴리펩타이드를 분리하기 위한 면역학적 기술을 포함하고 당해 기술은 항원에 대한 항체 결합 부위 및 복합체내 존재하는 항원 결정인자간의 특이적 상호 작용에 의존한다. 면역학적 기술은 면역친화성 크로마토그래피, 면역침전, 고체 상 면역흡착 또는 기타 면역친화성 방법을 포함하지만 이에 제한될 필요는 없다. 이들 및 기타 유용한 친화성 기술에 관하여 및 친화성 기술을 포함하는 복합체의 분리 및 특성화를 위한 상세한 기술에 관하여, 본원에 전문이 참조로서 인용되는 문헌[참조: Scopes, R. K., Protein Purification : Principles and Practice, 1987, Springer-Verlag, NY; Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston; and Hermanson, G. T. et al., Immobilezed Affinity Ligand Techniques, 1992, Academic Press, Inc. , California]을 참조한다.

본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 HE4a에 융합된 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 당해 HE4a 융합 단백질은 예를 들어, HE4a 융합 단백질의 검출, 분리 및/또는 정제를 통해 허용되는 추가의 기능적 서열 또는 비기능적 폴리펩타이드 서열에 융합된 HE4a 폴리펩타이드 서열의 발현용으로 제공하기 위한 추가의 암호화 서열의 프레임내에 융합된 HE4a 암호화 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다. 당해 HE4a 융합 단백질은 단백질-단백질 친화성, 금속 친화성 또는 전하 친화성 기본 폴리펩타이드 정제 또는 프로테아제에 의해 절단되어 HE4a 폴리펩타이드가 융합 단백질로부터 분리될 수 있도록 하는 융합 서열를 함유한 융합 단백질의 특이적 프로테아제 절단에 의해 HE4a 융합 단백질의 검출, 분리 및/또는 정제를 허용할 수 있다.

따라서, HE4a 융합 단백질은 친화성 태그 폴리펩타이드를 포함할 수 있고 이 것은 HE4a에 첨가되어 리간드의 특이적 친화성 상호작용을 통해 HE4a의 검출 및 분리를 용이하게 하는 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 언급한다. 리간드는 임의의 분자, 수용체, 역수용체, 항체등일 수 있고 이와 함께 친화성 태그가 본원에 제공된 바와 같은 특이적 결합 상호작용을 통해 상호작용할 수 있다. 예를 들어, 당해 펩타이드는 예를 들어, 문헌[참조: 미국 특허 제5,011,912호 및 Hopp et al.,(1988 Bio/Technology 6:1204]에 기재된 폴리 His 또는 항원 동정 펩타이드 또는 XPRESS ™ 에피토프 태그(Invitrogen, Carsbad, CA)를 포함한다. 친화성 서열은 예를 들어, 세균 숙주의 경우에 마커에 융합된 성숙한 폴리펩타이드를 정제하기 위해 제공되는 헥사 히스티딘 태그(pBAD/His(Invitrogen)로 공급됨) 또는 pQE-9 벡터일 수 있거나 예를 들어, 친화성 서열은 포유동물 숙주, 예를 들어, COS-7 세포가 사용되는 경우, 혈구응집소(HA)

태그일 수 있다. HA 태그는 인플루엔자 혈구응집소 단백질로부터 유래하는 항체 한정된 에피토프에 상응한다[문헌 참조: Wilson et al., 1984 Cell 37:767].

HE4a 융합 단백질은 특히, 바람직한 양태일 수 있고 하기에서 보다 상세하게 기술되는 바와 같이, HE4a에 첨가되어 HE4a의 검출, 분리 및/또는 위치 결정을 용이하게하는 면역글로불린 불변 영역 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 면역글로불린 불변 영역 폴리펩타이드는 바람직하게 HE4a 폴리펩타이드의 C 말단에 융합된다. 비제한적인 이론에 따라, 본원에서 제공되는 바와 같은 HE4a 융합 단백질내에 면역글로불린(Ig) 불변 영역을 포함함으로써 예를 들어, 특정 숙주(즉, '자가' 대 '비 자가')내에 사용되는 경우 특정 Ig 영역의 면역학적/비면역학적 성질과 관련된 잇점을 제공하거나 융합 단백질의 분리 및/또는 검출을 용이하게 하는 잇점을 제공할 수 있다. 이들 및 Ig 융합 단백질의 기타 잇점은 본원에 기재된 내용을 토대로 당업자에 의해 인지될 것이다. 항체 유래 폴리펩타이드(Fc 도메인 포함)의 다양한 부분이 융합된 이종성 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질의 일반적인 제조 방법은 예를 들어, 문헌[참조: Ashkenazi et al.(PNAS USA 88:10535, 1991) and Byrn et al.(Nature 344:677, 1990)]에 기재되어 있다. HE4a:Fc 융합 단백질을 암호화하는 유전자 융합체는 적절한 발현 벡터로 삽입된다. 본 발명의 특정 양태에서, HE4a:Fc 융합 단백질은 쇄 상호 디설파이드 결합이 Fc 폴리펩타이드간에 형성되는 즉시 항체 분자와 유사하게 어셈블리되어 이량체 HE4a 융합 단백질이 수득된다.

HE4a를 암호화하는 서열의 프레임내에 연결된 DNA 서열에 의해 암호화된 면역글로불린 V 영역 도메인을 포함하는 융합 단백질에 의해 미리 선택된 항원에 대한 특이적 결합 친화성을 갖는 HE4a 융합 단백질이 또한 본 발명의 범위내에 속하고 본원에 제공된 바와 같은 변이체 및 단편을 포함한다. 면역글로불린 V-영역 융합 폴리펩타이드를 갖는 융합 단백질의 작제를 위한 일반적인 방법은 예를 들어, 유럽 특허 제0318554호, 미국 특허 제5,132,405호, 미국 특허 제5,091,513호 및 미국 특허 제5,476,786호에 기재되어 있다.

본 발명의 핵산은 또한 목적하는 친화성 성질을 갖는 기타 폴리펩타이드, 예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제와 같은 효소에 융합된 HE4a 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 암호화할 수 있다. 또 다른 예로서, HE4a 융합 단백질은 또한 스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus) 단백질 A 폴리펩타이드에 융합된 HE4a 폴리펩타이드를 포함할 수 있고 면역글로불린 불변 영역에 대한 친화성을 갖는 융합 단백질을 작제하는데 있어서 단백질 A 암호화 핵산 및 이의 용도는 일반적으로 예를 들어, 미국 특허 제5,100,788호에 기재되어 있다. HE4a 융합 단백질의 작제를 위한 기타 유용한 친화성 폴리펩타이드는 WO 89/03422, 미국 특허 제5,489,528호, 미국 특허 제5,672,691호, WO 93/24631, 미국 특허 제5,168,049호, 미국 특허 제5,272,254호에 기재된 바와 같은 스트렙트아비딘 융합 단백질 및 EP 511,747에 기재된 아비딘 융합 단백질을 포함할 수 있다. 본원 및 인용 문헌에서 제공된 바와 같이, HE4a 폴리펩타이드 서열은 전장 융합 폴리펩타이드일 수 있고 또한 이의 변이체 또는 단편일 수 있는 융합 폴리펩타이드 서열에 융합될 수 있다.

본 발명은 또한 융합 단백질을 세포 핵으로 유도하는 폴리펩타이드 서열, 소포체의 내강에 위치하도록 하고 전형적인 ER-골지체 분비 경로(문헌참조: von Heijne, J. Membrane Biol. 115:195-201, 1990)를 통해 세포로부터 분비되고 세포질 막에 혼입되어 막관통 세포 표면 수용체의 세포질 도메인을 포함하는 특이적 세포질 성분과 연합하거나 당업자에게 친숙한 공지된 세포내 단백질 분류 기작(문헌참조: Rothman, Nature 372:55-63, 1994, Adrani et al., 1998 J. Biol. Chem. 273:10317 및 본원에 참조문헌으로서 인용됨)에 의해 특정 아세포 위치로 지시되도록 하는 폴리펩타이드 서열을 함유하는 HE4a 융합 단백질을 고려한다. 따라서, 이들 및 관련 양태는, 목적하는 폴리펩타이드를 미리 정해진 세포내, 막 또는 세포외 위치로 표적화되도록 지시하는 조성물 및 방법을 포함한다.

본 발명은 또한 본 발명의 핵산을 함유하는 벡터 및 작제물에 관한 것이고 특히, 상기된 바와 같이 본 발명에 따른 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 임의의 핵산을 함유하는 '재조합 발현 작제물'에 관한 것이고 본 발명의 벡터 및/또는 작제물로 유전학적으로 가공된 숙주 세포 및 재조합 기술에 의한 본 발명의 HE4a 폴리펩타이드 및 융합 단백질의 제법에 관한 것이다. HE4a 단백질은 적합한 프로모터하에 포유동물 세포, 효모, 세균 또는 기타 세포에서 발현될 수 있다. 무세포 해독 시스템은 본 발명의 DNA 작제물로부터 기원하는 RNA를 사용하여 당해 단백질을 제조하는데 사용될 수 있다. 원핵 및 진핵 숙주와 함께 사용하는데 적합한 클로닝 및 발현 벡터는 예를 들어, 문헌[참조: Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York, (1989)]에 기재되어 있다.

일반적으로, 재조합 발현 벡터는 복제 오리진 및 숙주 세포의 형질전환을 허용하는 선별 마커, 예를 들어, 이. 콜리 및 에스 세레비지애(S. cerevisiae) TRP1 유전자의 암피실린 내성 유전자 및 고도로 발현되는 유전자 기원의 프로모터를 포함하여 다운스트림 구조적 서열의 전사를 지시함을 포함한다. 당해 프로모터는 무엇보다 3-포스포글리세레이트 키나제(PGK), α-인자, 산 포스파타제, 또는 열 쇼크 단백질과 같은 해당과정 효소를 암호화하는 오페론으로부터 기원할 수 있다. 이종성 구조 서열은 해독 개시 및 종결 서열과 함께 적합한 상으로 어셈블리된다. 임의로, 이종성 서열은 예를 들어, 발현된 재조합 생성물의 안정화 또는 단순화된 정제와 같은 목적하는 특성을 부여하는 N-말단 동정 펩타이드를 포함하는 융합 단백 질을 암호화할 수 있다.

세균용으로 유용한 발현 작제물은 발현 벡터에 기능성 프로모터와 함께 작동가능한 판독 상으로 적합한 해독 개시 및 종결 시그날과 함께 목적하는 단백질을 암호화하는 구조 DNA 서열을 삽입함에 의해 작제된다. 당해 작제물은 하나 이상의 표현형 선택가능한 마커 및 복제 오리진을 포함하여 벡터 작제물을 유지할 수 있고 경우에 따라, 숙주내 증폭물을 제공한다. 형질전환용으로 적합한 원핵 숙주는 이. 콜리, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 살모넬라 타이피무리움(Salmonella typhimurium) 및 슈도모나스(Pseudomonas), 스트렙토마이세스(Streptomyces) 및 스타필로코커스(Staphylococuus) 속에 속하는 다양한 종을 포함하지만 또한 또 다른 것들이 선택 사양에 따라 사용될 수 있다. 임의의 또 다른 플라스미드 또는 벡터가 사용될 수 있는데 단 이들은 숙주내에서 복제가능하고 생존할 수 있어야만 한다.

대표적이지만 비제한적인 예로서, 세균용으로 유용한 발현 벡터는 널리 공지된 클로닝 벡터 pBR322(ATCC 37017)의 유전학적 요소를 포함하는 시판되는 플라스미드 기원의 선별 마커 및 세균성 복제 오리진을 포함할 수 있다. 당해 시판되는 벡터는 예를 들어, pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 및 GEM1(Promega Biotec, Madison, Wisconsin, USA)를 포함한다. 이들 pBR322 '골격' 부분은 적합한 프로모터 및 발현될 구조 서열과 결합된다.

적합한 숙주 균주의 형질전환 및 숙주 균주를 적당한 세포 밀도로 성장시킨 후 본원에 제공된 바와 같은 조절성 프로모터인 경우, 선택된 프로모터는 적합한 수단(예를 들어, 온도 전이 또는 화학적 유도)에 의해 유도되고 세포는 추가의 기간동안 배양된다. 세포는 전형적으로 원심분리에 의해 수거되고 물리적 또는 화학적 수단에 의해 파쇄되고 수득한 조 추출물은 추가의 정제를 위해 유지한다. 단백질의 발현에 사용되는 미생물 세포는 동결 해동 반복, 초음파 처리, 기계적 파쇄 또는 세포 용해제의 사용을 포함하는 임의의 간편한 방법에 의해 파쇄될 수 있고 당해 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

따라서, 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 본 발명의 핵산은 HE4a 폴리펩타이드를 발현하기 위한 재조합 발현 작제물로서 다양한 발현 벡터 작제물중 어느 하나에 포함될 수 있다. 당해 벡터 및 작제물은 염색체, 미토콘드리아 및 합성 DNA 서열, 예를 들어, SV40의 유도체; 세균 플라스미드; 파아지 DNA; 바큘로바이러스; 효모 플라스미드; 플라미드 및 파아지 DNA의 조합으로부터 유도된 벡터, 백시니아(vaccinia), 아데노바이러스(adenovirus), 포울 폭스(fowl pox virus) 바이러스 및 슈도라비스(pseudorabies)와 같은 바이러스 DNA를 포함한다. 그러나, 임의의 또 다른 벡터는 숙주에서 복제가능하고 생존가능한 한 재조합 발현 작제물의 제조용으로 사용될 수 있다.

적합한 DNA 서열을 다양한 방법에 의해 벡터로 삽입시킬 수 있다. 일반적으로, DNA 서열은 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해 적당한 제한 엔도뉴클레아제 부위로 삽입된다. 클로닝, DNA 분리, 증폭 및 정제를 위한 표준 기술, DNA 리가제, DNA 폴리머라제, 제한 엔도뉴클레아제를 포함하는 효소적 반응에 대한 표준 기술 및 다양한 분리 기술이 공지되어 있고 당업자에 의해 일반적으로 사용된다. 다 수의 표준 기술이 예를 들어 문헌[참조: Ausubel et al.(1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. amp; John Wiley amp; Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al.(1989 Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al.(1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)]에 기재되어 있다.

발현 벡터내 DNA 서열은 하나 이상의 적당한 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 또는 조절 프로모터)에 작동적으로 연결되어 mRNA 합성을 지시한다. 당해 발현 조절 서열의 대표적인 예는 LTR 또는 SV40 프로모터, 이. 콜리 lac 또는 trp, 파아지 람다 P_L 프로모터 및 원핵 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스내의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 공지된 기타의 프로모터를 포함한다. 프로모터 영역은 CAT(클로람페니콜 트랜스퍼라제) 벡터 또는 선별 마커를 갖는 기타 벡터를 사용하여 임의의 목적하는 유전자로부터 선별될 수 있다. 2개의 적합한 벡터는 pKK232-8 및 pCM7이다. 특정 명명된 세균성 프로모터는 lacI, lacZ, T3, T7, gpt, 람다 P_R, P_L 및 trp를 포함한다. 진핵 프로모터는 CMV 이메디에이트 어얼리, HSV 티미딘 키나제, 어얼리 앤드 레이트 SV40, 레트로바이러스 기원의 LTR 및 마우스 메탈로티오네인-I를 포함한다. 적당한 벡터 및 프로모터의 선별은 당업자의 기술 수준내에 있고 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산과 작동적으로 연결된 하나 이상의 프로모터 또는 조절성 프로모터를 포함하는 특히 바람직한 재조합 발현 작제물의 제법이 본원에 기재되어 있다.

상기 주지된 바와 같이, 특정 양태에서, 당해 벡터는 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터일 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 플라스미드 벡터가 유래할 수 있는 레트로바이러스는 몰로니 뮤린 류케미아 바이러스(Moloney Murine Leukemia Virus), 비장 괴사 바이러스(spleen necrosis virus), 라우스 사코마 바이러스(Rous Sarcoma Virus), 하베이 사코마 바이러스(Harvey Sarcoma virus), 아비안 류코시스 바이러스(avian leukosis virus), 기본 에이프 류케미아 바이러스(gibbon ape leukemia virus), 사람 면역결핍 바이러스, 아데노바이러스, 적혈구증가증 사코마 바이러스(Myeloproliferative Sarcoma Virus) 및 포유동물 종양 바이러스와 같은 레트로바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

바이러스 벡터는 하나 이상의 프로모터를 포함한다. 사용될 수 있는 적합한 프로모터는 레트로바이러스 LTR; SV40 프로모터 및 문헌[참조: Miller et al., Biotechniques 7:980-990(1989)]에 기재된 사람 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 또는 임의의 기타 프로모터(예를 들어, 히스톤, pol III 및 β-액틴 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지

않는 진핵 세포 프로모터와 같은 세포 프로모터)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 사용될 수 있는 기타 바이러스 프로모터는 아데노바이러스 프로모터, 티미딘 키나제(TK) 프로모터 및 B19 파르보바이러스 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 프로모터의 선별은 본원의 교시로부터 당업자에게 명백할 것이고 조절성 프로모터 또는 상기된 바와 같은 프로모터일 수 있다.

레트로바이러스 플라스미드 벡터를 사용하여 팩키징 세포주에 형질도입하여 생산자 세포주를 생성시킬 수 있다. 형질감염될 수 있는 팩키징 세포의 예는 본원에 전체내용이 참조로서 인용되는 문헌[참조: Miller, Human Gene Therapy, 1:5-14(1990)]에 기재된 바와 같은 PE501, PA317, φ-2, φ-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, φCRE, φCRIP, GP+E-86, GP+envAm12 및 DAN 세포주를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 벡터는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 수단을 통해 팩키징 세포에 형질도입될 수 있다. 당해 수단은 전기천공, 리포좀의 사용 및 인산칼슘 침전을 포함한다. 또한, 레트로바이러스 플라스미드 벡터는 리포좀에 캅셀화될 수 있거나 지질에 커플링되고 이어서 숙주로 투여될 수 있다.

생산자 세포주는 HE4a 폴리펩타이드 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 감염성 레트로바이러스 벡터 입자를 생산한다. 이어서, 당해 레트로바이러스 벡터 입자를 사용하여 시험관내 또는 생체내에서 진핵 세포를 형질도입할 수 있다. 형질도입된 진핵 세포는 HE4a 폴리펩타이드 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 발현시킨다. 형질도입될 수 있는 진핵 세포는 배아 줄기 세포, 배아 암 세포 뿐만 아니라 조혈 줄기 세포, 간세포, 섬유아세포, 근육모세포, 피부세포, 내피 세포, 기관지 상피 세포 및 다양한 기타 배양 적응된 세포주를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

바이러스 벡터를 사용하여 재조합 HE4a 발현 작제물을 제조하는 본 발명의 양태의 또 다른 예로서, 하나의 바람직한 양태에서, HE4a 폴리펩타이드 또는 융합 단백질의 발현을 지시하는 재조합 바이러스 작제물에 의해 형질도입되는 숙주 세포는, 바이러스 발아동안에 바이러스 입자에 의해 도입된 숙주 세포막의 부분으로 유 래하는 발현된 HE4a 폴리펩타이드 또는 융합 단백질을 함유하는 바이러스 입자를 생산할 수 있다. 또 다른 바람직한 양태에서, HE4a 암호화 핵산 서열은 바큘로바이러스 셔틀 벡터로 클로닝되고 이어서 바큘로바이러스와 재조합되어 재조합 바큘로바이러스 발현 작제물이 생성되고 이것은 예를 들어, 문헌[참조: Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 39, C.D. Richardson, Editor, Human Press, Totowa, NJ, 1995; Piwnica-Worms, 'Expression of Proteins in Insect Cells Using Baculoviral Vectors,' Section II in chapter 16 in: Short Protocols in Molecular Biology, 2nd Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley amp; Sons, New York, New York, 1992, pages 16-32 to 16 to 48]에 기재된 바와 같은 Sf9 숙주 세포를 감염시키는데 사용된다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 상기된 재조합 HE4a 발현 작제물을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 예를 들어, 클로닝 벡터, 셔틀 벡터 또는 발현 작제물일 수 있는 본 발명의 벡터 및/또는 발현 작제물로 유전학적으로 조작된다. 벡터 또는 작제물은 예를 들어, 플라스미드, 바이러스 입자 또는 파아지등의 형태일 수 있다. 조작된 숙주 세포는 프로모터를 활성화시키고 형질전환체를 선별하거나 HE4a 폴리펩타이드 또는 HE4a 융합 단백질을 암호화하는 유전자와 같은 특정 유전자를 증폭시키는데 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양될 수 있다. 발현을 위해 선별되는 특정 숙주 세포에 대한 배양 조건, 예를 들어, 온도 및 pH등은 당업자에게 명백할 것이다.

숙주 세포는 고등 진핵 세포, 예를 들어, 포유동물 세포이거나 하등 진핵 세 포, 예를 들어, 효모 세포일 수 있거나 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어, 세균 세포일 수 있다. 본 발명에 따른 적합한 숙주 세포의 대표적인 예는 이. 콜리, 스트렙토마이세스(Streptomyces), 살모넬라 타이피무리움(Salmonella typhimurium)과 같은 세균 세포, 효모와 같은 진균 세포, 드로소필라(Drosophila) S2 및 스포도프테라(Spodoptera) Sf9과 같은 곤충 세포, CHO, COS 또는 293 세포와 같은 동물 세포, 아데노바이러스, 식물 세포 또는 시험관내 증식에 적응되거나 드 노보(de novo) 설정된 임의의 적합한 세폴르 포함하지만 이에 제한될 필요는 없다. 적당한 숙주의 선별은 본원의 교시로부터 당업자의 기술 범위내 있는 것으로 간주된다.

다양한 포유동물 세포 배양 시스템은 또한 재조합 단백질을 발현시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 부분적으로, HE4a를 암호화하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함하는 재조합 발현 작제물을 포함하는 숙주 세포를 배양함에 의해, 재조합 HE4a 폴리펩타이드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 특정 양태에서, 프로모터는 본원에 제공된 바와 같은 조절성 프로모터, 예를 들어, 테트라사이클린 억제가능한 프로모터일 수 있다. 특정 양태에서, 재조합 발현 작제물은 본원에 제공된 바와 같은 재조합 바이러스 발현 작제물이다. 포유동물 발현 시스템의 예는 문헌[참조: Gluzman, Cell 23:175(1981)]에 기재된 원숭이 신장 섬유아세포의 COS-7 세포주 및 양립가능한 벡터를 발현할 수 있는 기타 세포주, 예를 들어, C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주를 포함한다. 포유동물 발현 벡터는 복제 오리진, 적합한 프로모터 및 인핸서 및 또한 임의의 필요한 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위, 전사 종결 서 열 및 예를 들어, MRA 발현 작제물의 제조에 관하여 본원에 기재된 바와 같은 5' 플랭킹 비전사 서열을 포함한다. SV40 스플라이스로부터 유래하는 DNA 서열 및 폴리아데닐화 부위는 요구된 비전사 유전자 요소를 제공하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매기 형질감염 또는 전기천공을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업자에게 익숙한 다양한 방법에 의해 작제물을 숙주 세포에 도입할 수 있다[문헌참조: Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology].

발현된 재조합 HE4a 항원 폴리펩타이드(또는 HE4a 폴리펩타이드), 또는 이로부터 유래하는 융합 단백질은 온전한 숙주 세포 형태; 세포막, 세포내 소포체 또는 기타 세포 기관과 같은 온전한 기관 또는 세포 파쇄물 또는 용해물, 단일 및 다중 적층 막 소포체 또는 기타 제제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 파쇄된 세포 제제 형태로 면역원으로서 유용할 수 있다. 또한, 발현된 재조합 메소텔린 관련 항원 폴리펩타이드(또는 메소텔린 폴리펩타이드) 또는 융합 단백질은 재조합 세포 배양물로부터 황산암모늄 또는 에탄올 침전법, 산 추출법, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 면역친화성 크로마토그래피를 포함하는 친화성 크로마토그래피, 하이드록시애퍼타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 방법에 회수되고 정제될 수 있다. 필요에 따라 단백질 리폴딩 단계는 성숙한 단백질의 형태를 완전하게 하는데 사용될 수 있다. 최종적으로, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 최종 정제 단계에 사용할 수 있다. 발현된 재조합 HE4a 항원 폴리펩타이드(또는 HE4a 폴리펩타이드) 또는 융합 단백질은 또한 통상적인 항체 스크리닝에 대한 다수의 분석 방법중 하나에서 표적 항원으로서 유용할 수 있고 당업자에 의해 용이하게 수행될 수 있다.

따라서, 본 발명의 방법에 사용될 특이적 항체의 제조를 위한 면역원인 HE4a 항원 폴리펩타이드(또는 HE4a 폴리펩타이드)는 천연적으로 정제된 생성물 또는 화학적 합성 과정의 생성물 또는 원핵 또는 바람직하게 진핵 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생산되는 생성물일 수 있다. 재조합 생산 방법에 사용되는 숙주에 따라, 본 발명의 폴리펩타이드는 본원 및 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이 당화되거나 해독후 변형될 수 있다.

본 발명에 따라, 가용성 사람 HE4a 항원 폴리펩타이드(또는 HE4a 폴리펩타이드)가 대상체 또는 생물학적 공급원 기원의 생물학적 샘플중에서 검출될 수 있다. 생물학적 샘플은 혈액 샘플, 생검 표본, 조직 이식물, 기관 배양물, 생물학적 유체 또는 임의의 기타 조직 또는 대상체 또는 생물학적 공급원 기원의 세포 제제를 수득함에 의해 제공될 수 있다. 대상체 또는 생물학적 공급원은 사람이거나 사람외 동물, 1차 세포 배양물 또는 염색체에 통합되거나 에피좀 재조합 핵산 서열을 함유할 수 있는 유전학적으로 조작된 세포주, 불멸화 세포주 또는 불멸화 가능한 세포주, 체세포 하이브리드 세포주, 분화 또는 분화 가능한 세포주 및 형질전환된 세포주등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 배양 적응된 세포주일 수 있다. 본 발명의 특정 바람직한 양태에서, 대상체 또는 생물학적 공급원은 악성종양 증상을 갖는 것으로 의심되거나 이의 위험성이 있는 것일 수 있고 특정 추가의 바람직한 양태에서 난소 암종과 같은 난소암일 수 있고 본 발명의 특정 또 다른 바람직한 양태에서, 대상체 또는 생물학적 공급원은 당해 질환의 위험성이나 이러한 질환이 없는 것으로 공지된 것일 수 있다.

특정 바람직한 양태에서, 생물학적 샘플은 대상체 또는 생물학적 공급원 기원의 하나 이상의 세포를 포함하고 특정 또 다른 바람직한 양태에서, 생물학적 샘플은 가용성 사람 메소텔린 관련 항원 폴리펩타이드를 함유하는 생물학적 유체이다. 생물학적 유체는 전형적으로 생리학적 온도에서 액체이고 대상체 또는 생물학적 공급원내에 존재하거나 이로부터 유도되거나 이로부터 발현되거나 추출된 천연적으로 존재하는 유체Ⅱ를 포함할 수 있다. 특정 생물학적 유체는 특정 조직, 기관 또는 국소화된 영역으로부터 유래하고 특정 또 다른 생물학적 유체는 대상체 또는 생물학적 공급원에 보다 폭괄적으로 전신적으로 위치할 수 있다. 생물학적 유체의 예는 혈액, 혈청 및 장막 유체, 혈장, 림프, 뇨, 뇌척수 유체, 침액, 분비 조직 및 기관의 점막 분비물, 질 분비물, 비고형 종양과 관련된 것과 같은 복수 유체, 늑막 유체, 심막, 복강, 복부 및 기타 체강의 유체등을 포함한다. 생물학적 유체는 또한 대상체 또는 생물학적 공급원, 예를 들어, 세포 및 세포 또는 기관 조건화된 배지를 포함하는 기관 배양 배지 및 폐포 유체등과 접촉되는 액체 용액을 포함할 수 있다. 특정 고도로 바람직한 양태에서, 생물학적 샘플은 혈청이고 특정 또 다른 고도로 바람직한 양태에서, 생물학적 샘플은 혈장이다. 기타 바람직한 양태에서, 생물학적 샘플은 무세포 액체 용액이다.

특정 또 다른 바람직한 양태에서, 생물학적 샘플은 온전한 세포를 포함할 수 있고 특정 또 다른 바람직한 양태에서, 생물학적 샘플은 서열 11 또는 13에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 항원 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 세포 추출물을 포함한다.

샘플내 '가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자'란 가용성 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 아미노산 또는 이의 유도체, 지질, 지방산등, 또는 이의 유도체, 탄수화물, 사카라이드등 또는 이의 유도체, 핵산, 뉴클레오타이드, 뉴클레오사이드, 퓨린, 피리미딘 또는 관련 분자 또는 이의 유도체, 또는 이의 임의의 배합물, 예를 들어, 당단백질, 당지질, 당단백질, 지단백질 또는 본원에 제공된 바와 같은 생물학적 샘플의 가용성 또는 무세포 성분인 임의의 또 다른 생물학적 분자일 수 있다. '가용성 형태의 천연적으로 존재하는 분자'는 추가로 용액내에 있거나 생물학적 샘플내에 존재하는 분자를 언급하고 본원에 제공된 바와 같은 생물학적 유체를 포함하고 온전한 세포 표면에 결합되어 있지 않다. 예를 들어, 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자는 용질, 거대분자 복합체의 성분, 세포로부터 유출되거나 분비되거나 방출되는 물질, 콜로이드, 미세입자 또는 나노입자 또는 기타 미세 현탁액 입자등을 포함하지만 이에 제한될 필요는 없다.

대상체내 악성종양 증상의 존재는 예를 들어, 신생물, 종양, 비접촉 억제되지 않거나 발암성으로 형질전환된 세포등을 포함하는, 대상체내에 이형성, 암 및/또는 형질전환된 세포가 존재가 존재함을 언급한다. 비제한적인 예시를 통해, 본 발명에서는 악성종양 증상은 상승된 수준의 HE4a 항원 폴리펩타이드가 대상체 기원의 생물학적 샘플에서 검출가능할 정도로 HE4a 항원 폴리펩타이드(또는 HE4a 폴리 펩타이드)를 분비하거나 유출하거나, 방출하거나 배출시킬 수 있는 암 세포의 대상체가 존재함을 추가로 언급한다. 바람직한 양태에서, 예를 들어, 당해 암 세포는 암 세포와 같은

악성 상피 세포이고, 특히 바람직한 양태에서, 당해 암 세포는 악성 중피종 세포이고 이것은 예를 들어, 내층 흉막, 심막, 복막, 복수 및 체강에 발견되는 편평 세포 상피 또는 중피 세포의 형질전환된 변이체이다.

본 발명의 가장 바람직한 양태에서, 종양 세포(이의 존재는 악성종양 증상이 존재함을 의미한다)는 난소 암 세포이고 원발성 및 전이성 난소 암 세포를 포함한다. 악성종양을 난소 암으로서 분류하기 위한 기준은 본원에 참조문헌으로 인용된 문헌[침조: Bell et al., 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136; Meier et al., 1997 Anticancer Res. 17(4B):3019; Meier et al. 1997 Anticancer Res. 17(4B):2949; Cioffi et al., 1997 Tumori 83:594]에서 원발성 및 전이성 종양 기원의 사람 난소 암 세포주(예를 들어, OVCAR-3, Amer. Type Culture Collection, Manassas, VA; Yuan et al., 1997 Gynecol. Oncol. 66:378)를 확립하고 특징화되어 있어 널리 공지되어 있다. 기타 양태에서, 악성종양 증상은 중피종, 췌장암, 비소형 세포 폐암 또는 기타 형태 암일 수 있고 이것은 편평 세포암 및 선암종을 포함하고 또한 육종 및 혈액 악성 종양(예를 들어, 백혈병, 임파종, 골수종등)을 포함한다. 이들 및 기타 악성종양 증상의 분류는 본 발명에 익숙한 당업자에게 공지되어 있고 본 발명은 과도한 실험 없이 당해 악성종양 증상에서 HE4a 폴리펩타이드의 존재 유무를 측정하는 방법을 제공한다.

본원에 제공된 바와 같이, 대상체내 악성종양 증상의 존재에 대한 스크리닝 방법은 HE4a 항원 폴리펩타이드 또는 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 항체를 사용함을 특징으로 한다.

HE4a 항원 폴리펩타이드(또는 HE4a 폴리펩타이드)에 대해 특이적인 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항혈청으로서 용이하게 제조되거나, 당해 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 목적하는 특성을 갖도록 고안된 유전학적으로 조작된 면역글로불린(Ig)으로서 제조될 수 있다. 예를 들어, 비제한적인 예시로서, 항체는 재조합 IgG, 면역글로불린 유도 서열을 갖는 키메라 융합 단백질 또는 '사람화된' 항체[문헌참조: 본원에 참조문헌으로서 인용되는 미국 특허 제5,693,762호, 제5,585,089호 제4,816,567호, 제5,225,539호, 제5,530,101호]를 포함할 수 있고 이 모두는 본 발명에 따른 사람 HE4a 폴리펩타이드를 검출하는데 사용될 수 있다. 당해 항체는 본원에 제공된 비와 같이 제조될 수 있고 하기된 바와 같은 HE4a 폴리펩타이드로의 면역화를 포함한다. 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같이, HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열이 기재되어 있고 당업자는 면역원으로서 사용하기 위해 당해 폴리펩타이드들을 통상적으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 하기에 상세하게 기술되는 2H5, 3D8 및 4H4와 같은 모노클로날 항체를 사용하여 본 발명에 따른 특정 방법을 수행할 수 있다.

용어 '항체'는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, $F(ab')_2$ 및 Fab 단편과 같은 이의 단편 뿐만 아니라 HE4a 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 분자인 임의의 천연적으로 존재하거나 재조합적으로 제조되는 결합 파트너를 포함한다. 항체는 이들이 약 $10^{4}\ M^{-1}$ 이상, 바람직하게는 약 $10^{5}\ M^{-1}$ 이상, 보다 바람직하게는 약 $10^{6}\ M^{-1}$ 이상 및 여전히 보다 바람직하게는 약 $10^{7}\ M^{-1}$ 이상의 Ka로 결하하는 경우, '면역특이적' 또는 특이적으로 결합한다고 정의된다. 결합 파트너 또는 항체의 친화성은 예를 들어, 문헌[참조: Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660(1949)]에 기재된 통상적인 기술을 사용하여 용이하게 측정될 수 있다. HE4a 폴리펩타이드의 결합 파트너로서 기타 단백질의 측정은, 기타 반백질 또는 폴리펩타이드와 특이적으로 상호작용하는 단백질을 동정하고 수득하기 위한 다수의 공지된 방법, 예르 들어, 문헌[참조: 미국 특허 제5,283,173호 및 미국 특허 제5,468,614호]에 기재된 효모 2 하이브리드 스크리닝 시스템 또는 이와 동등한 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명은 또한 HE4a 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 결합 파트너 및 항체를 제조하기 위한 HE4a 폴리펩타이드의 용도 및 HE4a 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 기본으로하는 펩타이드의 용도를 포함한다.

항체는 일반적으로 당업자에게 공지된 다양한 기술중 하나로 제조될 수 있다[문헌참조: Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1998]. 당해 기술에서, HE4a 폴리펩타이드를 포함하는 면역원, 예를 들어, 세포의 표면상에 HE4a 폴리펩타이드를 갖는 세포 또는 분리된 HE4a 폴리펩타이드는 바람직하게 하나 이상의 부스터 면역화를 도입하는 미리 정해진 스케줄에 따라 적합한 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 래빗, 양 및 염소)에게 주사되고 동물로부터 주기적으로 혈액을 채취한다. HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 폴리 클로날 항체는 이어서 당해 항혈청으로부터, 예를 들어, 적합한 폴리펩타이드가 적합한 고형 지지체상에 커플링되어 있는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있다.

HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 변이체에 특이적인 모노클로날 항체는 예를 들어, 코흘러 및 밀스테인(Kohler and Milstein)의 기술(1976 Eur. J. Immunol. 6:511-519) 및 이의 개선된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 간략하게 이들 방법은 목적하는 특이성(즉, 목적하는 중피종 폴리펩타이드와의 반응성)을 갖는 항체를 제조할 수 있는 불멸의 세포주의 제조를 포함한다. 당해 세포주는 예를 들어, 상기된 바와 같이 면역화된 동물로부터 수득된다. 비장 세포는 이어서 예를 들어, 골수종 세포 융합 파트너, 바람직하게는 면역화된 동물과 동일계인 골수종 세포와 융합시켜 불멸화된다. 예를 들어, 비장 세포 및 골수종 세포는 몇분 동안 폴리에틸렌 글리콜 또는 비이온성 세제와 같은 막 융합 촉진제로 처리하여 융합될 수 있고 이어서 하이브리드 세포의 성장을 지지하지만 골수종 세포의 성장은 지지하지 않는 선택 배지상에 저밀도로 도말한다. 바람직한 선별 기술은 HAT(하이포산틴, 아미노프테린, 티미딘) 선별을 사용하는 것이다. 충분한 시간 후에, 약 1 내지 2주 후에, 하이브리드의 콜로니가 관찰된다. 단일 콜로니를 선별하고 폴리펩타이드에 대한 결합 활성에 대해 시험한다. 높은 반응성 및 특이성을 갖는 하이브리도마가 바람직하다. 본 발명은 HE4a 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마를 포함한다.

모노클로날 항체는 성장하는 하이브리도마 콜로니의 상등액으로부터 분리될 수 있다. 추가로, 하이브리도마 세포주의 적합한 척추 동물 숙주(예를 들어, 마우스)의 복강에 주사함을 포함하는 다양한 기술을 사용하여 수율을 증진시킬 수 있다. 모노클로날 항체는 이어서 복수 유체 또는 혈액으로부터 수거될 수 있다. 오염물은 크로마토그래피, 겔 여과, 침전 및 추출법과 같은 통상적인 기술에 의해 항체로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, 항체는 표준 기술을 사용하여 고정화된 단백질 G 또는 단백질 A상에서 크로마토그래피하여 정제될 수 있다.

특정 양태내에서, 항체의 항원 결합 단편의 사용이 바람직하다. 당해 단편은 표준 기술(예를 들어, 파파인으로 분해시켜 Fab 및 Fc 단편을 제조함)을 사용하여 제조될 수 있는 Fab 단편을 포함한다. Fab 및 Fc 단편은 표준 기술을 사용하여 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 고정화된 단백질 A 컬럼상에서)를 사용하여 분리될 수 있고 문헌[참조: Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston]을 참조한다.

다양한 효능인자 단백질을 암호화하는 서열의 프레임내에 연결된 DNA 서열에 의해 암호화된 면역글로불린 V-영역 도메인에 의한 미리 선택된 항원에 대한 특이적 결합 친화성을 갖는 다기능성 융합 단백질이 예를 들어, 문헌[참조: EP-B1-0318554, 미국 특허 제5,132,405호, 미국 특허 제5,091,513호 및 미국 특허 제5,476,786호]에 기재된 바와 같이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 당해 효능인자 단백질은, 비오틴 모사체 서열(문헌참조: Luo et al., 1998 J. Biotechnol. 65:225; 본원에 인용된 문헌), 검출가능한 표지 잔기로 직접 공유적 변형, 특이적 표지된 리포터 분자에 대한 비공유 결합, 고형상 지지체상에서 검출가능한 기질 또 는 고정화(공유 결합 또는 비공유 결합)의 효소적 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업자에게 친숙한 다양한 기술을 사용하여, 융합 단백질의 결합을 검출하는데 사용될 수 있는 폴리펩타이드 도메인을 포함한다.

본 발명에 사용하기 위한 단일쇄 항체는 또한 파이지 디스플레이(문헌참조: 미국 특허 제5,223,409호; Schlebusch et al., 1997 Hybridoma 16:47; 및 본원에 인용된 문헌)와 같은 방법에 의해 생성될 수 있고 선택될 수 있다. 간략하게, 당해 방법에서, DNA 서열은 필라멘트형 파아지, 예를 들어, M13의 유전자 III 또는 유전자 VIII 유전자에 삽입된다. 다중클로닝 부위를 갖는 몇몇 벡터가 삽입용으로 개발되었다[문헌참조: McLafferty et al., Gene 128:29-36, 1993; Scott and Smith, Science 249:386-390, 1990; Smith and Scott, Methods Enzymol. 217:228-257, 1993]. 삽입된 DNA 서열은 무작위로 제조될 수 있거나 HE4a 폴리펩타이드에 결합하는 공지된 결합 도메인의 변이체일 수 있다. 단일쇄 항체는 당해 방법을 사용하여 용이하게 제조될 수 있다. 일반적으로, 삽입체는 6 내지 20개의 아미노산을 암호화하고 있다. 삽입된 서열에 의해 암호화된 펩타이드는 박테리오파아지의 표면상에 나타난다. HE4a 폴리펩타이드에 대한 결합 도메인을 발현하는 박테리오파아지는 고정화된 HE4a 폴리펩타이드, 예를 들어, 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 제조된 재조합 폴리펩타이드 및 본원에 기재된 바와 같은 핵산 암호화 서열에 결합함에 의해 선별된다. 비결합 파아지는 세척에 의해 제거되고 세척액은 전형적으로 염의 부재 또는 저염 농도로 10mM 트리스, 1mM EDTA를 함유한다. 결합 파아지는 염 함유 완충액으로 용출시킨다. NaCl 농도는 모든 파아지가 용출될때까지 단계적인 방식으로 증가시킨다. 전형적으로 친화성이 높은 파아지 결합은 고염 농도에 의해 파괴된다. 용출된 파아지는 세균 숙주에서 증식시킨다. 추가로 선별하여 고친화성으로 결합되는 파아지를 선별한다. 이어서 결합 파아지내 삽입체의 DNA 서열을 결정한다. 결합 펩타이드의 예상되는 아미노산 서열이 공지된다면, HE4a 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체로서 본원에 사용하기에 충분한 펩타이드가 재조합 수단 또는 합성적으로 제조될 수 있다. 항체가 융합 단백질로서 제조되는 경우 재조합 수단을 사용한다. 펩타이드는 또한 반복 정렬된 2개 이상의 유사하거나 유사하지않은 펩타이드로서 제조될 수 있어 친화성 또는 결합을 최대화한다.

HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 항체와 반응하는 항원 결정인자를 검출하기 위해, 검출 시약은 전형적으로 본원에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 샘플내 폴리펩타이드를 검출하기 위해 항체를 사용하는 당업자에게 공지된 다양한 분석 포맷이 있고 효소 결합된 면역흡착 분석(ELISA), 방사선면역분석(RIA), 면역형광측정, 면역침전법, 평형 투석, 면역확산 및 기타 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는다[문헌참조: Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston]. 예를 들어, 분석은 웨스턴 블롯 포맷으로 수행할 수 있고 이때 생물학적 샘플 기원의 단백질 제제는 겔 전기영동에 적용되고 적합한 막으로 이동시키고 항체 반응하도록 방치된다. 막상의 항체의 존재는 이어서 당해 기술 분야 및 하기에 기재된 바와 같이 널리 공지된 적합한 검출 시약을 사용하여 검출될 수 있다.

또 다른 양태에서, 분석법은 표적 HE4a 폴리펩타이드에 결합시키고 이를 샘플의 잔여물로부터 제거하기 위해, 고형 지지체상에 고정화된 항체의 사용을 포함한다. 결합된 HE4a 폴리펩타이드는 이어서 명백한 HE4a 폴리펩타이드 항원 결정인자와 반응하는 제2항체, 예를 들어, 검출가능한 리포터 잔기를 함유하는 시약을 사용하여 검출할 수 있다. 비제한적인 예로서, 당해 양태에 따라, 명백한 항원 결정인자를 인지하는 고정화된 항체 및 제2 항체는 모노클로날 항체 2H5, 3D8 및 4H4로부터 선택되는 본원에 기재된 2개의 모노클로날 항체일 수 있다. 또한, 경쟁 분석을 사용할 수 있고 이때, HE4a 폴리펩타이드는 검출가능한 리포터 잔기로 표지되고 고정화된 항체를 샘플과 항온처리 한 후, 고정화된 HE4a 폴리펩타이드 특이적 항체에 결합하도록 방치한다. 샘플의 성분이 표지된 폴리펩타이드의 항체로의 결합을 억제하는 정도가 고정화된 항체와 샘플의 반응성을 지적하는 것이 결과로서 샘플내 HE4a의 수준을 지적하는 것이다.

고형 지지체는 항체가 부착되어 있는 당업자에게 공지된 물질일 수 있고 예를 들어, 미세역가 플레이트내의 시험 웰, 니트로셀룰로스 필터 또는 또 다른 적합한 막일 수 있다. 또한 지지체는 비드 또는 디스크, 예를 들어, 유리, 섬유, 라텍스 또는 폴리스티렌 또는 폴리비닐클로라이드와 같은 플라스틱일 수 있다. 항체는 당업자에게 공지된 다양한 기술을 사용하여 고형 지지체상에 고정화될 수 있고 이것은 특허 및 과학 문헌에 상세하게 기재되어 있다.

특정 바람직한 양태에서, 샘플내에서 HE4a 항원 폴리펩타이드의 검출 분석법 은 2-항체 샌드위치 분석법이다. 당해 분석은 먼저 고형 지지체, 통상적으로 미세역가 플레이트의 웰상에 고정화된 HE4a 폴리펩타이드 특이적 항체(예를 들어, 모노클로날 항체, 예를 들어, 2H5, 3D8 또는 4H4)를 생물학적 샘플과 접촉시켜, 샘플내에 천연적으로 존재하고 항체와 반응하는 항원 결정인자를 갖는 가용성 분자를 고정화된 항체와 결합하도록 방치시킴으로써(예를 들어, 실온에서 30분 항온처리 시간이면 일반적으로 충분하다) 항원 항체 복합체 또는 면역 복합체를 형성함에 의해 수행될 수 있다. 샘플의 미결합 성분을 이어서 고정화된 면역 복합체로부터 제거한다. 다음에, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제2항체를 첨가하고 이때 제2 항체의 항원 결합 부위는 HE4a 폴리펩타이드에 대한 고정화된 제1 항체의 항원 결합 부위의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는다(예를 들어, 2H5, 3D8 또는 4H4와 같은 모노클로날 항체는 고형 지지체상에 고정화된 모노클로날 항체와 동일하지 않다). 제2 항체는 본원에 기재된 바와 같이 검출가능하게 표지되어 직접 검출될 수 있다. 또한, 제2 항체는 검출가능하게 표지된 제2(또는 '제2 단계') 항항체를 사용하거나 본원에 제공된 바와 같은 특이적 검출 시약을 사용하여 간접적으로 검출될 수 있다. 본 발명의 방법은, 면역분석법에 친숙한 당업자가 2 항체 샌드위치 면역분석법에서 특정 항원(예를 들어, 메소텔린 폴리펩타이드)을 면역학적으로 검출하기 위한 수많은 시약 및 형태가 존재함을 인지하기때문에 임의의 특정 검출 방법으로 제한되지 않는다.

상기된 바와 같은 2 항체 샌드위치 분석법을 사용한 본 발명의 특정 바람직한 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제1 고정화된 항체는 폴리클로날 항체이고 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제2 항체는 폴리클로날 항체이다. 본 발명의 특정 또 다른 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제1 고정화된 항체는 모노클로날 항체이고 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제2 항체는 폴리클로날 항체이다. 본 발명의 특정 또 다른 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제1 고정화된 항체는 폴리클로날 항체이고 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제2 항체는 모노클로날 항체이다. 본 발명의 특정 또 다른 고도로 바람직한 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제1 고정화된 항체는 모노클로날 항체이고 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제2 항체는 모노클로날 항체이다. 예를 들어, 이들 양태에서, 본원에 제공되는 바와 같은 모노클로날 항체 2H5, 3D8 및 4H4는 HE4a 폴리펩타이드상에서 유일한 비경쟁적 항원 결정인자(예를 들어, 에피토프)를 인지하여 이들 모노클로날 항체의 쌍 결합이 사용될 수 있음을 주지해야만 한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 양태에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제1 고정화된 항체 및/또는 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제2 항체는 당해 기술 분야 및 본원에 언급된 공지된 종류의 항체, 예를 들어, 비제한적인 예로서, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 면역글로불린 V-영역 융합 단백질 또는 단일쇄 항체일 수 있다. 당해 기술분야에 친숙한 당업자는 본 발명이 본원에 기재되고 청구된 방법에서 기타 항체 형태, 단편 및 유도체등의 사용을 포함한다는 것을 인지할 것이다.

특히 바람직한 특정 양태에서, 제2 항체는 효소, 염료, 방사선핵종, 발광 그 룹, 형광 그룹 또는 비오틴등과 같은 검출가능한 리포터 잔기 또는 표지를 함유할 수 있다. 고형 지지체에 결합되어 있는 제2 항체의 양은 이어서 특이적 검출가능한 리포터 잔기 또는 표지에 적합한 방법을 사용하여 측정된다. 반응성 그룹에 대해, 섬광 계수 또는 자가방사선사진 방법이 일반적으로 적당하다. 항체 효소 접합체는 다양한 커플링 기술을 사용하여 제조될 수 있다[문헌참조: Scouten, W.H., Methods in Enzymology 135:30-65, 1987]. 분광학적 방법을 사용하여 염료(예를 들어, 효소 반응의 비색 제품), 발광 그룹 및 형광 그룹을 검출할 수 있다. 비오틴은 상이한 리포터 그룹(통상적으로 방사선 활성 또는 형광성 그룹 또는 효소) 아비딘 또는 스트렙트아비딘을 사용하여 검출될 수 있다. 효소 리포터 그룹은 일반적으로 기질을 첨가하고 이어서 분광계 또는 분광측정계 또는 반응 생성물의 기타 분석법으로 검출할 수 있다(일반적으로 특정 시간동안). 표준물 및 표준물 첨가를 사용하고 널리 공지된 기술을 사용하여 샘플내 메소텔린 폴리펩타이드의 수준을 측정할 수 있다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 생물학적 공급원 또는 대상체 기원의 생물학적 샘플내에서 면역학적으로 반응성인 항체를 검출함에 의해 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하기 위한 본원에 제공된 바와 같은 HE4a 항원 폴리펩타이드의 용도를 포함한다. 당해 양태에 따라, HE4a 항원 폴리펩타이드(또는 본원에 제공된 바와 같은 절단된 HE4a 항원 폴리펩타이드를 포함하는 단편 또는 이의 변이체)는 검출가능하게 표지시키고 생물학적 샘플과 접촉시켜 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 항체의 HE4a 항원 폴리펩타이드의 결합을 검출할 수 있음을 . 예를 들어, HE4a 항원 폴리펩타이드는 용이하게 검출가능한(예를 들어, 방사선활성적으로 표지된)아미노산의 시험관내 해독동안에 혼입되는 바와 같은 널리 공지된 방법과 연계되어 기재된 서열을 사용하거나 상기된 바와 같은 기타 검출가능한 리포터 잔기를 사용함에 의해 생합성적으로 표지될 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 본 발명의 당해 양태는, 본원에 기재된 HE4a 융합 폴리펩타이드와 같은 특정 HE4a 폴리펩타이드가 특히 면역원성이어서 특이적이고 검출가능한 항체를 생성하는 펩타이드를 제공할 수 있음을 고려한다. 예를 들어, 당해 이론에 따라, 특정 HE4a 융합 폴리펩타이드는 아비드 면역 반응을 유도하는 '비자가' 항원일 수 있고 융합 도메인이 부재인 HE4a 폴리펩타이드는 체액성 또는 세포 매개 면역을 용이하게 유도하지 않는 '자가' 항원과 보다 유사한 것으로서 면역 시스템에 의해 확인될 수 있다.

상기된 바와 같이, 본 발명은 특정 암을 갖는 대상체에서 상기 가용성 HE4a 폴리펩타이드가 상승된 수준임을 포함하는, HE4a 항원 폴리펩타이드의 가용성 형태가 대상체내에 천연적으로 존재한다는 일부 놀라운 발견에 관한 것이다.

본 발명에 따른 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법은 추가로 대상체 기원의 생물학적 샘플중에 하나 이상의 종양 관련 마커의 검출에 의해 추가로 개선될 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 본 발명은 천연적으로 존재하는 가용성 샘플 성분과 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 항체와의 반응성을 검출하는 것 뿐만 아니라 또한 당해 기술 분야에 공지되고 본원에 제공된 바와 같은 확립된 방법을 사용하여 악성종양 증상의 하나 이상의 추가의 가용성 마커의 검출을 포함하는 스크리닝 방법을 제공한다. 상기된 바와 같이, 용이하게 수득된 생물학적 유체 샘플 내에서 검출가능한 다수의 가용성 종양 관련 항원이 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정 양태는 사람 메토텔린 폴리펩타이드에 관한 것이고 이것은 문헌[참조: Scholler et al.(1991 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:11531)]에 기재되고 또한 미국 특허원 제09/513,597호에 기재된 신규 가용성 메소텔린 관련 항원(MRA) 폴리펩타이드와 같은 폴리펩타이드를 포함한다.

본원에 제공된 바와 같이, '메소텔린 폴리펩타이드'는 하기 서열 14의 펩타이드를 포함하는 아미노산 서열을 갖고:

EVEKTACPSGKKAREIDES 서열 14

추가로, MAb K-1[문헌참조: Chang et al., 1996 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:136; MAb K-1은 제조원(Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA)로부터 시판됨] 또는 미국 특허원 제09/513,597호에 기재된 바와 같은 모노클로날 항체 OV569, 4H3, 3G3 또는 1A6의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하는 항원 결합 부위를 갖는 하나 이상의 항체와 반응성인 하나 이상의 항원 결정인자를 갖는 가용성 폴리펩타이드이다.

따라서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 이들 추가의 가용성 종양 관련 항원은 메소텔린 및 메소텔린 관련 항원, CEA, CA125, 시알릴 TN, SCC, TPS 및 PLAP를 포함하지만 이에 제한될 필요는 없고[문헌참조: Bast et al., 1983 N. Eng. J. Med. 309: 883; Lloyd et al., 1997 Int. J. Canc. 71: 842; Sarandakou et al., 1997 Acta Oncol. 36: 755; Sarandakou et al., 1998 Eur. J. Gynaecol Oncol. 19: 73; Meier et al. , 1997 Anticanc. Res. 17 (4B): 2945; Kudoh et al., 1999 Gynecol. Obstet. Invest. 47: 52; Ind et al. , 1997 Br. J Obstet. Gynaecol. 104: 1024; Bell et al. 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105: 1136; Cioffi et al. , 1997 Tumori 83: 594; Meier et al. 1997 Anticanc. Res. 17 (4B): 2949; Meier et al. , 1997 Anticanc. Res. 17 (4B): 3019)] 추가로 임의의 공지된 마커를 포함할 수 있고 생물학적 샘플내에 이의 존재는 본원에 제공된 바와 같은 하나 이상의 악성종양 증상이 존재한다는 것과 관련지을 수 있다.

또한, HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 표준 하이브리드화 및/또는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기술을 사용하여 검출될 수 있다. 적합한 프로브 및 프라이머는 본원에 제공된 바와 같은 HE4a cDNA 서열을 기준으로 당업자에 의해 고안될 수 있다. 분석법은 일반적으로 진핵 세포, 세균, 바이러스, 당해 유기체로부터 제조된 추출물 및 생존 유기체내에서 발견되는 유체와 같은 생물학적 공급원으로부터 수득된 다양한 샘플중 어느 하나를 사용하여 수행할 수 있다.

하기의 실시예는 예시를 위해 제공되고 이에 제한되지 않는다.

실시예

실시예 1

사람 샘플에서 HE4a 발현의 실시간 PCR 검출

158개의 사람 조직 생검 또는 생검으로부터의 RNA 샘플은 기관[the institutional review boards of the University of Washington, Swedish Hospital and Fred Hutchinson Cancer Research Center, all of Seattle, Washington]에 의해 승인된 과정에 따라 수득한다. 정상 조직(부신, 골수, 뇌, 결장, 자궁내막, 위, 심장, 신장, 간, 폐, 유선, 골격 근육, 자궁근층, 말초 신경, 말초 혈액 임파구 제제, 침샘, 피부, 소장, 척추, 비장, 기관, 흉선, 자궁, 말초 혈액 임파구 배양물 및 40개의 정상적인 난소) 기원의 샘플, 양성 난소 병변(13개의 장액성 낭선암종) 기원의 샘플, 경계성 악종 종양의 2개의 난소 종양 기원의 샘플, 3개의 I단계의 점액성 난소 암, 3개의 I단계의 점액성 난소 암, 37개의 III 단계의 점액성 난소 암, 7개의 IV 단계의 점액성 난소 암 기원의 샘플, 전이 난소암 기원의 6개의 조직 샘플 및 난소암을 갖는 여성 기원의 2개의 관이 포함된다. 모든 조직 샘플은 치료 전 여성으로부터 수득되고 각 종양의 일부는 즉시 액체 질소에 넣고 나머지 표본은 통상적으로 조직검사한다. 조직병리학적 조사시 80% 이상의 종양 세포로 이루어진 것으로 밝혀졌고 괴사가 없는 샘플들만이 하이브리드화 및 실시간 PCR 실험을 위해 사용한다. 잔소 표면 상피 배양물 기원의 RNA[OSE, 기관(B. Karlan, Cedars Sinai Hospital, Los Angeles, CA)로 부터 수득됨] 및 3개의 추가의 OSE 샘플[기관(R. Hernandez, University of Washington, Seattle, WA)으로부터 수득됨]이 또한 포함된다. 하기와 기재된

바와 같은 HE4a를 포함하는 151개의 샘플(94개의 비악성 조직 및 57개의 암)은 목적하는 유전자의 과발현을 확인하기 위한 실시간 정량 PCR을 위해 보관한다.

실시간 정량 PCR은 하기와 같이 수행한다. HE4 실시간 PCR 프라이머는,

AGCAGAGAAGACTGGCGTGT(정방향)(서열 15) 및

GAAAGGGAGAAGCTGTGGTCA(역방향)(서열 16)이다.

이들 프라이머는 427 bp 길이의 PCR 생성물을 생성한다. 총 RNA는, 제조업 자에 의해 명시된 바와 같이 올리고-dT 프라이머 및 슈퍼스크립트 II 역 전사효소(Life Technologies, Inc., Bethesda, MD)를 사용하여 역전사시킨다. 실시간 정량 PCR은 ABI7700 기계(PE Bioshstems, Foster City, CA) 및 SYBR-그린 프로토콜을 사용하여 수행한다. 2배 연속으로 희석된 백혈구 cDNA 제제의 5개의 복제물을, 이전의 실험에서 정상 및 악성 조직에서 광범위하게 발현되는 것으로 입증된 표준물(S31iii125)을 증폭시키기 위한 주형으로서 사용한다[문헌참조: Schmmer et al., 1999 Gene 1999].

진뱅크(GenBank) 승인 번호: U61734, 정방향 프라이머: GACGCTTCTTCAAGGCCAA, 서열 17 및 역방향 프라이머: ATGGAAGCCCAAGCTGCTGA 서열 18.

네가티브 대조군은 효소 없이 역전사된 난소암 기원의 총 RNA 및 임의의 주형없이 PCR이 모든 성분을 함유하는 하나의 웰로 이루어진다. 모든 실험은 2회 수행한다. 각각의 실험물은 인공 밴드를 제거하기 위해, 단일 PCR 밴드가 존재하는지 아가로스 겔 상에서 분석한다. 각각의 96웰 플레이트에 대한 결과는 PCR 기기의 제조업자에 의해 제공되는 소프트웨어(서열 검출기 ™)를 사용하여 분석한다. 당해 분석은 표준물과 상대적인 목적하는 핵산 서열(HE4a)의 발현 수준을 측정할 수 있게 한다.

도 1에 나타낸 바와 같은 발현 수치는 내부 표준물과 상대적인 임의의 단위로 도시하고 측정 표준 단위체에서 절대량의 mRNA 분자를 나타내지 않는다. 평균 HE4a 발현 수준과 이들 수치의 기타 공지된 유전자(고도로 발현된 유전자로서의 명백한 베타 액틴)의 수치와 비교한 결과를 토대로, 도 1은 HE4a를 암호화하는 전사체가 중간 이상의 높은 상대적 수준으로 발현됨을 보여준다.

실시예 2

HE4a를 암화화하는 핵산 서열의 클로닝 및 발현

<u>고효율 HE4a cDNA 클론으로부터 HE4a 융합 작제물 cDNA의 증폭:</u> 문헌[참조: Kirchoff et al., (1991)]에 최초 공개된 바와 같은 HE4(서열 8)에 대한 cDNA 서열은 진뱅크 승인 번호 # X63187로 기탁되었고 본원에 기재된 바와 같은 HE4a(서열 10)을 암호화하는 cDNA를 클로닝하기 위한, 올리고뉴클레오타이드 프라이머 고안을 위한 바탕을 제공한다. 고효율 cDNA 정렬을 사용하여 상이하게 발현되는 유전자 생성물로서 동정되고 분리된 HE4a에 대한 cDNA는 840개의 염기쌍 단편으로서 pSPORT에 클로닝한다. 당해 cDNA는 PCR 반응에서 주형으로서 사용하여 당해 실시예에서 기술된 바와 같은 합성 융합 단백질 유전자를 제조하는데 적합한 형태로 HE4a를 증폭시킨다.

HE4 암호화 서열(서열 8)의 일부는 추정 분비 시그날 펩타이드를 암호화하는 것으로 밝혀졌고 따라서, 당해 고유 리더 펩타이드는 초기 작제물에 사용하여 가능한한 분자 구조의 상당부분을 보존시킨다. 추가로, HE4a는 상대적으로 소형이고 당해 서열은 막관통 도메인 또는 세포질 표적화 서열과 같은 예외적인 구조적 특징을 함유하고 있지 않기때문에, 융합 단백질은 사람 IgG1 Fc 도메인에 융합된 완전 한 HE4a 유전자 생성물이 도입되도록 고안한다. 프라이머는 클로닝을 위한 적당한 제한 부위를 암호화하고 최종 작제물을 위한 단백질 도메인의 필요한 프레임내 융합물을 형성시키도록 고안한다. 5' 프라이머(서열 1 또는 HE4-5')는 HindIII 부위, 첫번째 ATG에 인접한 발현을 개선시키는 Kozak 서열 및 이전에 공개된 HE4 서열을 기준으로 하는 HE4a 리더 펩타이드의 일부를 포함하는 39량체이다. 3' 프라이머(서열 2 또는 HE4-3'-1)는 3' 말단이 종료 코돈 바로 앞에서 절단된 HE4 암호화 서열이고 사람 -Ig 꼬리 cDNA로의 융합을 위한 프레임내 BamHI 부위를 포함하는 36량체이다. PCR 증폭 반응은 50pmol의 이들 2개의 프라이머 및 주형으로서 1ng의 HE4/pSPORT 플라스미드를 사용하여 수행한다. 50개의 미세역가 반응은 또한 2.5 단위(0.5ml)의 ExTaq DNA 폴리머라제(TaKaRa Shuzo Biomedical, Otsu, Japan), 희석된 완충액 및 팩키지 삽입 방향에 따른 뉴클레오타이드를 포함한다. 반응물은 30회 증폭시키고 증폭 프로필은 94°C에서 30초, 60°C에서 30초 및 72°C에서 30초로이루어진다. 전장 HE4에 대한 예상된 크기(약 400 염기쌍)를 갖는 PCR 생성물을 수득한다.

이들 단편은 제한 분해되고 정제되며 이미 사람 IgG1 삽입체를 함유하는 적절하게 분해된 포유동물 발현 플라스미드에 연결시킨다. 연결 생성물로 DH5α세균 세포를 형질전환시키고 HE4-hIgG1 융합 유전자 삽입체가 존재하는지 형질전환체를 스크리닝한다. 몇몇 분리체 기원의 플라스미드 DNA는 이어서 ABI 프리즘 310(PE Biosystems) 서열 분

석기상에서 BigDye 종결인자 사이클 서열분석 키트를 사용하여 서열분석한다. 추가로, 이들 분리체 기원의 플라스미드 DNA는 또한 문헌[참조: Hayden et al., 1994 Ther. Immunol. 1:3]에 기재된 바와 같은 COS7 세포의 DEAE-덱스트란 일시 형질감염에 의해 형질감염시킨다. 배양 상등액을 72시간 후 수거하고 단백질 A-아가로스, 환원 SDS-PAGE 전기영동 및 웨스턴 블롯팅으로 면역침전시킴에 의해 스크리닝한다(도 2). 웨스턴 블롯은 염소 항 사람 IgG 접합체를 사용하여 1:5000에서 탐침하고 ECL 현상시킨다.

서열 분석 결과는 수득한 서열(서열 10) 및 추정된 아미노산 서열(서열 11)이 공개된 HE4 암호화 서열(서열 8) 및 해독된 서열(서열 9)이 몇몇 위치에서 상이하다는 것을 지적한다. 따라서, 서열은 또한 정상적인 사람 부고환 및 몇몇 종양 세포주로부터 유래하는 cDNA로부터 수득하고 원발성 종양 RNA 및 서열 10에 제시된 바와 같은 HE4a 암호화 서열 및 서열 11에 제시된 바와 같은 추론된 암호화된 아미노산 서열을 확인한다.

종양 세포주 기원의 클로닝 HE4 cDNA: 제조업자의 지침에 따라 Trizol(Life Technologies, Gaithersburg, MD)을 사용하여, 4007 및 OVCAR3(문헌참조: Hellstrom et al., 2001 Canc. Res. 61:2420)을 포함하는 몇몇 난소 종양 세포로부터 제조한다. 제조업자의 지침에 따라 1 내지 3㎍의 RNA, 무작위 6량체 및 슈퍼스크립트 II 역전사효소(Life Technologies)를 사용하여 cDNA를 제조한다. 1㎍의 cDNA, 2.5 단위체(0.5ml)의 ExTaq DNA 폴리머라제(TaKaRa Shuzo Biomedical, Otsu, Shiga, Japan), 희석된 완충액 및 삽입체 방향에 따른 뉴클레오타이드 및 HE4-5' 및 HE4-3'-1 특이적 프라이머를 함유하는 50㎕의 반응물중에서 무작위 프라임된 cDNA로부터 HE4 cDNA를 PCR 증폭시킨다. 반응물을 30회 증폭시키고, 증폭 프로필 은 94℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 30초이다. 종양 유래된 cDNA로부터 HE4의 PCR 증폭을 위해 HE4-5' 및 HE4-3'-1 올리고뉴클레오타이드를 사용한다. 완전한 길이의 HE4에 대한 예상된 크기의 PCR 생성물을 수득하고 단편을, 서열 분석을 위해, pT-AdvanTAge 벡터(Clontech, Palo Alto, CA)에 클로닝한다. 삽입체를 갖는 클론을 상기된 바와 같이 서열분석하고 종양 RNA 샘플 기원의 PCR 단편이 상기된 바와 같은 최초 클론과 동일한 HE4a 서열을 암호화하는 것으로 밝혀졌고 이들 HE4a 서열은 공개된 HE4의 서열(문헌참조: Kirchhoff et al., 1991)과는 상이하다. 유사하게, HE4a 암호화 서열을 정상적인 부고환(서열 10) 및 원발성 종양 조직 cDNA(서열 12)로부터 수득하고 이어서 상기된 바와 같은 새로운 HE4a 서열과 매칭시켜 본 결과 키르초프(1991)등의 HE4 서열(서열 8)과 상이하였다.

HE4Ig 융합 단백질의 제조. HE4-hIgG1 cDNA 작제물(서열 7)을 HindIII-XbaI 단편으로서 이전에 기재된 바와 같은 pCDNA 3의 유도체인 포유동물 발현 벡터 pD18의 다중 클로닝 부위에 삽입한다[문헌참조: Hayden et al., 1996 Tissue Antigens 48:242]. 처음에, 작제물을 상기된 바와 같이 DEAE-덱스트란 일시 형질감염으로 형질감염시킨다[문헌참조: Hayden et al., 1994 Ther. Immunol. 1:3]. 몇몇 분리체 기원의 플라스미드 DNA를 제조하고 순간적으로 COS7 세포를 형질감염시키는데 사용한다. 배양 상등액을 72시간 후에 수거하고 단백질 A-아가로스, 환원 SDS-PAGE 전기영동 및 웨스턴 블롯팅으로 면역침전시켜 스크리닝한다(도 2).

CHO-DG44 세포[문헌참조: Urlaub et al. 1986 Somat. Cell. Mol. Genet. 12:55]를 사용하여 고수준의 목적하는 융합 단백질을 발현하는 안정적인 세포주를 작제한다. pD18 벡터(문헌참조: Hayden et al., 1996 Tissue Antigens 48: 242; Barsoum, 1990 DNA Cell Biol. 9:293]내에서 높은 카피수로 전기천공함에 의해 및 재조합 인슐린(Life Technologies, Gaithersburg, MD), 나트륨 피루베이트(Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 글루타민(Irvine Scientific), MEM에 대한 2X 비필수 아미노산(Irvine Scientific) 및 100nM 메토트렉세이트(Sigma, St. Louis, MO)를 함유하는 엑셀 302 CHO 배지(JRH Biosciences, Denver, PA)내에서의 희석 제한에 의해 메토트렉세이트 내성 클론을 선별함에 의해 HE4Ig를 발현하는 안정한 CHO 세포주를 작제한다. 내성 클론 기원의 배양 상등액을 이어서 IgG 샌드위치 ELISA로 분석하여 고생산 세포주를 스크리닝한다. 상등액을 대량의 배양물로부터 수거하고 HE4Ig를, 2ml의 단백질 A-아가로스(Repligen, Cambridge, MA) 칼럼에 대해 단백질 A 친화성 크로마토그래피하여 정제한다. 융합 단백질을 0.1M 시트레이트 완충액(pH 2.7)중에서 0.8ml의 분획물로서 칼럼으로부터 용출시키고 1M 트리스 염기 100㎕를 사용하여 중화시킨다. 용출된 분획물을 280nm의 흡광도로 분석하고 융합 단백질을 함유하는 분획물을 모으고, 몇 리터의 PBS(pH 7.4)중에서 밤새 투석하고 0.2㎛의 주사기 필터 단위(Millipore, Bedford, MA)에 통과시켜 필터 멸균시킨다.

안정한 형질감염체를 사용하여 BALB/c 마우스의 면역화를 위해 충분한 단백질을 제조한다. 처음에 마우스의 복강내로 4주 간격으로 정제된 HE4-hIgG1 융합 단백질 10㎍을 주사한다. 1차 주사 후 및 당해 면역화 프로토콜에 다른 2회의 부스트 후, 마우스에 이어서 비장 수거 전에 2회 이상의 부스트동안 10㎍의 단백질 + TiterMax 골드 보조제 IP 및 SC를 주사한다. 하이브리도마는 면역화된 마우스 기원의 비장 세포를 골수 파트너 P3-X63-Ag8-653과 융합시켜 제조한다.

HE4Ig 융합 단백질의 웨스턴 분석. 단백질 샘플을 10% 트리스/비스 NOVEX 겔(Invitrogen, San Diego CA)상에서 SDS-PAGE 전기영동하여 분리하고 반건조 블롯팅으로 PVDF 막(Millipore)상에 전이시킨다. 4℃에서 밤새, PBS/0.25% NP-40 또는 TBS-T(50mM 트리스 HCl, pH 7.6, 0.15M NaCl 및 0.05% 트윈-20)중의 5% 비지방 건조 밀크(Carnation)중에서 항온처리함에 의해 막을 차단하여 비특이적 항체 결합을 예방한다. 실온 또는 4℃에서 약한 교반과 함께 TBS-T중에서 1시간동안 막을 HRP-염소 항 사람 IgG(1/10,000) 또는 HRP-스트렙트아비딘(1:5000)(Caltag)으로 항온처리한다. TBST를 사용한 2회의 세정 및 4회의 세척 후, 막을 60초동안 ECL ™ (Amersham, Little Chal

font, UK) 시약중에 항온처리하고 밴드를 가시화하기 위해 자가방사선 필름에 노출시킨다(도 2). 융합 단백질 샘플을 배양 상등액 또는 정제된 샘플로부터 수거하고 50㎕의 단백질 A 아가로스(Repligen, Cambridge, MA)를 사용하여 단백질 A를 침전시킨다. 면역 침전물을 세척하고 SDS-PAGE 환원 샘플 로딩 완충액중에 재현탁시킴에 이어서 비등시키고 10% 트리스/비스 NOVEX 겔(Invirtrogen, San Diego CA)상에서 SDS-PAGE 전기영동에 으로 분리하고 반건조 블롯팅하여 PVDF 막(Millipore) 상으로 이동시킨다. 4℃에서 1시간 내지 밤새, PBS/0.25% NP-40 또는 TBS-T(50mM 트리스 HCl, pH 7.6, 0.15M NaCl 및 0.05% 트윈-20)중의 5% 비지방 건조 밀크(Carnation)중에서 항온처리함에 의해 막을 차단하여 비특이적 항체 결합을 예방한다. 막을 HRP-염소 항 사람 IgG(1/10,000)으로 항온처리하고 TBS-T로 세척하고 60초동안 ECL ™ (Amersham, Little Chalfont, UK) 시약에 노출시킨다. 이어서 ECL 블롯을, 밴드를 가시화하기 위해 자가방사선 필름에 노출시킨다. 도2에서 레인 1은 CLA4-hIgG1 형질감염된 COS7 세포의 상등액 기원의 면역침전된 샘플을 함유하고 레인 3 및 4는 HE4-hIgG1 융합 단백질 배양 상등액을 함유하고 레인 5는 위조 형질감염된 COS 상등액을 함유한다. HE4-hIgG1 융합 단백질은 환원 겔상에서 또는 웨스턴 블롯상에서 겉보기 분자량이 약 48kDa이고 추정된 아미노산 서열을 기초로 예상된 39kDa보다 크게 나타나는데 이는 분자가 당화되었음을 시사한다.

HE4-mIgG2a 융합 단백질의 작제 및 발현: HE4-hIgG1 융합 유전자에 대한 유사한 작제물을 또한 제조하지만 쥐-IgG2a 도메인을 사람 IgG Fc 단편으로 대체한다. 또 다른 꼬리를 사용하여 마우스의 면역화가 사람 Ig 꼬리 융합 도메인의 면역원성에 의해 영향받지 않도록 한다. mIgG2a 꼬리의 cDNA 클론을 상기된 바와 같이 기재된 HE4a 클론에 대해 프레임으로부터 이탈시켜 -mIgG2a 카세트를 당해 플라스미드로부터 재증폭시켜 프레임내 융합 도메인을 형성시킨다. 사용되는 정방향, 센스 프라이머는 mIgG2aBAMIF로서 명명되는 5'-gttgtcggatccgagcccagagggcccacaatcaag-3' (서열 19)인 반면에, 역방향 안티센스 프라이머는 mIgG2a3'Xba + S로서 명명되는 5'-gttgtttctagattatcatttacccggagtccgggagaagctc-3' (서열 20)이다.

사용되는 주형은 쥐 IgG2a Fc 도메인에 융합된 쥐의 CTLA4를 함유하지만 융합 접합 지점의 제한 부위는 코돈 공간에 대해 프레임 외부에 존재한다. 새로운 올리고뉴클레오타이드는 프레임 전이를 유발하고 BamHI 부위에서 판독 프레임이 변화됨으로써 HE4와의 융합 유전자는 온전한 HE4-mIgG2a 융합 단백질을 발현시킨다. PCR 생물을 증폭시키고 서브클로닝하고 사람 융합 유전자에 대해 기술된 바와 같이 가공한다. 분자를 pD18 포유동물 발현 벡터에 서브클로닝시키고 안정한 CHO 클론이 생성되며 융합 단백질이 HE4 사람 IgG1 융합 단백질에 대해 상기 기재된 바와 같이 발현된다.

실시예 3

HE4a에 특이적인 모노클로날 항체

항-HE4a Mab의 제조. 초기 실험에서, 몇몇 BALB/c 마우스를 상기된 바와 같이 보조제의 존재 및 부재하에 제조된 HE4a-hIgG 융합 단백질로 면역화시킨다. 높은 항체 역가가 이들 마우스에서 나타나지만 동등하게 높은 역가가 hIgG 꼬리(CTLA4-hIG 융합)를 갖는 대조군 융합 단백질에 대해서 나타나기 때문에 항체는 HE4a에 특이적이지 않다. 따라서, HE4a-mIgG 융합 단백질을 면역화를 위해 사용한다. 도 3은 제조업자의 지침에 따라, 꼬리 피하내에 주사하여, HE4a-mIgG + 보조제(TiterMax ®, CytRx Corp., Norcross, GA)로 각각 2회 면역화시킨 2마리의 BALB/c 마우스(1605 및 1734)중에 HE4a에 대한 높은 역가의 항체를 유도하는 2개의 면역화에 대한 결과를 도시한다. HE4a-특이적 하이브리도마는 고역가의 HE4a 특이적 항체를 나타내는 마우스 기원의 비장 세포를 사용하는 표준 방법으로 제조한다. 도 4는 마우스 1605(이의 혈청 데이타는 도 3에 나타낸다) 기원의 비장 세포를 사용하여 제조된 하이브리드마에 대한 ELISA에 의한 초기 시험을 나타낸다. 3개의 웰은 HE4a-hIg에 대해 높은 반응성을 나타낸다. 이어서, 3개의 하이브리도마 2H5, 3D8 및 4H4는, 희석 제한에 의해 클로닝 후 당해 웰로부터 분리한다. 하이브리도마 2H5 및 3D8은 경쟁 분석에 따라 상이한 에피토프를 동정하는 것으로 밝혀졌다.

종양 진단을 위한 ELISA의 구성 및 적용. 이중 결정인자('샌드위치') ELISA는, 상기 언급된 2개의 MAb 2H5 및 3D8을 사용한 혈청내 및 기타 유체내에서 메소텔린/MPF 및 관련 항원을 측정하는 ELISA를 구성하는데 사용되는 것과 동일한 방법[문헌참조: Scholler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11531, 1999]을 사용하여 구성한다. 도 5는 DMEM 배양 배지내에서 희석된 HE4a-hIgG를 사용하여 작성된 표준 곡선의 예를 보여준다. 당해 도에서 예시된 바와 같이, 시그날은, HE4a-hIgG의 1ng 수준에서 검출된다. 도 5는 또한 난소암 세포주(4007)로부터 희석되지 않은 배양 배지는 검출가능한 시그날을 부여함을 보여준다. 도 6은 난소암으로 진단된 환자 기원의 복수 유체(OV50으로서 지정됨)는 가장 높은 희석 배수(1:1280)에서도 여전히 검출가능한 HE4a 항원을 함유함을 보여준다.

초기 HE4a ELISA는 사용되는 항체 최적량을 설정하여 개선되었다. 이들 항체중 하나인 2H5는 비오티닐화하고 기타 항체, 3D8은 이것이 시험 플레이트 바닥에 결합되도록 하여 고정화시킨다. 분석을 위한 2개의 모노클로날 항체에 대한 각각 의 투여량은 2.5 및 100μg/ml이다. 방금 주지한 바와 같이 상이한 Mab 및 상이한 양의 Mab가 사용되는 것을 제외하고는, 분석 방법은 메소텔린/MPF 및 관련 분자에 대해 기술된 방법과 동일하다[문헌참조: Scholler et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11531].

난소암을 갖는 환자 및 다양한 대조군 기원의 혈청 예비 시험은 HE4a 단백질이 초기 질환을 갖는 환자를 포함하는, 난소암을 갖는 환자의 상당 부분이 상승되었지만 기준선이 매우 낮은 대조군 혈청에서는 상승되지 않았음을 지적한다. 상기된 샌드위치 ELISA 분석법 및 약 기관[Swedish Hospital, Seattle, WA]으로부터 지원된 400명 환자 기원의 코드된 혈청 샘플을 사용한 연구에서, 난소암으로 진단된 환자 기원의 모든 샘플이, 어떠한 거짓 포지티브가 없을 것으로 예상되는 HE4a ELISA에 의해 포지티브로서 스코어되었다. 따라서, 이론에 얽매이지 않고 혈청 및 기타 체액내 HE4a 단백질에 대한 분석법이 난소암(예를 들어, CA125)에 대한 현존하는 진단 분석법 보다 임상적으로 유리한 부분을 제공할 수 있는 것으로 간주된다. 추가로, ELISA가 지금까지, 난소암의 진단을 보조하는 능력에 관해서 조사되었지만 HE4a 암호화된 항원을 과발현하는 임의의 종양에 동일하게 적용될 수 있어야만 한다. 동일한 ELISA 또는 이의 변법이 또한, 추가의 연구를 동정하는 경우, HE4 관련 분자의 연구를 위해 적용될 수 있어야만 한다.

세포 표면에서 HE4 단백질의 발현. 네가티브 대조군으로서 B 세포주와 함께 난소암 세포주를 사용하는, 유동 세포측정기로 측정된 연구는 HE4a 암호화된 항원이 몇몇 난소암중에서 세포 표면에 발현됨을 보여주었다. 사용되는 세포주 및 사 용되는 유동 세포측정 기술은 이전에 기재되었다[문헌참조: Hellstrom et al., 2001 Cancer Res. 61, 2420]. 예를 들어, OVCAR 3 세포의 93%는 포지티브하고 세포의 71%가 난소암 세포주 4010으로부터 기원하는 것이고 세포의 38%가 난소암 세포주 HE50OV로부터 기원하는 것이며, 세포의 20% 미만이 시험된 또 다른 10개의 난소암 세포주로부터 포지티브하다. 이것은, 세포 표면에서 HE4a 항원이 비제한적인 이론에 따라, HE4a 특이적 항체 매개되고/되거나 HE4a 특이적 T 세포 매개 치료와 같은 면역치료학적 방법을 위한 표적물을 제공할 수 있다.

실시예 4

예방학적 및 치료학적 백신 표적화 HE4a 에피토프

특정 종양(특히, 악성 난소 종양)에서 HE4a 암호화 핵산 서열의 증폭 및/또는 HE4a 과발현의 검출은 상기된 바와 같은 조성물 및 방법을 사용하여 수행하고 HE4a 발현 수준은 정상 조직에서의 발현 수준과 비교한다. 종양에서 HE4a 특이적 모노클로날 항체 한정된 에피토프의 증가는 암 치료에서 유용성을 갖는 예방 백신을 위한 표적으로서 사용되는 HE4a 에피토프에 대한 동정을 제공하고 당해 백신은 또한 수정(특정 양태에서, Slp-1과 같은 4개의 디설파이드 코어 계열의 구성원에 의한 프로테아제 억제를 위한 공지된 분석법을 사용하여 HE4a 프로테아제 억제 또는 프로테아제 증진 활성을 입증함으로써 반영될 수 있다)을 유용하게 변화(예를 들어, 적합한 대조군에 대한 통계학적 유의적 방식에서의 증가 또는 감소)시킨다. 백신을 제조하기 위한 다양한 방법이 많은 보고서[문헌참조: by Hellstrom and Hellstrom, In Handbook in Experimental Pharmacology, vol. 'Vaccines', Springer, Heidelberg, p. 463, 1999]에서 동정되었고 기재되어 있다. 이들은 단백질, 융합 단백질 및 펩타이드, DNA 플라스미드, 재조합 바이러스, 항-이디오타입의 항체, 시험관내 펩타이드 에피토프가 펄스된 수상돌기 세포 및 항-이디오타입 항체의 용도를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 당해 백신은 단독으로 또는 보조제 및/또는 림포킨, 예를 들어, GMCSF와 배합하여 사용할 수 있다. 비제한적인 이론에 따라, T 세포는 세포 표면상에 MHC 분자에 제공되는 에피토프를 인지하지만 순환하는 항원 또는 면역 복합체에는 반응하지 않기때문에, 상기된 바와 같은 순환하는 가용성 HE4a 단백질의 검출은 T 세포 매개 면역을 유도하는 백신의 사용을 방해할 것으로 예상되지 않는다.

이전에 기술된 내용으로부터, 본 발명의 특정 양태가 단지 예시할 목으로 본원에 기재된 것이지만 다양한 변형이 본 발명의 취지 및 범위에서 벗어나지 않고 가해질 수 있다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구항을 제외하고는 제한되지 않는다.

본 명세서에서, '포함한다'는 '함유한다 또는 이루어진다'를 의미하고 '포함하는'는 함유하는 또는 이루어지는'을 의미한다.

이전의 기재된 내용 또는 하기의 청구항 또는 특정 형태로 표현된 또는 기재된 기능을 수행하기 위한 수단 관점에서 표현된 첨부된 도면에 기재된 특징은, 별도로 또는 당해 특징과 임의로 배합하여 이의 다양한 형태의 본 발명을 실현하기 위해 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

항체의 항원성 결정 인자로의 결합을 검출하는 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안, 생물학적 샘플중에, 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하고 하나 이상의 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 분자의 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체와 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 2.
항체의 항원성 결정 인자로의 결합을 검출하는 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안, 생물학적 샘플중에 하나 이상의 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 세포 표면 분자의 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체와 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 3.
제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈액, 혈청, 장막 유체, 혈장, 림프, 뇨, 뇌척수 유체, 침액, 점막 분비물, 질 분비물, 복수 유체, 흉막 유체, 심 막 유체, 복막 유체, 복부 유체, 배양 배지, 조건화된 배양 배지 및 세척 유체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 4.
제1항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈청인 방법.

청구항 5.
제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈장인 방법.

청구항 6.
제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 복수 유체 및 흉막 유체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 7.
제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 질 분비물인 방법.

청구항 8.
제1항 또는 제2항에 있어서, HE4a 항원이 서열 11에 제시된 서열을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함하는 방법.

청구항 9.
제8항에 있어서, HE4a 항원 폴리펩타이드가 스플라이스 변이체인 방법.

청구항 10.
제1항 또는 제2항에 있어서, HE4a 항원이 서열 5에 제시된 서열을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함하는 방법.

청구항 11.
제10항에 있어서, HE4a 항원 폴리펩타이드가 스플라이스 변이체인 방법.

청구항 12.
제1항 또는 제2항에 있어서, HE4 항원 폴리펩타이드가 HE4a 항원 변이체 또는 이의 단편 또는 유도체인 방법.

청구항 13.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 폴리클로날 항체를 포함하는 방법.

청구항 14.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 친화성 정제된 항체를 포함하는 방법.

청구항 15.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체를 포함하는 방법.

청구항 16.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 재조합 항체를 포함하는 방법.

청구항 17.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 키메릭 항체를 포함하는 방법.

청구항 18.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 사람화된 항체를 포함하는 방법.

청구항 19.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 단일쇄 항체를 포함하는 방법.

청구항 20.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체의 항원 결정인자로의 결합에 대한 검출이 방사선핵종의 검출을 포함하는 방법.

청구항 21.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체의 항원 결정인자로의 결합에 대한 검출이 형광단의 검출을 포함하는 방법.

청구항 22.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체의 항원 결정인자로의 결합에 대한 검출이 아비딘 분자와 비오틴 분자간의 결합 반응에 대한 검출을 포함하는 방법.

청구항 23.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체의 항원 결정인자로의 결합에 대한 검출이 스트렙트아비딘 분자와 비오틴 분자간의 결합 반응에 대한 검출을 포함하는 방법.

청구항 24.
제1항 또는 제2항에 있어서, 항체의 항원 결정인자로의 결합에 대한 검출이 효소 반응의 생성물에 대한 화학양론적 검출을 포함하는 방법.

청구항 25.
제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 항체가 검출가능하게 표지되는 방법.

청구항 26.
제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 항체가 검출가능하게 표지되지 않고 항체의 항원 결정인자로의 결합에 대한 검출이 간접적인 방법.

청구항 27.
제1항에 있어서, 악성종양 증상이 선암종, 중피종, 난소암, 췌장암 및 비소형 세포 폐암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 28.
항원성 결정인자에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 2H5, 3D8 또는 4H4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 모노클로날 항체의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하는 항원 결합 부위인, 하나 이상의 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 세포를 포함한다)내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플과 하나 이상의 항체를 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 29.
항원성 결정인자에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 모노클로날 항체 3D8의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하는 항원 결합 부위인, 당해 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 세포를 포함한다)내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플과 하나 이상의 항체를 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 30.

항원성 결정인자에 대한 하나 이상의 항체(여기서, 하나 이상의 항체는 HE4a 항원에 면역특이적으로 결합한다)의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 항체와 반응성인 항원 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 세포를 포함한다)내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플과 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체를 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 31.
제30항에 있어서, , HE4a 항원이 또한 3D8, 2H5 또는 4H4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 모노클로날 항체에 면역특이적으로 반응하는 방법.

청구항 32.
항원성 결정인자에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 2H5 및 4H4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 모노클로날 항체의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하는 항원 결합부위인, 하나 이상의 항체(여기 서, 하나 이상의 항체는 면역특이적으로 HE4a 항원에 결합한다)와 반응하는 항원성 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 생물학적 샘플(여기서, 샘플은 대상체 기원의 세포를 포함한다)내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플과 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체를 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 33.
제32항에 있어서, HE4 항원이 또한 모노클로날 항체 3D8에 면역특이적으로 반응하는 방법.

청구항 34.
하나 이상의 고정화된 제1 항체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합시켜 면역 복합체를 형성하기 위한 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안, 샘플내에 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자의 생물학적 샘플내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 고정화된 제1 항체와 접촉시키는 단계,

하나 이상의 고정화된 제1 항체에 특이적으로 결합하지 않는 샘플의 성분을 제거하는 단계,

하나 이상의 제2 항체의 HE4a 항원 폴리펩타이드로의 특이적 결합을 검출하 는 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 면역 복합체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 제2 항체(여기서, 하나 이상의 제2 항체의 항원 결합 부위는 하나 이상의 고정화된 제1 항체의 항원 결합 부위를 경쟁적으로 억제하지 않는다)와 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 35.
하나 이상의 고정화된 제1 항체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합시켜 면역 복합체를 형성하기 위한 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안, 샘플내에 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자의 생물학적 샘플내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 고정화된 제1 항체(여기서, 하나 이상의 제1 항체의 항원 결합 부위는 모노클로날 항체 3D8의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제한다)와 접촉시키는 단계,

하나 이상의 고정화된 제1 항체에 특이적으로 결합하지 않는 샘플의 성분을 제거하는 단계,

하나 이상의 제2 항체의 HE4a 항원 폴리펩타이드로의 특이적 결합을 검출하는 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 면역 복합체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 제2 항체(여기서, 하나 이상의 제2 항체의 항원 결합 부위는 모노클로날 항체 2H5의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는다)와 접촉시 키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법.

청구항 36.
하나 이상의 고정화된 제1 항체를 메소텔린 관련 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합시켜 면역 복합체를 형성하기 위한 조건 및 이를 위한 충분한 시간동안 샘플내에 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자의 생물학적 샘플내 존재 유무를 결정하기 위해, 대상체 기원의 생물학적 샘플을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 고정화된 제1 항체(여기서, 하나 이상의 제1 항체의 항원 결합 부위는 모노클로날 항체 3D8의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제한다)와 접촉시키는 단계,

하나 이상의 고정화된 제1 항체에 특이적으로 결합하지 않는 샘플의 성분을 제거하는 단계,

하나 이상의 제2 항체의 HE4a 항원 폴리펩타이드로의 특이적 결합을 검출하는 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 면역 복합체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 제2 항체(여기서, 하나 이상의 제2 항체의 항원 결합 부위는 모노클로날 항체 4H4의 면역특이적 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는다)와 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 37.
제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 메소텔린 관련 항원, 태아성암 항원, CA125, 시알릴 TN, 편평 세포 암 항원, 조직 폴리펩타이드 항원 및 태반 알칼린 포스파타제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 악성종양 증상의 하나 이상의 가용성 마커의 샘플내 존재 유무를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 38.
항체의 항원 결정인자로의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 하나 이상의 항체와 반응하는 항원 결정인자를 갖는 분자로서, (i) 샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 분자 및 (ii) 세포 표면 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자의 제1 및 제2 생물학적 샘플(여기서, 제1 및 제2 생물학적 샘플은 각각 제1 및 제2 대상체 기원의 세포를 포함한다) 각각에서의 존재 유무를 결정하기 위해, (i) 악성종양 증상을 갖는 것으로 의심되는 제1 대상체 기원의 제1 생물학적 샘플 및 (ii) 악성종양 증상이 없는 것으로 공지된 제2 대상체 기원의 제2 생물학적 샘플 각각을 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 하나 이상의 항체와 접촉시키는 단계,

제1 생물학적 샘플내 항체의 항원 결정인자로의 검출가능한 결합 수준과 제2 생물학적 샘플내 항체의 항원 결정인자로의 검출가능한 결합 수준과 비교하는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 39.
생물학적 샘플내에서 HE4a 항원 폴리펩타이드에 면역특이적으로 결합하는 항체의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재 유무를 스크리닝하는 방법.

청구항 40.
제39항에 있어서, HE4a 항원 폴리펩타이드가 서열 5, 7, 11 및 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 방법.

청구항 41.
서열 5, 7, 11 및 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 면역글로불린 가변 영역을 포함하는, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 항체.

청구항 42.
제41항에 있어서, 융합 단백질인 항체.

청구항 43.
제41항에 있어서, 단일쇄인 항체.

청구항 44.
제41항에 있어서, HE4a 항원 폴리펩타이드가 당화된 항체.

청구항 45.

제41항에 있어서,

(i) 서열 11에 제시된 HE4a 항원 폴리펩타이드 서열에 특이적으로 결합하지 만 서열 9에 제시된 폴리펩타이드 서열에 특이적으로 결합하지 않는 항체 및

(ii) 서열 9에 제시된 폴리펩타이드 서열 및 서열 11에 제시된 HE4a 폴리펩타이드 서열 둘다에 특이적으로 결합하는 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항체.

청구항 46.
제41항에 있어서, 모노클로날 항체 2H5, 3D8 또는 4H4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항체.

청구항 47.
샘플내 가용성 형태로 천연적으로 존재하는 항체의 HE4a 폴리펩타이드로의 결합을 검출하기 위한 조건 및 이를 위해 충분한 시간동안, 대상체 기원의 생물학적 샘플을 검출가능하게 표지된 HE4a 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계 및

이로부터 악성종양 증상의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체내 악성종양 증상의 존재를 스크리닝하는 방법.

청구항 48.
(a) 서열 5, 서열 7, 서열 11 및 서열 13에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 HE4a 항원 폴리펩타이드 및 하나 이상의 융합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및

(b) 중간정도의 엄중 조건하에서 (a)의 핵산 분자와 하이브리드화할 수 있고 HE4a 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분리된 핵산 분자로서, 서열 9에 제시된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산 분자 가 아님을 특징으로 하는, 분리된 핵산 분자.

청구항 49.
제48항에 따른 핵산 분자와 상보적인 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 50.
융합 도메인에 융합된 HE4a 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질.

청구항 51.
제50항에 있어서, 융합 도메인이 면역글로불린 또는 이의 변이체 또는 단편인 융합 단백질.

청구항 52.
제50항에 있어서, HE4a 폴리펩타이드에 융합된 폴리펩타이드 서열이 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 융합 단백질.

청구항 53.
제50항에 있어서, 폴리펩타이드 서열이 리간드에 대한 친화성을 갖는 친화성 태그 폴리펩타이드인 융합 단백질.

청구항 54.
제48항에 따른 핵산에 작동적으로 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함하는 재조합 발현 작제물.

청구항 55.
제54항에 있어서, 프로모터가 조절성 프로모터인 발현 작제물.

청구항 56.
제54항에 있어서, HE4a 폴리펩타이드가 제2 핵산 서열의 폴리펩타이드 생성물과의 융합 단백질로서 발현되는 발현 작제물.

청구항 57.
제56항에 있어서, 제2 핵산 서열의 폴리펩타이드 생성물이 면역글로불린 불변 영역인 발현 작제물.

청구항 58.

제54항에 있어서, 재조합 바이러스 발현 작제물.

청구항 59.
제54항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 재조합 발현 작제물을 포함하는 숙주 세포.

청구항 60.
제59항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

청구항 61.
제59항에 있어서, 진핵 세포인 숙주 세포.

청구항 62.
제48항에 따른 핵산 서열에 작동적으로 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함하는 재조합 발현 작제물을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 재조합 HE4a 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 63.
제62항에 있어서, 프로모터가 조절성 프로모터인 방법.

청구항 64.
제58항에 따른 재조합 바이러스 발현 작제물로 감염된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 재조합 HE4a 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 65.
(a) 제49항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드와, 서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 샘플과 접촉시키는 단계 및

(b) 샘플내에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 하이브리드화하는 HE4a 폴리펩타이드 암호화 핵산의 양을 검출하여 샘플중의 HE4a 발현을 검출하는 단계를 포함하는, 샘플중의 HE4a 발현을 검출하는 방법.

청구항 66.
제65항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 하이브리드화하는 HE4a 폴리펩타이드 암호화 핵산의 양이 폴리머라제 쇄 반응에 의해 측정되는 방법.

청구항 67.
제65항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 HE4a 폴리펩타이드 암호화 핵산의 양이 하이브리드화 분석법에 의해 측정되는 방법.

청구항 68.
제65항에 있어서, 샘플이 RNA 또는 cDNA 제제를 포함하는 방법.

청구항 69.
서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 면역글로불린 가변 영역을 포함하고 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 항체를 포함하는 조성물을, 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는, 악성종양 증상의 치료 방법.

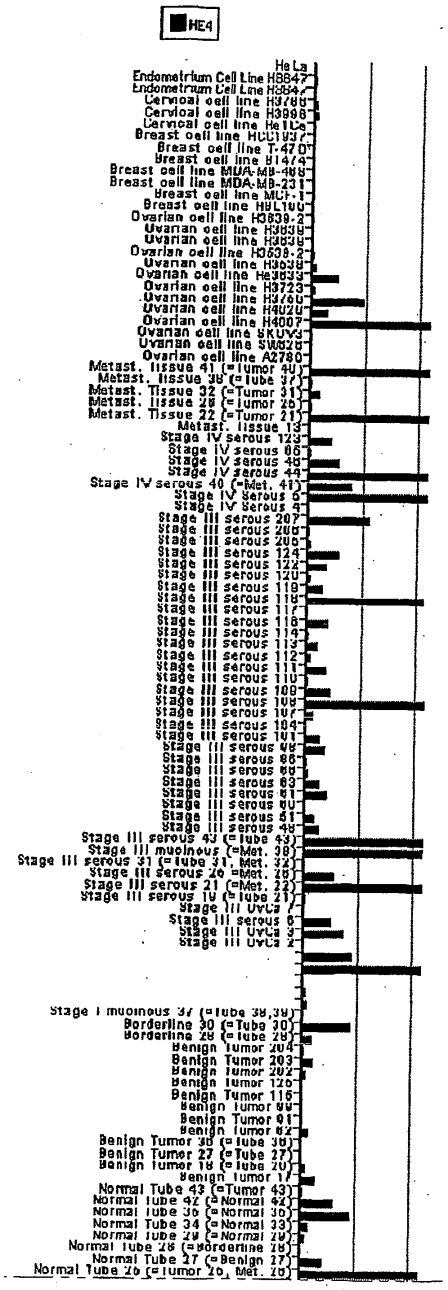
청구항 70.
서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 조성물을, 이를 필요로하는 환자에게 투여함을 포함하는, 악성종양 증상의 치료 방법.

청구항 71.
제70항에 있어서, 조성물이, 환자에게서, 서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 생산을 유도하는 방법.

청구항 72.
제70항에 있어서, 조성물이, 환자에게서, 서열 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 HE4a 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 특이적으로 인지할 수 있는 T 임파구를 유도하는 방법.

도면

도면1A



자궁내막 세포주(Endometricum cell line)

유방 세포주(Breast cell line)

난소 세포주(Ovarian cell line)

전이 조직(Metast. Tissue)

IV 단계 장액(Stage IV serous)

III 단계 장액(Stage III serous)

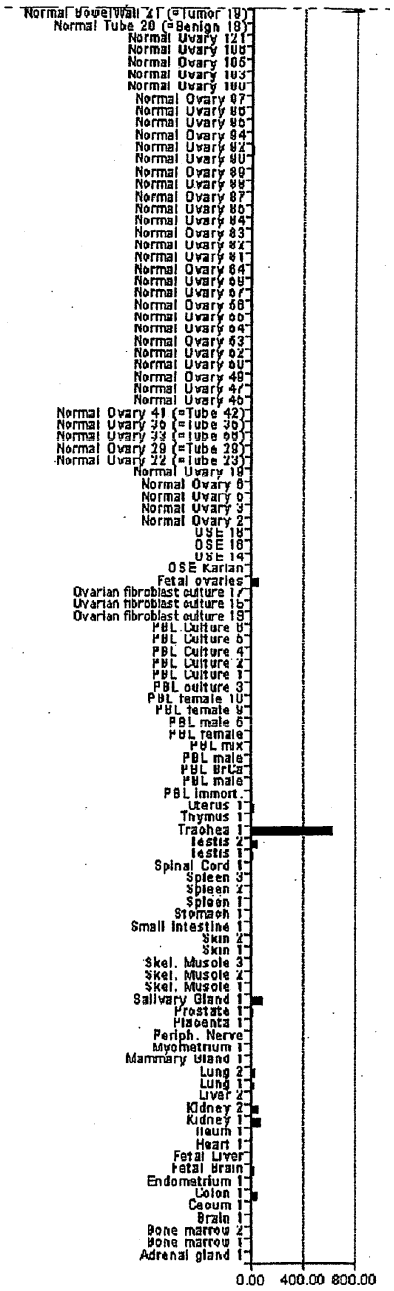
경계선(Borderline)

정상 관(Normal tube)

양성 종양(Benign tumor)

경부 세포주(Cervical cell line)

도면1B



정상 난소(Normal Ovarian)

태아 난소(Fetal Ovarian)

난소 섬유아세포 배양물(Ovarian fibroblast culture)

암컷(female)

수컷(male)

척추(Spinal Cord)

자궁(Uterus)

흉선(Thymus)

비장(Spleen)

피부(Skin)

위(Stomach)

침선(Salivary gland)

전립선(Prostate)

간(Liver)

신장(Kidney)

골수(Bone marrow)

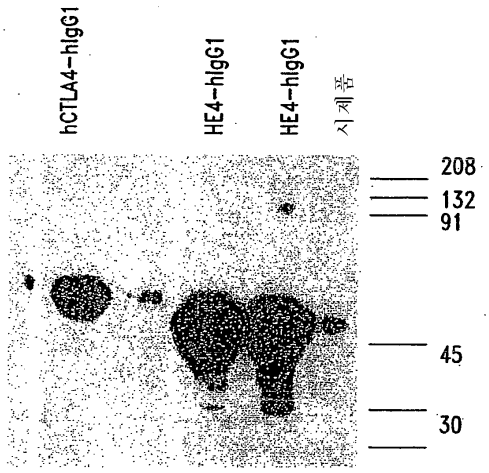
유선(Mammary gland)

뇌(brain)

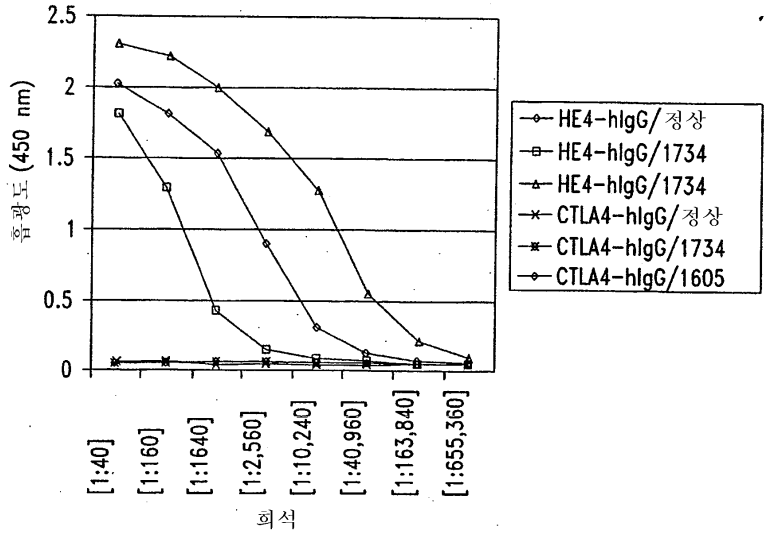
결장(colon)

부신(Adrenal gland)

도면2



도면3



도면4

플레이트 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.181	0.130	0.192	0.140	0.159	0.135	0.130	0.164	0.139	0.108	0.142	0.138
B	0.160	0.129	0.133	0.144	0.144	0.121	0.136	0.130	0.131	0.120	0.138	0.150
C	0.147	0.146	0.130	0.158	0.135	0.142	0.139	0.121	0.130	0.113	0.118	0.146
D	0.200	0.141	0.145	0.158	0.149	0.114	0.165	0.148	0.129	0.140	0.130	0.167
E	0.175	0.130	0.143	0.111	0.132	0.129	0.140	0.143	0.126	0.134	0.139	0.172
F	0.154	0.122	0.133	0.133	0.135	0.144	0.161	0.132	0.117	0.121	0.118	0.182
G	0.180	0.166	0.147	0.143	0.133	0.126	0.167	0.125	0.149	0.142	0.138	0.156
H	0.178	0.152	0.160	0.149	0.163	0.142	0.166	0.168	0.144	0.125	0.140	0.166

플레이트 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.173	0.141	0.156	0.152	0.111	0.145	0.159	0.250	0.111	0.119	0.129	0.146
B	0.158	0.129	0.128	0.124	0.135	0.108	0.112	0.154	0.138	0.101	0.103	0.135
C	0.096	0.160	0.125	0.104	0.102	0.165	0.105	0.135	0.123	0.096	0.097	0.107
D	0.099	0.101	0.115	0.121	0.104	0.101	0.123	0.123	0.117	0.127	0.115	0.137
E	0.108	0.130	0.143	0.101	0.113	0.118	0.140	0.107	0.097	0.136	0.102	0.131
F	0.086	0.118	0.170	0.116	0.113	0.128	0.101	0.111	0.120	0.113	0.087	0.129
G	0.108	0.094	0.127	0.130	0.147	0.132	0.118	0.114	0.123	0.114	0.110	0.119
* H	0.108	0.121	0.133	0.130	1.087	0.139	0.107	0.116	0.124	0.106	0.138	0.143

2H5

플레이트 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.152	0.166	0.126	0.153	0.128	0.122	0.138	0.116	0.140	0.092	0.119	0.172
B	0.153	0.110	0.103	0.132	0.115	0.103	0.085	0.102	0.142	0.101	0.098	0.108
C	0.135	0.113	0.108	0.118	0.105	0.156	0.129	0.090	0.106	0.120	0.105	0.122
* D	0.133	0.121	0.137	0.112	0.126	0.130	0.148	1.044	0.116	0.133	0.127	0.130
E	0.117	0.123	0.137	0.132	0.132	0.096	0.119	0.132	0.102	0.112	0.098	0.105
F	0.118	0.125	0.121	0.128	0.133	0.114	0.109	0.111	0.113	0.084	0.108	0.143
G	0.147	0.139	0.131	0.121	0.108	0.097	0.137	0.118	0.106	0.132	0.101	0.110
H	0.155	0.116	0.193	0.105	0.144	0.128	0.125	0.102	0.149	0.129	0.128	0.116

3D8

플레이트 4

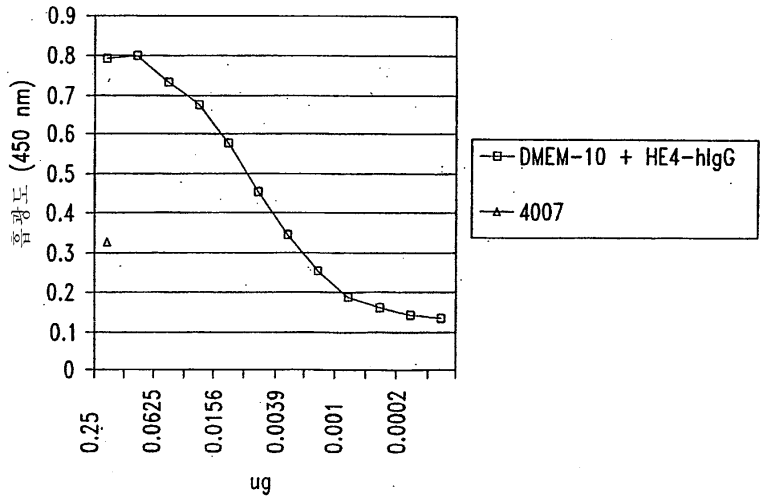
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.128	0.121	0.110	0.134	0.126	0.157	0.120	0.134	0.137	0.098	0.064	0.120
B	0.153	0.126	0.114	0.116	0.156	0.172	0.117	0.133	0.137	0.086	0.131	0.142
C	0.115	0.150	0.111	0.121	0.106	0.102	0.115	0.114	0.118	0.090	0.104	0.135
D	0.114	0.130	0.124	0.092	0.087	0.109	0.133	0.099	0.112	0.122	0.117	0.132
E	0.114	0.124	0.110	0.127	0.093	0.108	0.108	0.104	0.107	0.111	0.134	0.155
F	0.122	0.127	0.117	0.122	0.145	0.129	0.121	0.109	0.104	0.152	0.105	0.143
G	0.121	0.118	0.127	0.127	0.119	0.124	0.104	0.120	0.121	0.109	0.133	0.119
* H	0.133	0.134	0.152	1.054	0.127	0.110	0.133	0.112	0.126	0.092	0.127	0.099

4H4

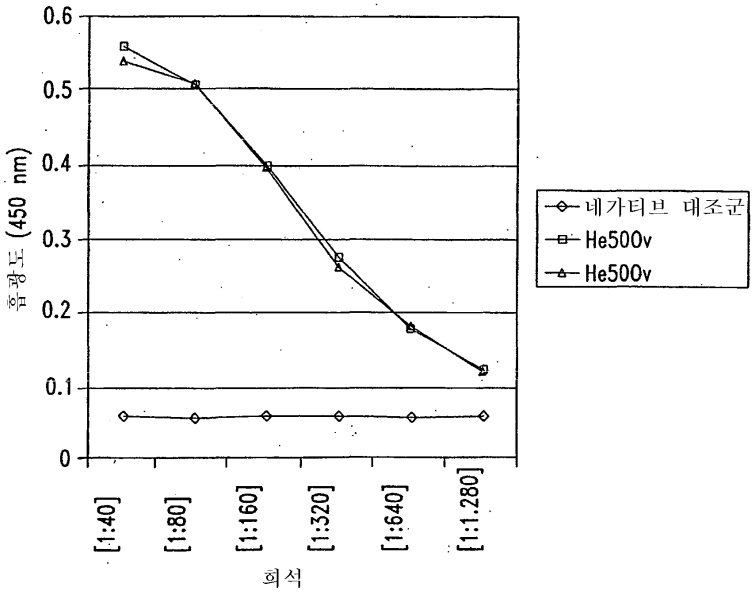
플레이트 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.101	0.109	0.144	1.005	0.031	0.039	0.037	0.047	0.043	0.038	0.042	0.048
B	0.111	0.129	0.109	0.997	0.025	0.032	0.043	0.038	0.037	0.039	0.040	0.042
C	0.119	0.121	0.093	0.979	0.024	0.040	0.038	0.037	0.042	0.040	0.052	0.046
D	0.116	0.102	0.125	0.035	0.027	0.035	0.040	0.038	0.042	0.038	0.040	0.044
E	0.120	0.092	0.101	0.986	0.027	0.032	0.036	0.035	0.041	0.037	0.038	0.038
F	0.105	0.116	0.110	0.748	0.025	0.037	0.044	0.036	0.035	0.037	0.044	0.050
G	0.122	0.108	0.114	0.961	0.022	0.040	0.041	0.041	0.041	0.037	0.043	0.049
H	0.135	0.101	0.167	0.037	0.030	0.032	0.031	0.036	0.036	0.041	0.041	0.061

도면5



도면6



<110> Pacific Northwest Research Institute

<120> DIAGNOSIS OF CARCINOMAS

<130> 5-2004-006478-0

<150> US 60/316,537

<151> 2001-08-29

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' PCR primer for HE4 coding region.Native
secretory signal peptide included.HindIII site and
Kozak consensus sequence upstream of ATG

<400> 1
gttgttaagc ttgccgccat gcctgcttgt cgcctaggc 39

<210> 2
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' antisense PCR primer for HE4 coding region STOP
codon deleted/substitute in-frame BamHI
restriction site for cloning

<400> 2
gttgttggat ccgaaattgg gagtgacaca ggacac 36

<210> 3
<211> 390
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

aagcttgccg ccatgcctgc ttgtcgccta ggcccgctag ccgccgccct cctcctcagc 60

ctgctgctgt tcggcttcac cctagtctca ggcacaggag cagagaagac tggcgtgtgc 120

cccgagctcc aggctgacca gaactgcacg caagagtgcg tctcggacag cgaatgcgcc 180

gacaacctca agtgctgcag cgcgggctgt gccaccttct gctctctgcc caatgataag 240

gagggttcct gcccccaggt gaacattaac tttccccagc tcggcctctg tcgggaccag 300

tgccaggtgg acagccagtg tcctggccag atgaaatgct gccgcaatgg ctgtgggaag 360

gtgtcctgtg tcactcccaa tttcggatcc 390

<210> 4

<211> 1077

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgcctgctt gtcgcctagg cccgctagcc gccgccctcc tcctcagcct gctgctgttc 60

ggcttcaccc tagtctcagg cacaggagca gagaagactg gcgtgtgccc cgagctccag 120

gctgaccaga actgcacgca agagtgcgtc tcggacagcg aatgcgccga caacctcaag 180

tgctgcagcg cgggctgtgc caccttctgc tctctgccca atgataagga gggttcctgc 240

ccccaggtga acattaactt tccccagctc ggcctctgtc gggaccagtg ccaggtggac 300

agccagtgtc ctggccagat gaaatgctgc cgcaatggct gtgggaaggt gtcctgtgtc 360

actcccaatt tcggatccga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 420

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 480

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 540

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 600

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 660

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 720

gcccccatcg agaaaacaat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 780

accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 840

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 900

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 960

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1020

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1077

<210> 5

<211> 358

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys
20 25 30

Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu
35 40 45

Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala
50 55 60

Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys
65 70 75 80

Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln
85 90 95

Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn
100 105 110

Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe Gly Ser Glu Pro
115 120 125

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
130 135 140

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
165 170 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
180 185 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
210 215 220
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
225 230 235 240
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
245 250 255
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
260 265 270
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
275 280 285
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
290 295 300
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
305 310 315 320
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
325 330 335
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
340 345 350
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 6
<211> 1098
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Human-Mouse synthetic fusion gene

<400> 6
aagcttgccg ccatgcctgc ttgtcgccta ggcccgctag ccgccgccct cctcctcagc 60
ctgctgctgt tcggcttcac cctagtctca ggcacaggag cagagaagac tggcgtgtgc 120

cccgagctcc aggctgacca gaactgcacg caagagtgcg tctcggacag cgaatgcgcc 180

gacaacctca agtgctgcag cgcgggctgt gccaccttct gctctctgcc caatgataag 240

gagggttcct gcccccaggt gaacattaac tttccccagc tcggcctctg tcgggaccag 300

tgccaggtgg acagccagtg tcctggccag atgaaatgct gccgcaatgg ctgtgggaag 360

gtgtcctgtg tcactcccaa tttcggatcc gagcccagag ggcccacaat caagccctgt 420

cctccatgca aatgcccagc accgaattca gctggtacct catccgtctt catcttccct 480

ccaaagatca aggatgtact catgatctcc ctgagcccca tagtcacatg tgtggtggtg 540

gatgtgagcg aggatgaccc agatgtccag atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta 600

cacacagctc agacacaaac ccatagagag gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt 660

gccctcccca tccagcacca ggactggatg agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac 720

aacaaagacc tcccagcgcc catcgagaga accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga 780

gctccacagg tatatgtctt gcctccacca gaagaagaga tgactaagaa acaggtcact 840

ctgacctgca tggtcacaga cttcatgcct gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac 900

gggaaaacag agctaaacta caagaacact gaaccagtcc tggactctga tggttcttac 960

ttcatgtaca gcaagctgag agtggaaaag aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc 1020

tgttcagtgg tccacgaggg tctgcacaat caccacacga ctaagagctt ctcccggact 1080

ccgggtaaat gatctaga 1098

<210> 7

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human-Mouse fusion protein

<400> 7

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys
20 25 30

Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu

35 40 45

Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala

50 55 60

Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys

65 70 75 80

Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln

85 90 95

Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn

100 105 110

Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe Gly Ser Glu Pro

115 120 125

Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro

130 135 140

Asn Ser Ala Gly Thr Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys

145 150 155 160

Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val

165 170 175

Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn

180 185 190

Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr

195 200 205

Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp

210 215 220

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu

225 230 235 240

Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg

245 250 255

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys

260 265 270

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp

275 280 285

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys

290 295 300

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser

305 310 315 320

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser

325 330 335

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser

340 345 350

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

355

<210> 8

<211> 583

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cccctgcacc ccgcccggca tagcaccatg cctgcttgtc gcctaggccc gctagccgcc 60

gccctcctcc tcagcctgct gctgttcggc ttcaccctag tctcaggcac aggagcagag 120

aagactggcg tgtgccccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga gtgcgtctcg 180

gacagcgaat gcgccgacaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac cttctgcctt 240

ctctgcccca atgataagga gggttcctgc ccccaggtga acattaactt tccccagctc 300

ggcctctgtc gggaccagtg ccaggtggac acgcagtgtc ctggccagat gaaatgctgc 360

cgcaatggct gtgggaaggt gtcctgtgtc actcccaatt tctgaggtcc agccaccacc 420

aggctgagca gtgaggagag aaagtttctg cctggccctg catctggttc cagcccacct 480

gccctcccct ttttcgggac tctgtattcc ctcttggggt gaccacagct tctccctttc 540

ccaaccaata aagtaaccac tttcagcaaa aaaaaaaaaa aaa 583

<210> 9

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser

1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys

```
            20                  25                  30
Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu
        35                  40                  45
Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala
    50                  55                  60
Gly Cys Ala Thr Phe Cys Leu Leu Cys Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser
65                  70                  75                  80
Cys Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp
                85                  90                  95
Gln Cys Gln Val Asp Thr Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg
            100                 105                 110
Asn Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe
        115                 120                 125
```

<210> 10

<211> 486

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

```
tgagagaaag cggccgcacc ccgcccggca tagcaccatg cctgcttgtc gcctaggccc      60
gctagccgcc gccctcctcc tcagcctgct gctgttcggc ttcaccctag tctcaggcac     120
aggagcagag aagactggcg tgtgccccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga     180
gtgcgtctcg gacagcgaat gcgccgacaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac     240
cttctgctct ctgcccaatg ataaggaggg ttcctgcccc caggtgaaca ttaactttcc     300
ccagctcggc ctctgtcggg accagtgcca ggtggacagc cagtgtcctg gccagatgaa     360
atgctgccgc aatggctgtg ggaaggtgtc ctgtgtcact cccaatttct gagctccggc     420
caccaccagg ctgagcagtg aagatagaaa gtttctgcct ggccctgcag cgtgttacag     480
cccacc                                                               486
```

<210> 11

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys
20 25 30

Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu
35 40 45

Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala
50 55 60

Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys
65 70 75 80

Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln
85 90 95

Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn
100 105 110

Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe
115 120

<210> 12

<211> 374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ccatgcctgc ttgtcgccta ggcccgctag ccgccgccct cctcctcagc ctgctgctgt 60

tcggcttcac cctagtctca ggcacaggag cagagaagac tggcgtgtgc cccgagctcc 120

aggctgacca gaactgcacg caagagtgcg tctcggacag cgaatgcgcc gacaacctca 180

agtgctgcag cgcgggctgt gccaccttct gctctctgcc caatgataag gagggttcct 240

gcccccaggt gaacattaac tttccccagc tcggcctctg tcgggaccag tgccaggtgg 300

acagccagtg tcctggccag atgaaatgct gccgcaatgg ctgtgggaag gtgtcctgtg 360

tcactcccaa tttc 374

<210> 13

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys
20 25 30

Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu
35 40 45

Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala
50 55 60

Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys
65 70 75 80

Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln
85 90 95

Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn
100 105 110

Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe
115 120

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile
1 5 10 15

Asp Glu Ser

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward HE4 real-time PCR primer

<400> 15

agcagagaag actggcgtgt 20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse HE4 real-time PCR primer

<400> 16

gaaagggaga agctgtggtc a 21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer

<400> 17

cgacgcttct tcaaggccaa 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer

<400> 18

atggaagccc aagctgctga 20

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward sense primer

<400> 19

gttgtcggat ccgagcccag agggcccaca atcaag 36

<210> 20

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse anti- sense primer

<400> 20

gttgtttcta gattatcatt tacccggagt ccgggagaag ctc 43