

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4299872号
(P4299872)

(45) 発行日 平成21年7月22日(2009.7.22)

(24) 登録日 平成21年4月24日(2009.4.24)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K 16/18
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K 16/46
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 7 (全 256 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-43368 (P2008-43368)	(73) 特許権者	500553659 アジェンシス、インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 904 04, サンタ モニカ, コロラド ブ ールバード 2225
(22) 出願日	平成20年2月25日(2008.2.25)	(74) 代理人	100080816 弁理士 加藤 朝道
(62) 分割の表示	特願2007-168300 (P2007-168300) の分割	(74) 代理人	100098648 弁理士 内田 潔人
原出願日	平成14年11月7日(2002.11.7)	(74) 代理人	100116528 弁理士 三宅 俊男
(65) 公開番号	特開2008-188015 (P2008-188015A)	(72) 発明者	アヤ ジャコボピッツ アメリカ合衆国 カリフォルニア 902 10, ビバリー ヒルズ, ハットン ドライブ 3135
(43) 公開日	平成20年8月21日(2008.8.21)		
審査請求日	平成20年3月26日(2008.3.26)		
(31) 優先権主張番号	10/005, 480		
(32) 優先日	平成13年11月7日(2001.11.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/062, 109		
(32) 優先日	平成14年1月31日(2002.1.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の処置および検出において有用な 161P2F10B と称される、核酸および対応タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3 に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害するために使用される組成物であって、

配列番号 3 に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号 3 に示されたアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸の置換、付加または欠失を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 3 に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質の活性を有するタンパク質に特異的に結合する、抗体またはその抗体フラグメント

を含み、

前記抗体またはそれらのフラグメントが、放射性同位体、化学療法剤、または毒素からなる群より選択される細胞障害性薬剤に結合体化しており、

前記腫瘍細胞は、結腸癌又は膵臓癌からの細胞である、組成物。

【請求項 2】

薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記抗体またはそのフラグメントが、モノクローナル抗体によるものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体またはそれらに由来するフラグメントである、組成物。

【請求項5】

前記放射性同位体が、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、および ^{32}P ならびにLuの放射性同位体からなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

前記化学療法剤が、タキソール、アクチノマイシン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ゲロニンおよびカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

前記毒素が、ジフテリア毒素、Pseudomonas外毒素(PE)A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデシンA鎖および -サルシンからなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願に対する相互参照)

この出願は、係属中の米国特許出願US 2001/005,480(2001年11月7日出願)；係属中の米国特許出願番号10/062,109(2002年1月31日)の優先権を主張する。この段落に列挙された出願の各々の内容は、本明細書中で、参考として全体として援用される。

20

【0002】

(米国連邦によって支援された研究の下での、本発明に対する権利に対する陳述)適用されない。

【0003】

(発明の分野)

本明細書中に記載の発明は、遺伝子およびそれによってコードされるタンパク質に関し、これは、161P2F10Bとして称され、特定の癌において発現され、本発明は、161P2F10Bを発現する癌の処理において有用である、診断方法および治療方法、ならびに組成物に関する。

【背景技術】

30

【0004】

(発明の背景)

癌は、冠動脈疾患(coronary disease)に次いで、ヒトの第2位の死因である。全世界では、数百万の人々が、毎年癌により死亡している。米国単独では、American Cancer Societyによって報告されるように、癌は毎年50万人をはるかに超える人々の死亡を引き起こしており、毎年120万あまりの新たな症例が診断されている。心臓疾患による死亡は顕著に減少している一方で、癌に起因する死亡は、一般に増加傾向にある。次世紀の初期には、癌は主な死因になると予測されている。

【0005】

40

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

【0006】

全世界で、前立腺癌は、男性において4番目に最も優勢な癌である。北アメリカおよび

50

北欧では、前立腺癌は、男性において断然最も一般的な癌であり、そして男性における癌による死亡の第2位の原因である。米国単独では、肺癌に次いで、30,000人をはるかに超える男性がこの疾患で毎年死亡している。これらの数字の規模にもかかわらず、転移性の前立腺癌に対する有効な処置は未だ存在しない。外科的前立腺切除、放射線療法、ホルモン除去 (hormone ablation) 療法、外科的去勢および化学療法は、主要な処置様式であり続けている。不運にも、これらの処置は、多くの者にとって無効であり、かつしばしば、所望されない結果を伴う。

【0007】

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

10

【0008】

前立腺癌についてのさらなる特異的マーカーを同定することにおける進歩は、マウスにおいてこの疾患の異なる病期を再現し得る前立腺癌異種移植片の生成により改善されてきた。LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) 異種移植片は、重症複合型免疫不全 (SCID) マウスにおける継代を生き延び、かつアンドロゲン依存性からアンドロゲン非依存性への移行を模倣する能力を示した、前立腺癌異種移植片である (Kleinら、1997、Nat. Med. 3: 402)。より近年同定された前立腺癌マーカーとしては、以下が挙げられる: PCTA-1 (Suら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252)、前立腺特異膜 (PSM) 抗原 (Pintoら、Clin. Cancer Res. 1996年9月2日(9): 1445-51)、STEAP (Hubertら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999年12月7日; 96(25): 14523-8) および前立腺幹細胞抗原 (PSCA) (Reiterら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735)。

20

【0009】

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

30

【0010】

腎臓細胞癌腫 (RCC) は、成人悪性疾患の約3%を占める。一旦、腺腫が直径2~3cmに到達すると、悪性疾患の潜在性が存在する。成人では、2つの主な悪性腎臓腫瘍は、腎臓細胞の腺腫および腎盂または尿管の移行細胞癌腫である。腎臓細胞腺腫の発生数は、米国で29,000症例を超えると見積もられており、そして1998年にこの疾患によって11,600人を超える患者が死亡した。移行細胞癌腫は、それほど頻繁ではなく、米国において1年あたり約500症例ほどの発生数である。

【0011】

手術は、何十年もの間、腎臓細胞腺腫の主な治療法であった。近年まで、転移性疾患は、あらゆる全身性治療に対して難治性であった。全身治療 (特に、免疫治療) の近年の開発に伴い、転移性腎臓細胞癌腫は、許容可能な応答の可能性を伴って、適切な患者において積極的にアプローチされ得る。それにもかかわらず、これらの患者に対する有効な治療の必要性が存在し続けている。

40

【0012】

米国における癌の全ての新しい症例のうち、膀胱癌は、男性において約5% (最も一般的な新生物の5番目) および女性において3% (最も一般的な新生物の8番目) に相当する。発生数はゆるやかに増加し、高齢人口の増加と一致する。1998年には、男性における39,500症例および女性における15,000症例を含め、推定で54,500症例であった。米国における年齢調整された (age-adjusted) 発生率は、男

50

性について100,000人当たり32人、および女性において100,000人当たり8人である。3:1の歴史的な男性/女性比は、女性における喫煙パターンに関連して減少し得る。1998年に膀胱癌で推定11,000人が死亡した(男性7,800人および女性3,900人)。膀胱癌発生率および死亡率は、年齢に伴って大きく増加し、そして集団がより高齢化するにつれて問題も増す。

【0013】

大部分の膀胱癌は、膀胱中で再発する。膀胱癌は、膀胱の経尿道的切除術(TUR)と膀胱内化学療法または免疫療法との組み合わせを用いて管理される。膀胱癌の多病巣性の性質および再発性の性質は、TURの限界を指摘する。大部分の筋肉侵潤性癌は、TUR単独では治癒しない。根治的膀胱切除術および尿再交通(urinary diversion)は、癌を切除するための最も効果的な手段であるが、尿の機能および性的機能に対して否定できない影響を保有する。膀胱癌患者に有益な処置様式の顕著な必要性が存在し続けている。

10

【0014】

米国で2000年では、93,800症例の結腸癌および36,400症例の直腸癌を含め、推定130,200症例の結腸直腸癌が生じた。結腸直腸癌は、男性および女性における三番目に一般的な癌である。発生率は、1992年~1996年の間、有意に減少した(1年あたり-2.1%)。調査は、これらの減少が、ポリープが侵襲性癌へと進行するのを予防する、スクリーニングおよびポリープ除去の増加に起因していることを示唆する。2000年には推定56,300人が死亡(47,700人は結腸癌、8,600人は直腸癌による)、米国での癌死亡者全体の約11%を占めた。

20

【0015】

現在、手術が、結腸直腸癌、および広がっていない癌のための最も一般的な治療形態であり、これは頻繁に治癒的である。化学療法または化学療法に加えての放射線照射は、癌が腸壁に深く穿孔しているかまたはリンパ節に広がっている大部分の患者に対して手術前または手術後に提供される。永久的な人工肛門形成(身体の排泄物を排除するための腹部開口部の形成)は、結腸癌について時折必要とされ、そして直腸癌については頻繁に要求される。結腸直腸癌についての効果的な診断様式および処置様式の必要性が存在し続けている。

【0016】

2000年には、肺癌および気管支癌の推定164,100の新たな症例が存在し、これは、米国癌診断全体の14%を占めた。肺癌および気管支癌の発生率は、1984年の100,000人中86.5人という高さから1996年の70.0人へと、男性において有意に減少している。1990年代、女性の間での増加率は低下し始めた。1996年には、女性における発生率は、100,000人中42.3人であった。

30

【0017】

肺癌および気管支癌は、2000年に推定156,900人の死亡者を生じ、これは、癌死亡者全体の28%を占めた。1992年~1996年の間、肺癌による死亡率は、男性の間で有意に減少した(1年あたり-1.7%)一方で、女性についての死亡率は依然として有意に増加している(1年あたり0.9%)。1987年以来、より多くの女性が乳癌よりも肺癌によって毎年死亡しており、40年よりも長期にわたって、女性における癌による死亡の主な原因であった。肺癌発生率および死亡率の減少は、過去30年にわたる喫煙率の減少に起因している可能性が最も高い;しかし、女性の間での喫煙パターンの減少は、男性の減少に遅れている。成体におけるタバコの使用の減少が鈍くなっているが、若者におけるタバコの使用が再度増加していることは、重大である。

40

【0018】

肺癌および気管支癌についての処置選択肢は、癌の型および病期によって決定され、選択肢としては、手術、放射線療法および化学療法が挙げられる。多くの局所性の癌については、手術が通常選り抜きの処置である。この疾患は、通常、発見されるときまでに広がっているので、放射線療法および化学治療が、手術と組み合わせてしばしば必要とされる

50

。化学治療単独または放射線療法と組み合わせた化学療法は、小細胞肺癌についての選り抜きの処置であり；このレジメンでは、大きな%の患者が寛解を経験し、これはいくつかの場合において長く持続する。しかし、肺癌および気管支癌についての効果的な処置アプローチおよび診断アプローチの必要性が存在し続けている。

【0019】

乳癌の推定182,800の新しい侵襲性症例が、2000年の間に米国の女性の間で生じると予測された。さらに、乳癌の約1,400の新しい症例が、2000年に男性において診断されると予測された。1980年代における一年当たり約4%の増加後、女性における乳癌発生率は、1990年代に100,000人当たり約110.6症例に頭打ちとなった。

10

【0020】

米国単独で、乳癌に起因して、2000年に推定41,200人が死亡した(40,800人が女性、400人が男性)。乳癌は、女性における癌による死亡の2番目に主要なものである。最近のデータによると、死亡率は、1992年~1996年の間に有意に減少しており、白人および黒人の両方の若い女性の間で最も大きく減少していた。これらの減少は、おそらく、より早期の検出および処置の改善の結果であった。

【0021】

医学的環境および患者の好みを考慮にいれると、乳癌の処置は、以下を含み得る：腫瘍摘除(腫瘍の局所的な除去)および脇下リンパ節の除去；乳房切除(乳房の外科的除去)および脇下リンパ節の除去；放射線療法；化学療法；またはホルモン療法。しばしば、2つ以上の方法が組み合わせて使用される。多数の研究が、初期段階の疾患について、腫瘍切除に加えた放射線療法の後の長期生存率が、改変された根本的な乳房切除後の生存率と同様であることを示している。再建技術における顕著な進歩は、乳房切除後の乳房再建についていくつかの選択肢を提供する。近年、このような再建は、乳房切除と同時にに行われている。

20

【0022】

適切な量の周囲の正常胸部組織を伴うインサイチュの腺管癌腫(DCIS)の局所切除によって、DCISの局所的な再発を防ぎ得る。胸部への放射線照射および/またはタモキシフェンによって、残っている胸部組織におけるDCISの発生機会が低減され得る。未処置のままであるとDCISは発達して浸潤性乳癌になり得るので、このことは重要である。それにもかかわらず、これらの処置には、深刻な副作用または後遺症が存在する。それゆえ、有効な乳癌処置の必要性が存在する。

30

【0023】

2000年の米国において卵巣癌の推定23,100の新症例が存在した。卵巣癌は女性における全ての癌の4%を占め、婦人科癌において第2位に位置付けられている。1992年~1996年の間において、卵巣癌の発生率は、有意に低下した。卵巣癌の結果として、2000年には推定14,000人が死亡した。卵巣癌は、女性生殖系の他のいかなる癌よりも多数の死亡者を生じる。

【0024】

手術、放射線療法、および化学療法は、卵巣癌についての処置選択肢である。外科的手術としては、通常、卵巣の一方または両方の切除、ファローピウス管の切除(卵管卵巣摘出術)、および子宮の切除(子宮摘出術)が挙げられる。いくつかの非常に初期の腫瘍において、子供を持つことを望む若い女性において特に、関与する卵巣のみが除去される。進行した疾患では、腹腔内の疾患全てを除去して化学療法の効果を増強することが試みられる。卵巣癌についての効果的な処置選択肢についての重要な必要性が存在し続ける。

40

【0025】

2000年の米国において膵臓癌の推定28,300の新症例が存在した。過去20年間にわたって、膵臓癌の割合は、男性において減少している。女性の間での割合は、おおよそ一定のままであるが、減少し始めるかもしれない。膵臓癌により、2000年に米国において推定28,200人が死亡した。過去20年間にわたって、男性における死亡率

50

は僅かであるが有意に減少している（１年間で約 - 0.9%）が、その一方で、その割合が女性においては僅かに上昇した。

【 0 0 2 6 】

手術、放射線療法、および化学療法は、膵臓癌についての処置選択肢である。これらの処置選択肢は、多くの患者において生存を長期化し得、そして/またはその症状を軽減し得るが、大部分の人に対して治癒を生み出すようではない。膵臓癌についてのさらなる治療選択肢および診断的選択肢に対しての重大な必要性が存在する。

【 発明の開示 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 7 】

(1) 以下：

a) 図 2 のタンパク質の状態を調節する物質か、または
b) 図 2 のタンパク質によって調節され、それによって図 2 のタンパク質を発現する細胞の状態を調節する分子、
を含有する、組成物。

(2) 生理学的に受容可能なキャリアをさらに含む、項目 1 に記載の組成物。

(3) ヒト単位投薬形態の項目 1 に記載の組成物を含有する、薬学的組成物。

(4) 前記物質が、抗体またはそのフラグメントを含み、該抗体またはそのフラグメントが、図 2 のタンパク質に関連するタンパク質に特異的に結合する、項目 1 に記載の組成物。

(5) モノクローナルである、項目 4 に記載の抗体またはそのフラグメント。

(6) ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、項目 4 に記載の抗体。

(7) 項目 4 に記載の抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物。

(8) 項目 5 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

(9) 図 2 に記載のタンパク質を発現する細胞に対して細胞毒性剤または診断剤を送達する方法であって、該方法は、
項目 4 に記載の抗体またはそのフラグメントに結合される、細胞毒性剤または診断剤を提供する工程；および、
該細胞を、抗体 - 薬剤またはフラグメント - 薬剤結合体に曝露する工程、
を包含する、方法。

(1 0) 前記物質が、抗体またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含有し、該抗体またはそのフラグメントのいずれかが、図 2 のタンパク質に免疫特異的に結合する、項目 1 に記載の組成物。

(1 1) 前記物質が、図 2 のタンパク質に関連するタンパク質を含む、項目 1 に記載の組成物。

(1 2) 図 2 に示される全アミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % 相同である、項目 1 に記載のタンパク質。

(1 3) 前記物質が、以下：

a) 図 2 のタンパク質の連続した 8、9、10、または 11 アミノ酸のペプチド；

b) 表 V I I I ~ X X I のペプチド；

c) 表 X X I I ~ X L V のペプチド；または、

d) 表 X L V I ~ X L I X のペプチド、

を含む、項目 1 に記載の組成物。

(1 4) 前記物質が、図 2 のタンパク質のアミノ酸配列に由来する、C T L ポリペプチドまたはそのアナログを含む、項目 1 に記載の組成物。

(1 5) 前記エピトープが、図 2 の全アミノ酸配列ではないという条件によってさらに限定される、項目 1 4 に記載の組成物。

(1 6) 前記物質が、表 V I I I ~ X X I に示される C T L ポリペプチドを含む、項目 1 4 に記載の組成物。

(1 7) 前記ポリペプチドが、図 2 のタンパク質の全アミノ酸配列ではないという条件

10

20

30

40

50

によってさらに限定される、項目 16 に記載の組成物。

(18) 前記物質が、図 2 のアミノ酸配列由来の抗体ポリペプチドエピトープを含む、項目 1 に記載の組成物。

(19) 前記エピトープが、図 2 の全アミノ酸配列ではないという条件によってさらに限定される、項目 18 に記載の組成物。

(20) 項目 18 に記載の組成物であって、ここで、前記抗体エピトープが、図 2 の少なくとも 5 アミノ酸のペプチド領域を、該ペプチドの末端までの任意の整数増分で含み、ここで、該エピトープは、以下：

a) 図 5 の親水性度プロフィールにおいて 0.5 を超える値を有するアミノ酸位置、
b) 図 6 のヒドロパシープロフィールにおいて 0.5 未満の値を有するアミノ酸位置、
c) 図 7 のパーセント接近可能残基プロフィールにおいて 0.5 を超える値を有するアミノ酸位置；

d) 図 8 の平均可焼性プロフィールにおいて 0.5 を超える値を有するアミノ酸位置；

e) 図 9 の - ターンプロフィールにおいて 0.5 を超える値を有するアミノ酸位置；

f) a) ~ e) のうちの少なくとも 2 つの組み合わせ；

g) a) ~ e) のうちの少なくとも 3 つの組み合わせ；

h) a) ~ e) のうちの少なくとも 4 つの組み合わせ；または

i) a) ~ e) の 5 つの組み合わせ；

から選択されるアミノ酸位置を含む、組成物。

(21) 前記エピトープが、図 2 の全アミノ酸配列ではないという条件によってさらに限定される、項目 20 に記載の組成物。

(22) 項目 11 のタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

(23) 図 2 に記載の核酸分子を含む、項目 22 に記載のポリヌクレオチド。

(24) 前記コードされるタンパク質が、図 2 の全アミノ酸配列ではないという条件によってさらに限定される、項目 22 に記載のポリヌクレオチド。

(25) T が、U で置換される、項目 22 に記載のポリヌクレオチド。

(26) 前記物質が、図 2 の核酸配列のコード配列を含むポリヌクレオチドを含有する、項目 1 に記載の組成物。

(27) 項目 11 に記載のさらなるタンパク質をコードする、さらなるヌクレオチド配列をさらに含む、項目 22 に記載のポリヌクレオチド。

(28) 項目 22 に記載のポリヌクレオチドに完全に相補的であるポリヌクレオチドを含む、組成物。

(29) 項目 25 に記載のポリヌクレオチドに完全に相補的であるポリヌクレオチドを含む、組成物。

(30) 項目 27 に記載のポリヌクレオチドに完全に相補的であるポリヌクレオチドを含む、組成物。

(31) 前記物質が、以下：

a) 161P2F10B コード配列を有するポリヌクレオチドを切断するリボザイム、または

b) 該リボザイムをコードする核酸分子；

および、生理学的に受容可能なキャリア、を含有する、項目 1 に記載の組成物。

(32) 前記物質が、ヒト T 細胞を含み、ここで、該 T 細胞が、特定の HLA 分子の状況で、161P2F10B ペプチド部分配列を特異的に認識する、項目 1 に記載の組成物。

(33) 図 2 のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法は、項目 1 に記載の組成物を該細胞に投与する工程を包含する、方法。

(34) 図 2 のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する項目 33 に記載の方法であって、該方法は、抗体またはそのフラグメントを該細胞に投与する工程を包含し、該抗体またはそのフラグメントのいずれかが、161P2F10B - 関連タンパク質に特異的

10

20

30

40

50

に結合する、方法。

(35) 図2のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する項目33に記載の方法であって、該方法は、161P2F10B - 関連タンパク質を該細胞に投与する工程を包含する、方法。

(36) 図2のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する項目33に記載の方法であって、該方法は、

161P2F10B - 関連タンパク質に対するコード配列を含むポリヌクレオチド、または

161P2F10B - 関連タンパク質に対するコード配列に相補的であるポリヌクレオチド、

を該細胞に投与する工程を包含する、方法。

(37) 図2のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する項目33に記載の方法であって、該方法は、図2のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを切断するリボザイムを該細胞に投与する工程を包含する、方法。

(38) 図2のタンパク質および特定のHLA分子を発現する癌細胞の増殖を阻害する項目33に記載の方法であって、該方法は、

ヒトT細胞を該癌細胞に投与する工程を包含し、ここで、該T細胞が、図2のタンパク質のペプチド部分配列を特異的に認識する一方、該部分配列が、特定のHLA分子の状況下に存在する、方法。

(39) 項目33に記載の方法であって、該方法は、単鎖モノクローナル抗体をコードするヌクレオチドを送達するベクターを投与し、それによって該コードされる単鎖抗体が、図2のタンパク質を発現する癌細胞内で細胞内的に発現される工程を包含する、方法。

(40) 図2のタンパク質に対して指向される哺乳動物免疫応答を生じさせる方法であって、該方法は、哺乳動物の免疫系の細胞を、

a) 161P2F10B - 関連タンパク質、および/または

b) 該タンパク質をコードするヌクレオチド配列

の一部に曝露し、それによって、免疫応答が、該タンパク質に対して生じさせられる工程、を包含する、方法。

(41) 項目40に記載の免疫応答を生じさせる方法であって、該方法は、

少なくとも1つのT細胞エピトープまたは少なくとも1つのB細胞エピトープを含む161P2F10B - 関連タンパク質を提供する工程；および

該エピトープを、哺乳動物免疫系T細胞またはB細胞それぞれと接触させ、それによって、該T細胞またはB細胞が、活性化される工程、

を包含する、方法。

(42) 項目41に記載の方法であって、前記免疫系細胞が、B細胞であり、それによって前記誘導されたB細胞が、161P2F10B - 関連タンパク質に対して特異的に結合する抗体を産生する、方法。

(43) 項目41に記載の方法であって、前記免疫系細胞が、細胞傷害性T細胞(CTL)であるT細胞であって、それによって、前記活性化されたCTLが、161P2F10B - 関連タンパク質を発現する自己細胞を殺傷する、方法。

(44) 項目41に記載の方法であって、前記免疫系細胞が、ヘルパーT細胞(HTL)であるT細胞であって、それによって、前記活性化されたHTLが、サイトカインを分泌し、該サイトカインが、細胞傷害性T細胞(CTL)の細胞傷害性またはB細胞の抗体産生活性を助長する、方法。

(45) サンプル中において、161P2F10B - 関連タンパク質または161P2F10B - 関連ポリヌクレオチドの存在を検出する方法であって、該方法は、

該サンプルを、項目1に記載の物質と接触させる工程であって、該物質が、161P2F10B - 関連タンパク質または161P2F10B - 関連ポリヌクレオチドそれぞれに特異的に結合する、工程、および

該物質と、該161P2F10B - 関連タンパク質または該161P2F10B - 関連ポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドそれぞれとの複合体の存在を測定する工程、
を包含する、方法。

(46) サンプル中の161P2F10B - 関連タンパク質の存在を検出するための、
項目45に記載の方法であって、該方法は、

該サンプルを抗体またはそのフラグメントと接触させる工程であって、該抗体またはその
フラグメントのいずれかが、該161P2F10B - 関連タンパク質と特異的に結合する
工程；および

該抗体またはそのフラグメントと161P2F10B - 関連タンパク質との複合体の存在
を決定する工程

を包含する、方法。

10

(47) 癌に罹患している患者または癌に罹患していることが疑われる患者から前記サ
ンプルをとる工程をさらに包含する、項目45に記載の方法。

(48) サンプル中の図2のmRNAのタンパク質の存在を検出するための項目45に
記載の方法であって、該方法は、

少なくとも1つのプライマーを用いる逆転写によって該サンプルからcDNAを産生する
工程；

該産生されたcDNAを、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして161
P2F10Bポリヌクレオチドを使用して増幅する工程であって、ここで該センスプライ
マーおよびアンチセンスプライマーとして使用される161P2F10Bポリヌクレオチ
ドが、161P2F10B cDNAを増幅するように働く、工程；ならびに

20

該増幅された161P2F10B cDNAの存在を検出する工程

を包含する、方法。

(49) 癌に罹患している患者または癌に罹患していることが疑われる患者からの生物
学的サンプル中の1つ以上の161P2F10B遺伝子産物をモニタリングするための、
項目45に記載の方法であって、該方法は、

個体からの組織サンプル中の細胞によって発現される1つ以上の161P2F10B遺伝
子産物の状態を決定する工程；

該決定された状態を、対応する正常サンプル中の1つ以上の161P2F10B遺伝子産
物の状態と比較する工程；および

該正常サンプルに比較して、該サンプル中の1つ以上の161P2F10Bの異常な遺伝
子産物の存在を同定する工程

30

を包含する、方法。

(50) 項目49に記載の方法であって、該方法は、161P2F10B mRNAの
増加した遺伝子産物または161P2F10Bタンパク質の1つ以上が存在するか否かを
決定し、それによって、前記正常組織産物に対する前記試験産物中の増加した遺伝子産物
の1つ以上の存在が、癌の存在または状態を示す工程をさらに包含する、方法。

(51) 前記癌が、表Iに示される組織に生じる、項目50に記載の方法。

(52) 項目4に記載の抗体であって、該抗体は、以下：

2002年11月7日にAmerican Type Culture Collect
ion(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas
, VA 20110-2209 USA)に寄託され、寄託番号_____を割り当てら
れた、X41(3)15と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル
抗体またはその結合領域；

40

2002年11月7日にAmerican Type Culture Collect
ion(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas
, VA 20110-2209 USA)に寄託され、寄託番号_____を割り当てら
れた、X41(3)29と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル
抗体またはその結合領域；

2002年11月7日にAmerican Type Culture Collect
ion(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas

50

、VA 20110-2209 USA)に寄託され、寄託番号_____を割り当てられた、X41(3)37と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；

2002年11月7日にAmerican Type Culture Collection(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)に寄託され、寄託番号_____を割り当てられた、X41(4)6と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；

2002年11月7日にAmerican Type Culture Collection(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)に寄託され、寄託番号_____を割り当てられた、X41(3)17と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；あるいは

2002年11月7日にAmerican Type Culture Collection(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)に寄託され、寄託番号_____を割り当てられた、X41(3)50と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；である、抗体。

(発明の要旨)

本発明は、161P2F10Bと称される遺伝子に関し、この遺伝子は、表Iに列挙される癌において過剰発現されることが見出されている。正常組織における161P2F10B遺伝子発現のノーザンブロット発現分析は、成人組織における制限された発現パターンを示す。161P2F10Bのヌクレオチド配列(図2)およびアミノ酸配列(図2および図3)を提供する。正常成人組織における161P2F10Bの組織関連プロフィールは、表1で列挙された組織において観察された過剰発現とあわせて、161P2F10Bが少なくともいくつかの癌において異常に過剰発現されており、したがって、表Iで列挙された組織のような組織の癌について有用な診断標的、予防標的、予後診断標的および/または治療標的として役立つことを示す。

【0028】

本発明は、以下を提供する：161P2F10Bの遺伝子、mRNAおよび/またはコード配列(好ましくは単離された形態の)の全部または一部に対応するか、または相補的なポリヌクレオチド(これらとしては、以下が挙げられる：4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または25を超えて連続したアミノ酸の、161P2F10B関連タンパク質および161P2F10B関連フラグメントをコードするポリヌクレオチド)；少なくとも30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100または100を超えて連続したアミノ酸の161P2F10B関連タンパク質、ならびにペプチド/タンパク質自体；161P2F10Bの遺伝子配列もしくはmRNA配列またはそれらの一部に対して相補的であるかまたは少なくとも90%の相同性を有する、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、および関連分子、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、ならびに161P2F10B遺伝子、mRNAまたは161P2F10Bコードポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。161P2F10BをコードするcDNAおよび遺伝子を単離するための手段もまた提供される。161P2F10Bポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子、このような分子で形質転換または形質導入された細胞、および161P2F10B遺伝子産物の発現のための宿主-ベクター系もまた提供される。本発明はさらに、161P2F10Bタンパク質およびそれらのポリペプチドフラグメントに結合する抗体を提供し、これらの抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、マウス抗体および他の哺乳動物抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および完全ヒト抗体、ならびに検出可能なマーカーまたは治療剤で標識された抗体が挙げられる。特定の実施形態においては、た

だし、図2の核酸配列の全体はコードされず、そして/または図2のアミノ酸配列全体は調製されない。特定の実施形態では、図2の核酸配列全体がコードされ、そして/または図2のアミノ酸配列全体が調製され、これらのいずれかは、それぞれのヒト単位投薬形態である。

【0029】

本発明は、種々の生物学的サンプル中での161P2F10Bのポリヌクレオチドおよびタンパク質の存在および状態を検出するための方法、ならびに161P2F10Bを発現する細胞を同定するための方法をさらに提供する。本発明の代表的な実施形態は、癌のような何らかの形態の増殖調節不全を有するかまたはそれらを有する疑いのある組織サンプルまたは血液学的サンプルにおいて、161P2F10B遺伝子産物をモニタリングするための方法を提供する。

10

【0030】

本発明は、種々の免疫原性組成物または治療組成物、および161P2F10Bを発現する癌（例えば、表Iに列挙された組織の癌）を処置するためのストラテジー（161P2F10Bの転写、翻訳、プロセッシングまたは機能を阻害することを目的とした治療を含む）ならびに癌ワクチンをさらに提供する。1つの局面において、本発明はヒト被験体において161P2F10Bを発現する癌を処置するための組成物、ならびにそれらを含む方法を提供し、ここで、この組成物は、ヒトの用途について適切なキャリアならびに161P2F10Bの産生または機能を阻害する1つ以上の薬剤のヒトの単位用量を含む。好ましくは、このキャリアは、特有のヒトキャリアである。本発明の別の局面において、この薬剤は、161P2F10Bタンパク質と免疫反応性部分である。このような部分の非限定的な例としては、抗体（例えば、単鎖、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体）、（天然に存在しているかまたは合成された）それらの機能的等価物ならびにそれらの組合せが挙げられるがこれらに限定されない。これらの抗体は、診断的部分または治療的部分に結合体化され得る。別の局面において、この薬剤は、本明細書中で定義されるような低分子である。

20

【0031】

別の局面において、この薬剤は、161P2F10Bに対するCTL応答を誘導するためのヒトにおけるHLAクラスI分子に結合する細胞傷害性Tリンパ球（CTL）エピトープを含む1以上のペプチドおよび/またはヒトにおいてHLAクラスII分子に結合してHTL応答を誘発するヘルパーTリンパ球（HTL）エピトープを含む1以上のペプチドを含む。本発明のペプチドは、同一のものまたは1以上の別個のポリペプチド分子であり得る。本発明のさらなる局面において、この薬剤は、上記のようにCTL応答またはHTL応答を刺激するペプチドのうちの1つ以上を発現する1つ以上の核酸分子を含む。本発明のさらに別の局面において、1つ以上の核酸分子は、上記のように161P2F10Bと免疫学的に反応する部分を発現し得る。1つ以上の核酸分子はまた、161P2F10Bの産生を阻害する分子であり得るか、またはこれをコードし得る。このような分子の非限定的な例としては、161P2F10Bの産生にとって必須のヌクレオチド配列に相補的な分子（例えば、アンチセンス配列または161P2F10B産生にとって必須のヌクレオチド二重らせんを有する三重らせんを形成する分子）または161P2F10B mRNAを溶解するのに効果的なりボザイムが挙げられるがこれらに限定されない。

30

40

【0032】

親タンパク質（例えば、改変体1、改変体2など）に関して表VIII-XXIおよびXXII-XXIX（集合的にHLAペプチド表（HLA Peptides Table）とする）に示される任意のペプチドの開始位置を決定するために、以下の3つの因子を参照することに留意すること：特定の改変体、HLAペプチド表におけるペプチド長、および表VIIにおける検索ペプチド。一般に、固有の検索ペプチドを使用して、特定の改変体に対する特定のHLAペプチドを得る。そのそれぞれの親分子に対する各検索ペプチドの位置は、表VIIに列挙される。したがって、検索ペプチドが位置「X」で開始した場合、これらの親分子におけるHLAペプチドの実際の位置を得るために表VIII-

50

XXIおよびXXII - XLIXにおける各位置に対して値「X - 1」を加えなければならない。例えば、特定の検索ペプチドがその親分子の150位で開始するとき、親分子におけるアミノ酸の位置を計算するために各HLAペプチドアミノ酸の位置に150 - 1、すなわち149を加算しなければならない。

【0033】

本発明の一つの実施形態は、集合的に表VIII ~表XXIおよび表XXIIから表LIXにおいて少なくとも2度現れるHLAペプチド、またはHLAペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを包含する。本発明の別の実施形態は、表VIII ~表XXIに少なくとも1度現れ、かつ表XXII ~表LIXに少なくとも1度現れるHLAペプチド、またはHLAペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを包含する。

10

【0034】

本発明の別の実施形態は、以下の特徴の1つ、2つ、3つ、4つ、あるいは5つ有するペプチド領域を含む抗体エピトープ、あるいはペプチド領域をコードするオリゴヌクレオチドである：

i) 図3の特定のペプチドの少なくとも5アミノ酸のペプチド領域(図3におけるそのタンパク質の全長までの任意の整数増分における)(図5の親水性プロフィールにおいて、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9以上の値を有するかまたは1.0に等しい値を有するアミノ酸位置を含む)；

ii) 図3の特定のペプチドの少なくとも5アミノ酸のペプチド領域(図3におけるそのタンパク質の全長までの任意の整数増分における)(図6の親水性プロフィールにおいて、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1以下の値を有するかまたは0.0に等しい値を有するアミノ酸位置を含む)；

20

iii) 図3の特定のペプチドの少なくとも5アミノ酸のペプチド領域(図3におけるそのタンパク質の全長までの任意の整数増分における)(図7の接近可能残基の%(Percent Accessible Residues)プロフィールにおいて、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9以上の値を有するかまたは1.0に等しい値を有するアミノ酸位置を含む)；

iv) 図3の特定のペプチドの少なくとも5アミノ酸のペプチド領域(図3におけるそのタンパク質の全長までの任意の整数増分における)(図8の平均可撓性(Average Flexibility)プロフィールにおいて、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9以上の値を有するかまたは1.0に等しい値を有するアミノ酸位置を含む)；

30

v) 図3の特定のペプチドの少なくとも5アミノ酸のペプチド領域(図3におけるそのタンパク質の全長までの任意の整数増分における)(図9のターンプロフィールにおいて、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9以上の値を有するかまたは1.0に等しい値を有するアミノ酸位置を含む)。

【0035】

(発明の詳細な説明)

(節の概要)

I.) 定義

II.) 161P2F10Bポリヌクレオチド

40

II.A.) 161P2F10Bポリヌクレオチドの使用

II.A.1.) 遺伝的異常のモニタリング

II.A.2.) アンチセンスの実施形態

II.A.3.) プライマーおよびプライマー対

II.A.4.) 161P2F10Bコード核酸分子の単離

II.A.5.) 組換え核酸分子および宿主ベクター系

III.) 161P2F10B関連タンパク質

III.A.) モチーフ保有タンパク質の実施形態

III.B.) 161P2F10B関連タンパク質の発現

III.C.) 161P2F10B関連タンパク質の改変

50

- III . D .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質の使用
 - IV .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B 抗体
 - V .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B 細胞免疫応答
 - VI .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B トランスジェニック動物
 - VII .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B の検出方法
 - VIII .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連遺伝子およびそれらの産物の状態をモニタリングするための方法
 - IX .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B と相互作用する分子の同定
 - X .) 治療法および組成物
 - X . A .) 抗癌ワクチン 10
 - X . B .) 抗体ベースの治療のための標的としての 1 6 1 P 2 F 1 0 B
 - X . C .) 細胞免疫応答のための標的としての 1 6 1 P 2 F 1 0 B
 - X . C . 1 . ミニ遺伝子ワクチン
 - X . C . 2 . ヘルパーペプチドとCTLペプチドとの組み合わせ
 - X . C . 3 . T細胞プライミング剤とCTLペプチドとの組み合わせ
 - X . C . 4 . CTLペプチドおよび/またはHTLペプチドでパルスしたDCを含むワクチン組成物
 - X . D .) 養子免疫療法
 - X . E .) 治療目的または予防目的のためのワクチンの投与
 - XI .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B の診断的实施形態および予後的実施形態 20
 - XII .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質機能の阻害
 - XII . A .) 細胞内抗体を用いた 1 6 1 P 2 F 1 0 B の阻害
 - XII . B .) 組換えタンパク質を用いた 1 6 1 P 2 F 1 0 B の阻害
 - XII . C .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B の転写または翻訳の阻害
 - XII . D .) 治療的戦略のための一般的考慮
 - XIII .) 1 6 1 P 2 F 1 0 b の調節因子の同定、性質決定および使用
 - XIV .) キット/物品の製品
 - (I .) 定義
- 他に特に定義されていない限りは、本明細書中で使用される当該分野の全ての用語、記号、および他の科学的用語または専門用語は、本発明が関係している当業者によって一般的に理解されている意味を有するように意図される。いくつかの場合においては、一般的に理解されている意味を有する用語は、明確さおよび/または容易な参照のために本明細書中で定義され、そして本明細書中でのこのような定義の包含は、当該分野で一般的に理解されている意味を超える実質的な差異を示すようには決して解釈されないはずである。本明細書中に記載されるかまたは参照される技術および手順（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、(1989)編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.に記載されている、広範囲に利用されている分子クローニング方法論）は、一般的に十分に理解されており、そして当業者によって、従来の方法論を用いて一般的に使用される。適切である場合には、商業的に入手可能なキットおよび試薬の使用を含む手順が、一般的には、製造業者によって定義されるプロトコルおよび/またはそうでなければ他に記載されているパラメーターに従って行われる。 40
- 【0036】
- 用語「進行した前立腺癌」、「局所的に進行した前立腺癌」、「進行した疾患」、および「局所的に進行した疾患」は、前立腺の莖膜を通じて拡大した前立腺癌を意味し、そしてAmerican Urological Association (AUA) システムのもとでのステージCの疾患、Whitmore - Jewett システムのもとでのステージC1 ~ C2の疾患、およびTNM (腫瘍、節、転移 (tumor、node、metastasis)) システムのもとでのステージT3 ~ T4 およびN+の疾患を含むよ 50

うに意味される。一般的には、外科手術は、局所的に進行した疾患を有する患者については推奨されず、そしてこれらの患者は、臨床的に局在化した（器官に限定された）前立腺癌を有している患者と比較して、実質的にあまり好ましくない結果を有する。局所的に進行した疾患は、前立腺の側縁を超えるしこり、あるいは前立腺の基部の上部の非対称性またはしこりの明白な証拠によって、臨床的に同定される。局所的に進行した前立腺癌は、現在は、腫瘍が前立腺の莖膜に侵入または浸潤するか、外科的な縁に伸びるか、あるいは精子の小包に侵入する場合には、根治的な前立腺切除後に病理学的に診断される。

【 0 0 3 7 】

「ネイティブなグリコシル化パターンを改変すること」は、本明細書中の目的のために、ネイティブ配列の 1 6 1 P 2 F 1 0 B において見出される 1 つ以上の炭水化物部分を除去すること（内在するグリコシル化部位を除去することによってか、または化学的手段および/もしくは酵素的手段によってグリコシル化を除去することによってのいずれかで）、および/あるいはネイティブ配列の 1 6 1 P 2 F 1 0 B に存在しない 1 つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することを意図する。さらに、この句は、ネイティブタンパク質のグリコシル化の質的な変化を含み、種々の炭水化物部分の存在の性質および比率の変化に関する。

10

【 0 0 3 8 】

用語「アナログ」は、構造的に類似するか、別の分子と類似する特性または一致する特性を共有する分子をいう（例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質）。例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質のアナログは、1 6 1 P 2 F 1 0 B に特異的に結合する抗体または T 細胞によって特異的に結合され得る。

20

【 0 0 3 9 】

用語「抗体」は、最も広範な意味で使用される。従って、「抗体」は、天然に存在し得るか、または慣習なハイブリドーマ技術によって産生されるモノクローナル抗体のような人工であり得る。抗 1 6 1 P 2 F 1 0 B 抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体ならびに抗原結合ドメインおよび/またはこれらの抗体の 1 つ以上の相補的決定領域を含むフラグメントを含む。

【 0 0 4 0 】

「抗体フラグメント」は、標的に結合する免疫グロブリン分子の可変領域の少なくとも一部分（すなわち、抗原結合領域）として定義される。1 つの実施形態において、これは、単一の抗 1 6 1 P 2 F 1 0 B 抗体およびそのクローン（アゴニスト、アンタゴニストおよび中和抗体が挙げられる）ならびにポリエピトープの（polyepitopic）特異性を有する抗 1 6 1 P 2 F 1 0 B 抗体組成物を特に網羅する。

30

【 0 0 4 1 】

用語「コドン最適化配列」は、約 2 0 % 未満の使用頻度を有する任意のコドンを置換することによって特定の宿主種について最適化されたヌクレオチド配列をいう。偽ポリアデニル化配列の除去、エキソン/イントロンスプライシングシグナルの除去、トランスポゾン様リピートの除去および/またはコドン最適化に加えて G C 含量の最適化によって、所定の宿主種における発現について最適化されたヌクレオチド配列は、本明細書中で「発現増強配列」と呼ばれる。

40

【 0 0 4 2 】

「コンビナトリアルライブラリー」は、試薬のような多数の化学的「ビルディングブロック」を併用することによって化学合成または生物学的合成のいずれかによって生成された多様な化学化合物の収集である。例えば、線形コンビナトリアル化学ライブラリー（例えば、ポリペプチド（例えば、ムテイン）ライブラリー）は、所定の化合物の長さ（すなわち、ポリペプチド化合物におけるアミノ酸の数）についての可能な方法毎に化学的ビルディングブロック（いわゆる（called）アミノ酸）のセットを併用することによって形成される。多数の化学化合物は、化学ビルディングブロックのこのようなコンビナトリアル混合によって合成される（Galloppら、J. Med. Chem. 37 (9) : 1233 - 1251 (1994)）。

50

【 0 0 4 3 】

コンビナトリアルライブラリーの調製およびスクリーニングは、当業者に周知である。このようなコンビナトリアル化学ライブラリーとしては、限定されないが以下が挙げられる：ペプチドライブラリー（例えば、米国特許第5,010,175号、Furka, P e p t . P r o t . R e s . 3 7 : 4 8 7 - 4 9 3 (1 9 9 1) , H o u g h t o n ら、Nature, 354: 84-88 (1991)を参照のこと）、ペプトイド（PCT公開番号WO91/19735）、コードペプチド（PCT公開WO 93/20242）、ランダムバイオ-オリゴマー（PCT公開WO 92/00091）、ベンゾジアゼピン（米国特許第5,288,514号）、ディバーソマー（diversomer）（例えば、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド（Hobbsら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993)）、ピニルロゴアス（vinyllogous）ポリペプチド（Hagiharaら、J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568 (1992)）、-D-グルコース骨格を有する非ペプチダルペプチド模倣物（Hirschmannら、J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218 (1992)）、類似の小化合物ライブラリーの有機合成（Chenら、J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994)）、オリゴカーボネート（Choら、Science 261: 1303 (1993)）および/またはペプチジルホスホネート（Campbellら、J. Org. Chem. 59: 658 (1994)）。一般的に、Gordonら、J. Med. Chem. 37: 1385 (1994)、核酸ライブラリー（例えば、Stratagene, Corp.を参照のこと）、ペプチド核酸ライブラリー（例えば、米国特許第5,539,083号を参照のこと）、抗体ライブラリー（例えば、Vaughnら、Nature Biotechnology 14(3): 309-314 (1996)）およびPCT/US96/10287を参照のこと）、炭水化物ライブラリー（例えば、Liangら、Science 274: 1520-1522 (1996)）および米国特許第5,593,853号を参照のこと）および有機低分子ライブラリー（例えば、ベンゾジアゼピン、Baum, C & EN, Jan 18, page 33 (1993)；イソプレノイド、米国特許第5,569,588号；チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号；ピロリジン、米国特許第5,525,735号および同第5,519,134号；モルホリノ化合物、米国特許第5,506,337号；ベンゾジアゼピン、米国特許第5,288,514号；などを参照のこと。

【 0 0 4 4 】

コンビナトリアルライブラリーの調製のためのデバイスは、市販される（例えば、357 NIPS、390 NIPS、Advanced Chem Tech, Louisville KY；Symphony, Rainin, Woburn, MA；433A, Applied Biosystems, Foster City, CA；9050, Plus, Millipore, Bedford, NIA）。多数の周知のロボット利用のシステムはまた、溶液相の化学について発達している。これらのシステムとしては、自動ワークステーション（例えば、Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japan)によって開発された自動合成機）およびロボットアームを使用する多くのロボット利用システム（Zymate H, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.；Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.）（これは、化学者によって実行される手動合成操作を模倣する）が挙げられる。任意の上記のデバイスは、本発明と共の使用に適切である。これらのデバイスに対する変更の性質および実行（もしあれば、その結果、本明細書中に議論される通りに操作し得る）は、当業者に理解される。さらに、多数のコンビナトリアルライブラリーは、それら自体が市販される（例えば、ComGeneX, Princeton, NJ；Asinex, Moscow, RU；Tripos, Inc., St. Louis, MO；ChemStar, Ltd, Moscow, RU；3D Pharmaceuticals, Exton, PA；Martek Biosci

10

20

30

40

50

ences, Columbia, MD; など)。

【0045】

用語「細胞傷害性薬剤」は、細胞の発現活性、細胞の機能を阻害するかまたは防止し、そして/あるいは細胞の破壊を引き起こす物質をいう。この用語は、放射活性同位体化学療法剤および毒素(例えば、低分子毒素または細菌起源、真菌起源、植物起源または動物起源の酵素的活性毒素)(フラグメントおよび/またはその改変体を含む)を含むことが意図される。細胞傷害性試薬の例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない: アウリスタチン(auristatin)、アウロマイシン(auromycin)、マイタンシノイド(maytansinoid)、イットリウム、ピスマス、リシン、リシンA鎖、コンプレスタチン(combrestatin)、デュオカマイシン(duocarmycin)、ドロスタチン(dolostatin)、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、タキソール、シスプラチン、cc1065、エチジウムブロマイド、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン、ジフテリア毒素、Pseudomonas外毒素(PE)A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、-サルシン(sarcin)、ゲロニン(geloin)、ミトゲリン(mitogellin)、レトストリクトシン(retstrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン、クリシン(curicin)、クロチン(crotin)、カリケアマイシン(calicheamicin)、Sapaonaria officinalisインヒビター、およびグルココルチコイド、ならびに他の化学療法剤、ならびに放射性同位元素(例えばAt²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²または²¹³、P³²およびLuの放射性同位体(Lu¹⁷⁷を含む))。抗体はまた、活性形態にプロドラッグを変換し得る抗癌プロドラッグ活性化酵素に結合し得る。

【0046】

「遺伝子産物」は、時々、本明細書中でタンパク質またはmRNAと言われる。例えば、「本発明の遺伝子産物」は、時々、本明細書中で「癌アミノ酸配列」、「癌タンパク質」、「表Iに列挙される癌のタンパク質」、「癌mRNA」、「表Iに列挙される癌のmRNA」などと言われる。1つの実施形態において、癌タンパク質は、図2の核酸によってコードされる。癌タンパク質は、フラグメントであり得、または代替的に図2の核酸によってコードされるフラグメントに対する全長タンパク質であり得る。1つの実施形態において、癌アミノ酸配列を使用して、配列同一性または配列類似性を決定する。別の実施形態において、配列は、本明細書中にさらに記載されるような配列改変体である。

【0047】

特定の核酸またはタンパク質産物の存在、非存在、定量化または他の特性についての「高スループットスクリーニング」アッセイは、当業者に周知である。同様に、結合アッセイおよびレポーター遺伝子アッセイは同様に周知である。従って、米国特許第5,559,410号は、タンパク質の高スループットスクリーニング方法を開示し;米国特許第5,585,639号は、核酸結合(すなわち、アレイ中)についての高スループットスクリーニング方法を開示し;一方、米国特許第5,576,220号および同第5,541,061号は、リガンド/抗体結合のスクリーニングの高スループット方法を開示する。

【0048】

さらに、高スループットスクリーニングシステムは、市販される(例えば、Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA;などを参照のこと)。これらのシステムは、代表的に、全体の手順を自動化し、アッセイに適切な検出器において、全てのサンプルおよび試薬ピペティング、液体調剤、時限インキュベーションおよびマイクロプレートの最終読み取りを備える。これらの構成可能

な (c o n f i g u r a b l e) システムは、高スループットおよび迅速な起動ならびに可動性かつ特注の高い程度を提供する。このようなシステムの製造は、種々の高スループットシステムについて詳細なプロトコルを提供する。従って、例えば、Z y m a r k C o r p . は、遺伝子転写、リガンド結合などの調節を検出するためのスクリーニングシステムを説明する技術速報を提供する。

【 0 0 4 9 】

用語「ホモログ」は、別の分子と相同性を示す（例えば、対応する位置で同様かまたは類似である化学残基の配列を有する）分子をいう。

【 0 0 5 0 】

「ヒト白血球抗原」または「H L A」は、ヒトのクラス I またはクラス I I の主要組織適合抗原複合体 (M H C) タンパク質である（例えば、S t i t e s ら、I M M U N O L O G Y , 第 8 編 . , L a n g e P u b l i s h i n g , L o s A l t o s , C A (1 9 9 4) を参照のこと）。

【 0 0 5 1 】

ポリヌクレオチドの状況で使用される、用語「ハイブリダイズする (h y b r i d i z e)」、「ハイブリダイズする (h y b r i d i z i n g)」、「ハイブリダイズする (h y b r i d i z e s)」などは、従来のハイブリダイゼーション条件（好ましくは、例えば、50%のホルムアミド / 6 x S S C / 0.1%の S D S / 100 μ g / m l の s s D N A 中でのハイブリダイゼーション）をいうことが意味される。ここでは、ハイブリダイゼーションの温度は 37 を超え、そして 0.1 x S S C / 0.1%の S D S 中での洗浄のための温度は 55 より高い。

【 0 0 5 2 】

句「単離された」または「生物学的に純粋」は、ネイティブな状態で見出されるような物質を通常伴う構成要素を実質的にまたは本質的に含まない物質をいう。従って、本発明に従う単離されたペプチドは、好ましくはインサイチュ環境においてペプチドに通常付随する物質を含まない。例えば、ポリヌクレオチドは、161P2F10B 遺伝子以外の遺伝子に対応するかまたは相補的であるか、または 161P2F10B 遺伝子産物またはそのフラグメント以外のポリペプチドをコードする混入物のポリヌクレオチドから実質的に分離される場合、「単離される」と言われる。当業者は、単離された 161P2F10B ポリヌクレオチドを得るために核酸単離手順を容易に利用し得る。タンパク質は、例えば、物理的方法、機械的方法または化学的方法が、タンパク質に通常付随する細胞の成分から 161P2F10B タンパク質を除去するために利用される場合、「単離された」と言われる。当業者は、単離された 161P2F10B タンパク質を得るために標準的な精製方法を容易に利用し得る。あるいは、単離されたタンパク質は、化学的手段によって調製され得る。

【 0 0 5 3 】

用語「哺乳動物」は、哺乳動物（マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよびヒトを含む）に分類される任意の生物をいう。本発明の 1 つの実施形態において、哺乳動物はマウスである。本発明の別の実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【 0 0 5 4 】

用語「転移性の前立腺癌」および「転移性の疾患」は、局所的なリンパ節または離れた部位に拡大した前立腺癌を意味し、そして A U A システムのもとでのステージ D の疾患、および T N M システムのもとでのステージ T x N x M + を含むように意味される。局所的に進行した前立腺癌の症例における場合には、外科手術は、一般的には、転移性の疾患を有している患者については意図されず、そしてホルモン（アンドロゲンの切除）治療が、好ましい処置様式である。転移性の前立腺癌を有している患者は、最終的には、処置の開始の 12 ~ 18 ヶ月以内のアンドロゲン治療不応性状態を発症する。これらのアンドロゲン治療不応性の患者のほぼ半分が、その状態の発症後 6 ヶ月以内に死亡する。前立腺癌の転移の最も一般的な部位は骨である。前立腺癌の骨転移は、しばしば、骨溶解よりもむしろ骨芽細胞性（すなわち、正味の骨の形成を生じる）である。骨転移は、脊椎においても

10

20

30

40

50

っとも頻繁に見出され、大腿骨、骨盤、肋骨郭 (r i b c a g e)、頭蓋骨、および上腕骨が続く。他の一般的な転移の部位として、リンパ節、肺、肝臓、および脳が挙げられる。転移性の前立腺癌は、代表的には、開放性骨盤リンパ腺切除または腹腔鏡による骨盤リンパ腺切除、全身の放射性核種スキャン、骨格のレントゲン撮影、および/あるいは骨の病変の生検によって、診断される。

【 0 0 5 5 】

本明細書中で使用する場合、用語「モジュレーター」もしくは「試験化合物」もしくは「薬物候補」またはそれらの同義語 (g r a m m a t i c a l e q u i v a l e n t s) は、癌の表現型もしくは癌配列の発現 (例えば、核酸配列またはタンパク質配列)、または癌配列の影響 (例えば、シグナル伝達、遺伝子発現、タンパク質相互作用など) を直接的または間接的に変更する能力について試験される任意の分子 (例えば、タンパク質、オリゴペプチド、有機低分子、多糖類、ポリヌクレオチドなど) を意味する。1つの局面において、モジュレーターは、本発明の癌タンパク質の影響を中和する。「中和する」は、タンパク質の活性が、細胞に対する引き続く効果と共に、阻害またはブロックされることを意味する。別の局面において、モジュレーターは、本発明の遺伝子、およびその対応するタンパク質の影響を、そのタンパク質レベルを正常にすることによって、中和する。好ましい実施形態において、モジュレーターは、発現プロフィール、または本明細書中に提供される核酸もしくはタンパク質の発現プロフィール、または下流のエフェクター経路を変更する。1つの実施形態において、モジュレーターは、癌の表現型 (例えば、正常な組織フィンガープリントに対する表現型) を制御する。別の実施形態において、モジュレーターは、癌の表現型を誘導する。一般的に、複数のアッセイ混合物が、異なる試薬濃度で平行に実施され、種々の濃度に対する異なる応答が得られる。代表的には、これらの濃度のうちの1つが、ネガティブコントロール (すなわち、ゼロ濃度または検出レベル以下) として機能する。

【 0 0 5 6 】

モジュレーター、薬物候補、または試験化合物は、多くの化学クラスを含むが、代表的に、それらは、有機分子、好ましくは、100ダルトンより大きく約2,500ダルトンよりも小さい分子量を有する小さい有機化合物である。好ましい低分子は、2000D未満、または1500D未満または1000D未満または500D未満である。候補因子は、タンパク質との構造的相互作用 (特に、水素結合) に必要な官能基を含み、そして代表的には、少なくとも1つのアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、またはカルボキシル基を含み、好ましくは、少なくとも2つの機能的化学基を含む。候補因子は、しばしば、上記官能基の1つ以上で置換された環炭素もしくは複素環構造および/または芳香族構造もしくは多芳香族構造を含む。モジュレーターはまた、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導體、構造的アナログ、またはそれらの組み合わせのような生分子を含む。ペプチドが特に好ましい。1つのモジュレーターのクラスは、ペプチド、例えば、約5~約35アミノ酸のペプチドであり、約5~約20アミノ酸が好ましく、約7~約15アミノ酸が特に好ましい。好ましくは、癌モジュレータータンパク質は、可溶性であり、非膜貫通領域を含み、そして/または可溶性を補助するN末端Cysを有する。1つの実施形態において、フラグメントのC末端は、遊離酸として維持され、そしてN末端は、カップリング (すなわち、システインへのカップリング) を補助するために遊離アミンである。1つの実施形態において、本発明の癌タンパク質は、本明細書中で議論されるような免疫原性因子に結合体化される。1つの実施形態において、癌タンパク質は、BSAに結合体化される。本発明のポリペプチド (例えば、好ましい長さのポリペプチド) は、互いに連結されるか、または他のアミノ酸に連結され、より長いペプチド/タンパク質を生成し得る。調節ペプチドは、上記のような、天然に存在するタンパク質の消化産物、ランダムペプチド、または「偏った」ランダムペプチドであり得る。好ましい実施形態において、ペプチド/タンパク質ベースのモジュレーターは、本明細書中で定義されるような抗体およびそのフラグメントである。

【 0 0 5 7 】

癌のモジュレーターは、また、核酸であり得る。核酸調節因子は、天然に存在する核酸、ランダム核酸、または「偏った」ランダム核酸であり得る。例えば、原核生物ゲノムまたは真核生物ゲノムの消化産物は、タンパク質について上述したのと類似のアプローチで使用され得る。

【 0 0 5 8 】

用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体をいう。すなわち、この集団を含む抗体は、天然に存在するあり得る変異（少量で存在する）を除いて同一である）をいう。

【 0 0 5 9 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質の生物学的モチーフとしての「モチーフ」は、タンパク質の一次配列の一部を形成するアミノ酸の任意のパターン（特定の機能（例えば、タンパク質 - タンパク質相互作用、タンパク質 - DNA 相互作用など）、または改変（例えば、リン酸化、グリコシル化、もしくはアミド化）、または局在（例えば、分泌配列、核局在化配列など）に関連する）、あるいは免疫原性（体液性または細胞性のいずれか）と関連する配列をいう。モチーフは、一般的に特定の機能または特性に関連する特定の位置に隣接し得るか、または整列し得るかのいずれかである。HLAモチーフの文脈において、「モチーフ」とは、特定のHLA分子によって認識される、規定された長さのペプチドにおける残基（通常、クラスI HLAモチーフに対する約8～約13のアミノ酸、およびクラスII HLAモチーフに対する約6～約25のアミノ酸のペプチド）のパターンをいう。HLA結合についてのペプチドモチーフは、代表的に、各ヒトHLA対立遺伝子によってコードされる各タンパク質について異なり、そして一次アンカー残基および二次アンカー残基のパターンにおいて異なる。

【 0 0 6 0 】

「薬学的な賦形剤」とは、アジュバント、キャリア、pH調整剤および緩衝剤、等張剤、湿潤剤、保存剤などのような物質を含む。

【 0 0 6 1 】

「薬学的に受容可能な」とは、非毒性、不活性および/またはヒトもしくは他の哺乳動物と生理学的に適合する組成物をいう。

【 0 0 6 2 】

用語「ポリヌクレオチド」は、少なくとも10個の塩基または塩基対の長さのヌクレオチドの多型性の形態（リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれか、あるいはいずれかのヌクレオチドの型の改変された形態）を意味し、そして一本鎖および二本鎖の形態のDNAおよび/またはRNAを含むことを意味する。当該分野において、この用語は、必要であれば、しばしば「オリゴヌクレオチド」と相互に使用される。ポリヌクレオチドは、本明細書中で開示されたヌクレオチド配列を含み得、ここでチミジン（T）（例えば、図2に示されるような）はまたウラシル（U）であり得る。この定義は、DNAおよびRNAの化学的構造間の違い、特に4つの主な塩基のうち1つがRNAでは、チミジン（T）の代わりにウラシル（U）であるという知見に関連する。

【 0 0 6 3 】

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

【 0 0 6 4 】

HLAの「一次アンカー残基」は、免疫原性ペプチドとHLA分子との間に接触点を提供することが理解される、ペプチド配列に沿う特定の位置でのアミノ酸である。1～3つ、通常2つの、規定された長さのペプチド内の一次アンカー残基は、一般的に、免疫原性ペプチドに対する「モチーフ」を規定する。これらの残基は、HLA分子のペプチド結合グループと、この結合グループの特異的ポケットに埋め込まれたそれらの側鎖とを密接に接触して適合されることが理解される。1つの実施形態において、例えば、HLAクラス

10

20

30

40

50

I分子についての一次アンカー残基は、本発明に従って、(アミノ末端位置から)2位、そしてカルボキシ末端位置の残基ペプチドエピトープ8位、9位、10位、11位または12位に局在される。あるいは、別の実施形態において、HLAクラスII分子に結合するペプチドの一次アンカー残基は、ペプチドの末端ではなく、互いに関連して間隔を置いて配置される。ここで、ペプチドは、一般に少なくとも9アミノ酸長である。各モチーフおよびスーパーモチーフ(super motif)についての一次アンカー位置は、表IVに示される。例えば、アナログペプチドは、表IVに示される、一次アンカー位置および/または二次アンカー位置における特定の残基の存在または非存在を変更することによって作製され得る。このようなアナログは、特定のHLAモチーフまたはスーパーモチーフを含むペプチドの結合親和性および/または集団範囲(population coverage)を調節するために使用される。

10

【0065】

「放射性同位体」としては以下が挙げられるが、これらに限定されない(非限定的な例示的用途もまた示される)：

医療用アイソトープの例：

アイソトープ

使用の説明

アクチニウム - 225

(Ac - 225)

トリウム - 229 (Th - 229) 参照のこと

20

アクチニウム - 227

(Ac - 227)

癌(すなわち、乳癌および前立腺癌)および癌放射免疫療法から生じる骨格内の転移の処置、に使用する 放射体であるラジウム - 223 (Ra - 223) の親

ビスマス - 212

(Bi - 212)

トリウム - 228 (Th - 228) 参照のこと

ビスマス - 213

(Bi - 213)

トリウム - 229 (Th - 229) 参照のこと

30

カドミウム - 109

(Cd - 109)

癌検出

コバルト - 60

(Co - 60)

癌の放射線治療、食品照射、および医薬品の殺菌のための放射線源

銅 - 64

(Cu - 64)

癌治療およびSPECT画像診断に使用される陽電子放射体

銅 - 67

40

(Cu - 67)

癌放射免疫療法および診断検査(すなわち、乳癌、大腸癌およびリンパ腫)に用いられる / 放射体

ジスプロシウム - 166

(Dy - 166)

癌放射免疫療法

エルビウム - 169

(Er - 169)

特に手指および足指と結合している小さな関節についての関節リウマチ治療

ユーロピウム - 152

50

(E u - 1 5 2)	
食品照射、および医薬品の殺菌のための放射線源	
ユーロピウム - 1 5 4	
(E u - 1 5 4)	
食品照射、および医薬品の殺菌のための放射線源	
ガドリニウム - 1 5 3	
(G d - 1 5 3)	
骨粗鬆症検出および原子力の医学的品質保証デバイス	
金 - 1 9 8	
(A u - 1 9 8)	10
移植ならびに卵巣癌、前立腺癌、および脳腫瘍の腔内治療	
ホルミウム - 1 6 6	
(H o - 1 6 6)	
標的化された骨治療における多発性骨髄腫治療、癌放射免疫療法、骨髄切断、および関節	
リウマチ治療	
ヨウ素 - 1 2 5	
(I - 1 2 5)	
骨粗鬆症検出、画像診断、追跡薬物、脳癌治療、放射標識、腫瘍画像診断、脳内の受容体	
のマッピング、間質放射治療、前立腺癌治療の近接照射療法、糸球体濾過速度 (G F R)	
の測定、血漿量の測定、脚の深部静脈血栓の検出	20
ヨウ素 - 1 3 1	
(I - 1 3 1)	
甲状腺機能評価、甲状腺疾患の検出、甲状腺癌および別の非悪性甲状腺疾患 (すなわち、	
グレーブズ疾患、甲状腺腫、および甲状腺機能亢進症) の治療、癌放射免疫療法を用いた	
白血病、リンパ腫、および別の癌の形態 (例えば、乳癌) の治療	
イリジウム - 1 9 2	
(I r - 1 9 2)	
近接照射療法、脳腫瘍および脊髄腫の治療、動脈閉塞 (すなわち、動脈硬化症および再狭窄)	
の治療、ならびに胸部腫瘍および前立腺腫瘍のためのインプラント	
ルテチウム - 1 7 7	30
(L u - 1 7 7)	
癌放射免疫療法および動脈閉塞の治療 (すなわち、動脈硬化症および再狭窄)	
モリブデン - 9 9	
(M o - 9 9)	
脳、肝臓、肺、心臓、および別の器官の画像診断に使用されるテクネチウム - 9 9 m (T c - 9 9 m) の親。現在、T c - 9 9 は、脳、心臓、肝臓、肺を含む種々の癌および疾患	
の画像診断のために使用される ; また、脚の深部静脈血栓の検出に使用される放射性同位	
体のうち最も広く使用されている。	
オスミウム - 1 9 4	
(O s - 1 9 4)	40
癌放射免疫療法	
パラジウム - 1 0 3	
(P d - 1 0 3)	
前立腺癌治療	
白金 - 1 9 5 m	
(P t - 1 9 5 m)	
シスプラチン、化学療法薬物の体内分布および代謝の検査	
リン - 3 2	
(P - 3 2)	
真性多血症 (血球疾患) および白血病の治療、骨の癌の診断 / 治療 ; 結腸癌、膵臓癌、お	50

よび肝臓癌の治療；インビトロ検査のための核酸の放射標識、表面腫瘍の診断、動脈閉塞（すなわち、動脈硬化症および再狭窄）の治療、ならびに体腔内治療

リン - 33

(P - 33)

白血病治療、骨疾患の診断/治療、放射標識、および動脈閉塞（すなわち、動脈硬化症および再狭窄）の治療

ラジウム - 223

(R a - 223)

アクチニウム - 227 (A c - 227) 参照

レニウム - 186

(R e - 186)

骨の癌の疼痛の軽減、関節リウマチ治療、ならびに放射免疫療法を用いたリンパ腫、骨の癌、乳癌、結腸癌、および肝臓癌の診断、および治療

レニウム - 188

(R e - 188)

放射免疫療法を用いた癌の診断および治療、骨の癌の疼痛の軽減、慢性関節リウマチの治療、および前立腺癌の治療

ロジウム - 105

(R h - 105)

癌放射免疫療法

サマリウム - 145

(S m - 145)

眼の癌の治療

サマリウム - 153

(S m - 153)

癌放射免疫療法および骨の癌の疼痛の軽減

スカンジウム - 47

(S c - 47)

癌放射免疫療法および骨の癌の疼痛の軽減

セレンウム - 75

(S e - 75)

脳の検査に用いられる放射性トレーサー、 ^{75}Se -シンチグラフィーを用いた副腎皮質の画像診断、ステロイド分泌腫瘍の側方位置、膵臓のスキャンニング、副甲状腺機能亢進症の検出、内因性プールからの胆汁酸減少率の測定

ストロンチウム - 85

(S r - 85)

骨の癌の検出および脳のスキャン

ストロンチウム - 89

(S r - 89)

骨の癌の疼痛の軽減、多発性骨髄腫治療、および骨芽細胞の治療

テクネチウム - 99m

(T c - 99m)

モリブデン - 99 (M o - 99) 参照のこと

トリウム - 228

(T h - 228)

癌放射免疫療法に用いられる放射体であるビスマス - 212 (B i - 212) の親

トリウム - 229

(T h - 229)

癌放射免疫療法に用いられる放射体であるアクチニウム - 225 (A c - 225) の親およびビスマス - 213 (B i - 213) のグランドペアレント (grandparen

10

20

30

40

50

t)

ツリウム - 170

(T m - 170)

血液照射器のための 線源、移植用の医学的デバイスのためのエネルギー源

スズ - 117m

(S n - 117m)

癌放射免疫療法および骨の癌の疼痛の軽減

タングステン - 188

(W - 188)

癌の診断 / 治療、骨の癌の疼痛の軽減、慢性関節リウマチ治療、および動脈閉塞 (すなわち、動脈硬化症および再狭窄) の治療に使用されるレニウム - 188 (R e - 188) に対する親

10

キセノン - 127

(X e - 127)

脳障害の神経画像診断、高解像度 S P E C T 検査、肺機能検査、および脳血流検査

イッテルビウム - 175

(Y b - 175)

癌放射免疫療法

イットリウム - 90

(Y - 90)

20

肝臓癌治療のためのイットリウム - 89 (Y - 89) の照射から得られるマイクロ種

イットリウム - 91

(Y - 91)

癌放射免疫療法 (すなわち、リンパ腫、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、ならびに手術不能の肝臓癌) に使用されるイットリウム - 90 (Y - 90) の放射標識

核酸およびタンパク質において本明細書中で適用される、「無作為化 (ランダム化) (された)」、またはその文法的に等価なものは、それぞれ、核酸およびペプチドの各々が、本質的に無作為化された、ヌクレオチドおよびアミノ酸からなることを意味する。これらの無作為化されたペプチド (または、本明細書中で議論されるような核酸) は、任意の位置で任意のヌクレオチドまたはアミノ酸を取り込み得る。この合成プロセスは、無作為化したタンパク質または核酸を生成して、配列の長さ部分に亘って可能な組合せの全てまたは殆どの形成を可能にし、それによって無作為化された候補生物活性タンパク質性薬剤のライブラリーを形成するように設計され得る。

30

【 0 0 6 6 】

1つの実施形態において、ライブラリーが「完全にランダム化され」、いずれの位置においても、配列の傾向または配列の一定性は存在しない。別の実施形態において、このライブラリーは、「偏って無作為化」されたライブラリーである。すなわち、この配列内のいくつかの場所は、一定となるように保持されるかまたは、限定された確率で選択されるかのいずれかである。例えば、ヌクレオチド残基またはアミノ酸残基は、例えば、核酸結合ドメインの生成、架橋のためシステインの生成、S H 3ドメインのためのプロリン、リン酸化部位などのためのセリン、スレオニン、チロシンまたはヒスチジンなど、あるいはプリンなどに対して、疎水性アミノ酸残基、親水性アミノ酸残基、空間的に偏りをもった (小さいかまたは大きいかのいずれか) の残基である、規定されたクラスの中で無作為化される。

40

【 0 0 6 7 】

「組換え」DNA分子またはRNA分子は、インピトロでの分子操作に供されるDNA分子またはRNA分子である。

【 0 0 6 8 】

低分子の非限定的な例としては、161P2F10Bリガンドに結合または相互作用す

50

る化合物（ホルモン、神経ペプチド、ケモカイン、臭気剤、リン脂質、および結合し、そして好ましくは161P2F10Bタンパク質機能を阻害するそれらの機能等価物が挙げられる）が挙げられる。このような非限定的な低分子は、好ましくは約10kDa未満の分子量、より好ましくは約9kDa、約8kDa、約7kDa、約6kDa、約5kDaまたは約4kDa未満の分子量を有する。特定の実施形態において、低分子は、161P2F10Bタンパク質と物理的に会合するか、または161P2F10Bに結合する；天然に存在する代謝経路において見出されない；そして/または：非水溶液よりも水溶液により可溶性である。

【0069】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般的には、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験的な計算である。一般的には、より長いプローブは、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、一方、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般的には、それらの融解温度未満の環境下に相補鎖が存在する場合に、変性された核酸配列が再度アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間での所望される相同性の程度が高ければ高いほど、使用され得る相対的な温度は高くなる。結果として、より高い相対的な温度が、反応条件をよりストリンジェントにする傾向があり、一方、より低い温度はあまりそうではないという結果になる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience Publishers（1995）を参照のこと。

【0070】

「ストリンジェントな条件」、または「高ストリンジェントな条件」は、本明細書中で定義される場合は、以下によって同定され得るがこれらに限定されない：（1）洗浄のために低いイオン強度および高温（例えば、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム、50℃）を使用する；（2）変性剤（例えば、ホルムアミド）をハイブリダイゼーションの間に使用する（例えば、0.1%のウシの血清アルブミンを有する50%（v/v）のホルムアミド/0.1%のFicoll/0.1%のポリビニルピロリドン/750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウムを有するpH6.5の50mMのリン酸ナトリウム緩衝液、42℃）；または（3）50%のホルムアミド、5×SSC（0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理したサケの精子のDNA（50μg/ml）、0.1%のSDS、および10%のデキストラン硫酸を42℃で使用し、0.2×SSC（塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム）中で42℃で、そして50%のホルムアミド中で55℃で洗浄し、続いて55℃でEDTAを含有している0.1×SSCから構成される高ストリンジェンシーの洗浄が続く。「中程度のストリンジェントな条件」は、限定されないが、Sambrookら、Molecular Cloning：A Laboratory Manual、New York：Cold Spring Harbor Press、1989によって記載され、そして上記に記載されているハイブリダイゼーション条件よりもストリンジェントの低い洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度および%SDS）の使用を含む。中程度のストリンジェントの条件の例は、20%のホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸、および20mg/mlの変性された剪断されたサケの精子のDNAを含有している溶液中で37℃での一晩のインキュベーション、続く1×SSC中での約37℃～50℃でのフィルター洗浄である。当業者は、プローブの長さなどの因子に順応させることが必要とされる場合には、温度、イオン強度などを調節するための方法を認識する。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 1 】

H L A の「スーパーモチーフ」は、2つ以上のH L A 対立遺伝子によってコードされるH L A 分子によって特異的に共有されるペプチド結合である。様々な人種集団におけるH L A スーパータイプの全表現型の頻度は、表 I V (F) に示される。種々のスーパータイプの非限定的な構成要素は、以下のとおりである：

【 0 0 7 2 】

【 数 1 】

A2: A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A* 0205, A*0206, A*6802, A*6901, A*0207

A3: A3, A11, A31, A*3301, A*6801, A*0301, A*1101, A*3101

B7: B7, B*3501-03, B*51, B*5301, B*5401, B*5501, B*5502, B*5601, B*6701, B*7801, B*0702, B*5101, B*5602

10

B44: B*3701, B*4402, B*4403, B*60 (B*4001), B61 (B*4006)

A1: A*0102, A*2604, A*3601, A*4301, A*8001

A24: A*24, A*30, A*2403, A*2404, A*3002, A*3003

B27: B*1401-02, B*1503, B*1509, B*1510, B*1518, B*3801-02, B*3901, B*3902, B*3903-04, B*4801-02, B*7301,

B*2701-08

B58: B*1516, B*1517, B*5701, B*5702, B58

B62: B*4601, B52, B*1501 (B62), B*1502 (B75), B*1513 (B77)

。

20

【 0 0 7 3 】

異なるH L A スーパータイプの組み合わせによって得られる計算された集団の適用範囲は、表 I V (G) に示される。

【 0 0 7 4 】

本明細書中で使用される場合、「処置すること」または「処置的な」および文法的に関連する用語は、疾患の任意の結果（例えば、延長した生存、より少ない罹患率、および/または副作用（代替的な治療形式の副産物；疾患の完全な撲滅が必要とされない）の減少）の任意の改善をいう。

【 0 0 7 5 】

「トランスジェニック動物」（例えば、マウスまたはラット）は、導入遺伝子を含む細胞を有する動物であり、この導入遺伝子は、動物に導入されたか、または出生前（例えば、胚の段階）に動物の先祖に導入された。「導入遺伝子」は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノム中に組込まれるD N A である。

30

【 0 0 7 6 】

本明細書中で使用する場合、H L A または細胞性免疫応答「ワクチン」は、本発明の1つ以上のペプチドを含むか、またはコードする組成物をいう。このようなワクチン（例えば1つ以上の別個のペプチド；ポリエピトープペプチドによって含まれる、本発明の1つ以上のペプチド；あるいはこのような別個のペプチドまたはポリエピトープ（例えば、ポリエピトープペプチドをコードするミニ遺伝子）をコードする核酸）の多数の実施形態が存在する。「1つ以上のペプチド」は、1～150またはそれ以上（例えば、本発明の少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、もしくは150以上のペプチド）の任意の全整数単位が挙げられ得る。ペプチドまたはポリペプチドは、必要に応じて、（例えば、脂質化、標的化配列または他の配列の付加によって）改変され得る。本発明のH L A クラスI ペプチドは、細胞傷害性Tリンパ球およびヘルパーTリンパ球の両方の活性化を促進させるために、H L A クラスII 分子と混合または連結され得る。H L A ワクチンはまた、ペプチドパルス抗原

40

50

提示細胞（例えば、樹状細胞）を含み得る。

【0077】

用語「改変体」とは、記載される型または基準（例えば、特に記載されるタンパク質（例えば、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質）の対応部分に、1つ以上の異なるアミノ酸残基を有するタンパク質）からの改変を示す分子をいう。アナログは、改変タンパク質の例である。スプライシングアイソフォームおよびシングルヌクレオチド多型（SNP）は、さらなる改変体の例である。

【0078】

本発明の「161P2F10B関連タンパク質」としては、本明細書中で特異的に同定されたタンパク質、ならびに対立遺伝子改変体、（本明細書中に概説される方法または当該分野で用意に利用可能な方法に従って実験を実施することなく、単離/生成され得、そして特徴付けられ得る）保存的置換改変体、アナログおよびホモログが挙げられる。異なる161P2F10Bタンパク質またはそのフラグメントの一部分に結合する融合タンパク質、ならびに161P2F10Bタンパク質および異種ポリペプチドの融合タンパク質もまた、含まれる。このような161P2F10Bタンパク質は、本発明のタンパク質である161P2F10B関連タンパク質、または161P2F10Bとして集合的に称される。用語「161P2F10B関連タンパク質」とは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または25より多いアミノ酸；あるいは少なくとも30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650または664以上のアミノ酸の、ポリペプチドフラグメントまたは161P2F10Bタンパク質配列をいう。

【0079】

（II.）161P2F10Bポリヌクレオチド）

本発明の1つの局面は、161P2F10Bの遺伝子、mRNAおよび/またはコード配列の全てまたは一部に対応するかまたは相補的な、好ましくは単離形態のポリヌクレオチドを提供し、これには、161P2F10B関連タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそのフラグメント、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、および関連分子、161P2F10Bの遺伝子もしくはmRNA配列に相補的なポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドまたはその一部、ならびに161P2F10Bの遺伝子、mRNA、または161P2F10Bコードポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド（集合的に「161P2F10Bポリヌクレオチド」）が挙げられる。この節において参照される場合、全ての例において、Tは、図2において、Uでもあり得る。

【0080】

161P2F10Bポリヌクレオチドの実施形態としては、以下が挙げられる：図2に示される配列を有する161P2F10Bポリヌクレオチド、図2に示されるような161P2F10Bヌクレオチド配列（ここで、TはUである）；図2に示されるような配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも10個連続するヌクレオチド；または図2に示される配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも10個連続するヌクレオチド（ここで、TはUである）。例えば、161P2F10Bヌクレオチドの実施形態は、限定ではなく、以下を含む：

（I）図2に示されるような配列を含むか、実質的にこのような配列からなるか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド（ここで、TはUでもあり得る）；

（II）図2Aに示されるような配列の、ヌクレオチド残基番号44～ヌクレオチド残基番号2671（終止コドンを含む）を含むか、実質的にこのような配列からなるか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド（ここで、TはUでもあり得る）；

(I I I) 図 2 B に示されるような配列の、ヌクレオチド残基番号 4 4 ~ヌクレオチド残基番号 2 6 7 1 (終止コドンを含む) を含むか、実質的にこのような配列からなるか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド (ここで、T は U でもあり得る) ;

(I V) 図 2 C に示されるような配列の、ヌクレオチド残基番号 4 4 ~ヌクレオチド残基番号 2 6 7 1 (終止コドンを含む) を含むか、実質的にこのような配列からなるか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド (ここで、T は U でもあり得る) ;

(V) 図 2 D に示されるような配列の、ヌクレオチド残基番号 4 4 ~ヌクレオチド残基番号 2 6 7 1 (終止コドンを含む) を含むか、実質的にこのような配列からなるか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド (ここで、T は U でもあり得る) ;

(V I) 図 2 E に示されるような配列の、ヌクレオチド残基番号 4 4 ~ヌクレオチド残基番号 2 6 7 1 (終止コドンを含む) を含むか、実質的にこのような配列からなるか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド (ここで、T は U でもあり得る) ;

(V I I) 図 2 F に示されるような配列の、ヌクレオチド残基番号 8 4 ~ヌクレオチド残基番号 2 7 1 1 (終止コドンを含む) を含むか、実質的にこのような配列からなるか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド (ここで、T は U でもあり得る) ;

(V I I I) 図 2 G に示されるような配列の、ヌクレオチド残基番号 2 7 6 ~ヌクレオチド残基番号 2 8 0 1 (終止コドンを含む) を含むか、実質的にこのような配列からなるか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド (ここで、T は U でもあり得る) ;

(I X) 図 2 A ~ G に示される全長アミノ酸配列に対して少なくとも 9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 または 1 0 0 % 相同な 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質をコードするポリヌクレオチド ;

(X) 図 2 A ~ G に示される全長アミノ酸配列に対して少なくとも 9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 または 1 0 0 % 同一な 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質をコードするポリヌクレオチド ;

(X I) 表 V I I I ~ X X I および X X I I ~ X L I X に示される少なくとも 1 つのペプチドをコードするポリヌクレオチド ;

(X I I) 図 5 の親水性プロフィールにおいて 0 . 5 より大きい値を有する少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 アミノ酸位置を含む、図 3 A ~ D のペプチドの少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 アミノ酸から、8 7 5 までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド ;

(X I I I) 図 6 の疎水性プロフィールにおいて 0 . 5 より大きい値を有する 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 アミノ酸位置を含む、図 3 A ~ D のペプチドの少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 アミノ酸から、8 7 5 までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド ;

(X I V) 図 7 の接近可能残基の % プロフィールにおいて 0 . 5 より大きい値を有する 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 アミノ酸位置を含む、図 3 A ~ D のペプチドの少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 アミノ酸から、8 7 5 までの任意の整数の増分のペプチド領域をコード

10

20

30

40

50

する、ポリヌクレオチド；

(XV) 図8の平均可撓性プロフィールにおいて0.5より大きい値を有する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸位置を含む、図3A~DFのペプチドの少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸から、875までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(XVI) 図9の - ターンプロフィールにおいて0.5より大きい値を有する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸位置を含む、図3A~Dのペプチドの少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸から、875までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(XVII) 図5の親水性プロフィールにおいて0.5より大きい値を有する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸位置を含む、図3Eのペプチドの少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸から、841までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(XVIII) 図6のヒドロパシープロフィールにおいて0.5より大きい値を有する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸位置を含む、図3Eのペプチドの少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸から、841までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(XIX) 図7の接近可能残基の%プロフィールにおいて0.5より大きい値を有する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸位置を含む、図3Eのペプチドの少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸から、841までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(XX) 図8の平均可撓性プロフィールにおいて0.5より大きい値を有する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸位置を含む、図3Eのペプチドの少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸から、841までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(XXI) 図9の - ターンプロフィールにおいて0.5より大きい値を有する1、2

10

20

30

40

50

、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸位置を含む、図3Eのペプチドの少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸から、841までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(XXII) 2002年11月7日に、受託番号_____として、American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に、X41(3)15の名称で受託されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域をコードするポリヌクレオチド；

10

(XXIII) 2002年11月7日に、受託番号_____として、American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に、X41(3)29の名称で受託されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域をコードするポリヌクレオチド；

(XXIV) 2002年11月7日に、受託番号_____として、American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に、X41(3)37の名称で受託されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域をコードするポリヌクレオチド；

20

(XXV) 2002年11月7日に、受託番号_____として、American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に、X41(4)6の名称で受託されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域をコードするポリヌクレオチド；

(XXVI) 2002年11月7日に、受託番号_____として、American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に、X41(3)17の名称で受託されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域をコードするポリヌクレオチド；

30

(XXVII) 2002年11月7日に、受託番号_____として、American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に、X41(3)50の名称で受託されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域をコードするポリヌクレオチド；

(XXVII I) (I) ~ (XXVII) のいずれか1つのポリヌクレオチドに完全に相補的なポリヌクレオチド；

(XXIX) (I) ~ (XXVII) のいずれかによってコードされるペプチド；および

40

(XXX) 薬学的賦形剤と一緒にあったか、そして/またはヒトの単位投薬形態中での、(I) ~ (XXVII) のうちのいずれかのポリヌクレオチドまたは(XXIX) のペプチドを含む組成物。

【0081】

(XXX I) (I) ~ (XXVII) のうちのいずれかのポリヌクレオチドもしくは(XXIX) のペプチドまたは161P2F10bを発現する細胞を調節する方法における(XXX) の組成物を使用する方法、

(XXX II) (I) ~ (XXVII) のうちのいずれかのポリヌクレオチドもしくは(XXIX) のペプチドまたは161P2F10bを発現する細胞を有する個体を診断、

50

予防、予後もしくは処置する方法における (XXX) の組成物を使用する方法、

(XXXIII) (I) ~ (XVVI) のうちのいずれかのポリヌクレオチドもしくは (XXIX) のペプチドまたは 161P2F10b を発現する細胞 (表 I に列挙される組織の癌由来の細胞) を有する個体を診断、予防、予後もしくは処置する方法における (XXX) の組成物を使用する方法；

(XXXIV) (I) ~ (XVII) のうちのいずれかのポリヌクレオチドもしくは (XXIX) のペプチドまたは癌を診断、予防、予後もしくは処置する方法における (XXX) の組成物を使用する方法；

(XXXV) (I) ~ (XVII) のうちのいずれかのポリヌクレオチドもしくは (XXIX) のペプチドまたは表 I に列挙される組織の癌を診断、予防、予後もしくは処置する方法における (XXX) の組成物を使用する方法；および

(XXXVI) (I) ~ (XVII) のうちのいずれかのポリヌクレオチドもしくは (XXIX) のペプチドまたは 161P2F10b を発現する細胞の調節因子を同定もしくは特徴付ける方法における (XXX) の組成物を使用する方法。

【0082】

本明細書中で使用する場合、ある範囲は、その全単位位置の全てを具体的に開示することが理解される。

【0083】

本明細書中に開示される発明の代表的な実施形態としては、タンパク質および/またはそのフラグメントをコードするような 161P2F10B mRNA 配列の特定の部分をコードするその 161P2F10B ポリヌクレオチド (およびこのような配列に相補的なポリヌクレオチド) が挙げられる (例えば：

(a) 161P2F10B 変体 1 の、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、860、870、875 個またはそれ以上連続するアミノ酸；他の変体に対して関連する最長の長さは：変体 2、875 アミノ酸；変体 3、875 アミノ酸；変体 4、875 アミノ酸および変体 7、841 アミノ酸である。)

例えば、本明細書中に開示される発明の代表的な実施形態としては、以下が挙げられる：図 2 または図 3 に示されるカルボキシル末端アミノ酸の末端に約 10 アミノ酸を加えた、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 1 ~ 約アミノ酸 10 をコードする、ポリヌクレオチドおよびコードされたペプチド自体、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 10 ~ 約アミノ酸 20 をコードするポリヌクレオチド、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 20 ~ 約アミノ酸 30 をコードするポリヌクレオチド、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 30 ~ 約アミノ酸 40 をコードするポリヌクレオチド、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 40 ~ 約アミノ酸 50 をコードするポリヌクレオチド、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 50 ~ 約アミノ酸 60 をコードするポリヌクレオチド、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 60 ~ 約アミノ酸 70 をコードするポリヌクレオチド、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 70 ~ 約アミノ酸 80 をコードするポリヌクレオチド、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 80 ~ 約アミノ酸 90 をコードするポリヌクレオチド、図 2 または図 3 に示される 161P2F10B タンパク質の約アミノ酸 90 ~ 約アミノ酸 100 をコードするポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

。従って、161P2F10Bタンパク質のアミノ酸100～カルボキシル末端アミノ酸の(約10アミノ酸の)アミノ酸配列の部分をコードするポリヌクレオチドは、本発明の実施形態である。ここで、各特定のアミノ酸位置は、±5アミノ酸残基の位置を開示することが理解される。

【0084】

161P2F10Bタンパク質の比較的長い部分をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明の範囲内である。例えば、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質またはその「改変体」の、約アミノ酸1(または20または30または40など)～約アミノ酸20(または30または40または50など)をコードするポリヌクレオチドは、当該分野で周知の種々の技術によって生成され得る。これらのポリヌクレオチドフラグメントは、図2に示されるような161P2F10B配列の任意の部分を含み得る。

10

【0085】

本明細書中に開示される発明のさらなる例示的实施形態としては、161P2F10Bタンパク質配列または「改変体」配列内に含まれる1以上の生物学的モチーフをコードする161P2F10Bポリヌクレオチドフラグメントが挙げられ、これには、表VIII～XXIおよびXXII～XLIXに示される161P2F10Bタンパク質または「改変体」の、1以上のモチーフ保有部分配列が挙げられる。別の実施形態において、本発明の代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、既知の分子に対する相同性を示す161P2F10Bのタンパク質または改変体の、1以上の領域をコードする。本発明の別の実施形態において、代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、161P2F10Bのタンパク質または改変体のN-グリコシル化部位、cAMP依存性およびcGMP依存性のプロテインキナーゼリン酸化部位、カゼインキナーゼIIリン酸化部位またはN-ミリスチル化部位、ならびにアミド化部位のうち1以上をコードし得る。

20

【0086】

その親タンパク質(例えば、改変体1、改変体2など)に対する、表VIII～XXIおよび表XXII～XLIX(集合的に、HLAペプチド表)に示される任意のペプチドのそれぞれの出発位置を決定するために、以下の3つの因子について言及がなされることに留意のこと:特定の改変体、HLAペプチド表中のペプチドの長さ、表LVIIに列挙される検索ペプチド。一般に、独自の検索ペプチドが、特定の改変体についてのHLAペプチドを得るために使用される。そのそれぞれの親分子に関する各検索ペプチドの位置は、表VIIIに列挙される。従って、検索ペプチドが位置「X」で開始する場合、それらの親分子中のHLAペプチドの実際の位置を得るために、表VIII～XXIおよび表XXII～XLIX中の各位置に、「X-1」の値を加算しなければならない。例えば、特定の検索ペプチドがその親分子の位置150にて開始する場合、親分子中のアミノ酸の位置を計算するために、150-1(すなわち、149)を、各HLAペプチドのアミノ酸位置に加算しなければならない。

30

【0087】

(II.A.)161P2F10Bポリヌクレオチドの用途)

(II.A.1.)遺伝子異常のモニタリング)

上記項目のポリヌクレオチドは、多数の異なる特定の用途を有する。ヒト161P2F10B遺伝子は、「161P2F10Bの染色体マッピング」との表題の実施例において示される染色体位置にマッピングされる。例えば、161P2F10B遺伝子は、この染色体にマッピングされるので、161P2F10Bタンパク質の異なる領域をコードするポリヌクレオチドは、この染色体位置の細胞発生異常(例えば、種々の癌に関連するとして同定された異常)を特徴付けるために使用される。特定の遺伝子において、再編成を含む種々の染色体異常が、多数の異なる癌における頻繁な細胞発生的異常として同定されている(例えば、Krajnovicら、Mutat. Res. 382(3-4):81-83(1998); Johanssonら、Blood 86(10):3905-3914(1995)およびFingerら、P.N.A.S. 85(23):9158-9162(1988)を参照のこと)。従って、161P2F10Bタンパク質の特定の

40

50

領域をコードするポリヌクレオチドは、悪性の表現型に寄与し得る、161P2F10Bをコードする染色体領域における細胞発生的異常を説明するために使用され得る、以前に可能であったツールよりもより正確な、新たなツールを提供する。この文脈において、これらのポリヌクレオチドは、より微妙な染色体異常およびあまり一般的でない染色体異常を同定するために、染色体スクリーニングの感受性を拡大することについての、当該分野における必要性を満たす(例えば、Evansら、Am. J. Obstet. Gynecol. 171(4):1055-1057(1994)を参照のこと)。

【0088】

さらに、161P2F10Bは、膀胱癌および他の癌において高度に発現されることが示されているので、161P2F10Bポリヌクレオチドは、正常組織対癌性組織における161P2F10B遺伝子産物の状態を評価する方法において使用される。代表的に、161P2F10Bタンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドは、161P2F10B遺伝子の特定の領域(例えば、1以上のモチーフを含む領域)における乱れ(例えば、抗原の喪失などを生じる欠失、挿入、点変異または改変)の存在を評価するために使用される。例示的なアッセイとしては、RT-PCRアッセイおよび一本鎖コンホメーション多型(SSCP)分析(例えば、Marroggiら、J. Cutan. Pathol. 26(8):369-378(1999)を参照のこと)の両方が挙げられ、これらは両方も、タンパク質内のこれらの領域を試験するために、タンパク質内の特定の領域をコードするポリヌクレオチドを利用する。

【0089】

(II.A.2.) アンチセンスの実施形態)

本明細書中に開示される本発明の、他の具体的に企図された核酸に関する実施形態は、ゲノムDNA、cDNA、リボザイムおよびアンチセンス分子、ならびに天然供給源由来であるか合成であるかにかかわらず、代替骨格に基づく核酸分子または代替塩基を含む核酸分子であり、そしてこれには、161P2F10BのRNA発現またはタンパク質発現を阻害し得る分子が含まれる。例えば、アンチセンス分子は、塩基対依存的な様式でDNAまたはRNAに特異的に結合する、ペプチド核酸(PNA)または非核酸分子(例えば、ホスホロチオエート誘導体)を含む、RNAまたは他の分子であり得る。当業者は、本明細書中に開示される161P2F10Bのポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド配列を使用して、これらのクラスの核酸分子を容易に獲得し得る。

【0090】

アンチセンス技術は、細胞内に位置する標的ポリヌクレオチドに結合する外因性オリゴヌクレオチドの投与を伴う。用語「アンチセンス」は、このようなオリゴヌクレオチドが、その細胞内標的(例えば、161P2F10B)に相補的であるという事実をいう。例えば、Jack Cohen、Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression、CRC Press、1989;およびSynthesis 1:1-5(1988)を参照のこと。本発明の161P2F10Bアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、誘導体(例えば、S-オリゴヌクレオチド(ホスホロチオエート誘導体またはS-オリゴ、Jack Cohen(前出)を参照のこと)が挙げられ、これは、増強された癌細胞増殖阻害活性を示す。S-オリゴ(ヌクレオシドホスホロチオエート)は、リン酸基の非架橋酸素原子が硫黄原子によって置換されている、オリゴヌクレオチド(O-オリゴ)の等電子アナログである。本発明のS-オリゴは、3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン-1,1-ジオキシド(これは、硫黄転移試薬である)での対応するO-オリゴの処理によって調製され得る。例えば、Iyer, R.P.ら、J. Org. Chem. 55:4693-4698(1990);およびIyer, R.P.ら、J. Am. Chem. Soc. 112:1253-1254(1990)。本発明のさらなる161P2F10Bアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、当該分野で公知のモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる(例えば、Partridgeら、1996、Antisense & Nucleic Acid Drug Development 6:169

- 175を参照のこと)。

【0091】

本発明の161P2F10Bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、代表的に、161P2F10Bゲノム配列または対応するmRNAの最初の100個の5'側コドンまたは最後の100個の3'側コドンに相補的であり、かつこれらと安定にハイブリダイズする、RNAまたはDNAであり得る。完全な相補性は必要ないが、高度な相補性が好ましい。この領域に相補的なオリゴヌクレオチドの使用によって、161P2F10B mRNAへの選択的なハイブリダイゼーションは可能になるが、プロテインキナーゼの他の調節サブユニットを指定するmRNAへの選択的なハイブリダイゼーションは可能にならない。1つの実施形態において、本発明の161P2F10Bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、161P2F10B mRNAにハイブリダイズする配列を有するアンチセンスDNA分子の15~30マーのフラグメントである。必要に応じて、161P2F10Bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、161P2F10Bの最初の10個の5'側コドンまたは最後の10個の3'側コドン中の領域に相補的な30マーのオリゴヌクレオチドである。あるいは、このアンチセンス分子は、161P2F10B発現の阻害においてリボザイムを使用するように改変される(例えば、L.A. Couture & D.T. Stinchcomb; Trends Genet 12:510-515(1996)を参照のこと)。

10

【0092】

(II.A.3.)プライマーおよびプライマー対)

20

本発明のこのヌクレオチドのさらに特定の実施形態としては、プライマーおよびプライマー対(これらは、本発明のポリヌクレオチドまたはその任意の特定の部分の特異的増幅を可能にする)、ならびにプローブ(これは、本発明の核酸分子またはその任意の部分に選択的にかまたは特異的にハイブリダイズする)が挙げられる。プローブは、検出可能なマーカー(例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生体発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素)で標識され得る。このようなプローブおよびプライマーは、サンプル中の161P2F10Bポリヌクレオチドの存在を検出するため、および161P2F10Bタンパク質を発現する細胞を検出するための手段として使用される。

【0093】

このようなプローブの例としては、図2に示されるヒト161P2F10B cDNA配列の全てまたは一部を含むポリヌクレオチドが挙げられる。161P2F10B mRNAを特異的に増幅し得るプライマー対の例もまた、実施例に記載される。当業者によって理解されるように、非常に多数の異なるプライマーおよびプローブが、本明細書中に提供される配列に基づいて調製され得、そして161P2F10B mRNAを増幅および/または検出するために有効に使用され得る。

30

【0094】

本発明の161P2F10Bポリヌクレオチドは、種々の目的のために有用であり、その用途としては、限定ではなく以下が挙げられる: 161P2F10B遺伝子、mRNAもしくはそのフラグメントの増幅および/または検出のためのプローブおよびプライマーとして; 前立腺癌および他の癌の診断および/または予後のための試薬として; 161P2F10Bポリペプチドの発現を指向し得るコード配列として; 161P2F10B遺伝子の発現および/または161P2F10B転写物の翻訳を調節または阻害するためのツールとして; そして治療剤として。

40

【0095】

本発明は、天然に存在する供給源(例えば、ヒトまたは他の哺乳動物)由来の161P2F10B核酸配列または161P2F10B関連核酸配列を同定および単離するための、本明細書中に記載されるような任意のプローブの使用、ならびに単離された核酸配列自体(これは、使用されるプローブ中に見出される配列の全てまたはほとんどを含む)を包含する。

【0096】

50

(I I . A . 4 .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B コード核酸分子の単離)

本明細書中に記載される 1 6 1 P 2 F 1 0 B cDNA 配列は、1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子産物をコードする他のポリヌクレオチドの単離、ならびに 1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子産物ホモログ、選択的スプライシングされたアイソフォーム、対立遺伝子改変体および 1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子産物の変異形態をコードするポリヌクレオチドの単離、ならびに 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質のアナログをコードするポリヌクレオチドの単離を可能にする。1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子をコードする全長 cDNA を単離するために使用され得る種々の分子クローニング方法が周知である (例えば、Sambrook, J. ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Press、New York、1989 ; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel ら (編)、Wiley and Sons、1995 を参照のこと)。例えば、ファージクローニング方法論は、市販のクローニングシステム (例えば、Lambda ZAP Express、Stratagene) を使用して、簡便に使用され得る。1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子の cDNA を含むファージクローンは、標識された 1 6 1 P 2 F 1 0 B cDNA またはそのフラグメントを用いて探索することによって、同定され得る。例えば、1 つの実施形態において、1 6 1 P 2 F 1 0 B cDNA (例えば、図 2) またはその一部が、合成され得、そして 1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子に対する重複および 1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子に対応する全長 cDNA を検索するためのプローブとして使用され得る。1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子自体は、ゲノム DNA ライブラリー、細菌人工染色体ライブラリー (BAC)、酵母人工染色体ライブラリー (YAC) などを、1 6 1 P 2 F 1 0 B DNA のプローブまたはプライマーを用いてスクリーニングすることによって、単離され得る。

【 0 0 9 7 】

(I I . A . 5 .) 組換え核酸分子および宿主 - ベクター系)

本発明はまた、1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチド、そのフラグメント、アナログ、またはホモログを含む組換え DNA 分子または RNA 分子 (ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、YAC、BAC、ならびに当該分野で周知の種々のウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含むがこれらに限定されない)、およびこのような組換え DNA 分子または RNA 分子で形質転換またはトランスフェクトされた細胞を提供する。このような分子を生成する方法は、周知である (例えば、Sambrook ら、1989、前出を参照のこと)。

【 0 0 9 8 】

本発明はさらに、適切な原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞中に 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチド、そのフラグメント、アナログ、またはホモログを含む組換え DNA 分子を含む、宿主 - ベクター系を提供する。適切な真核生物宿主細胞の例としては、酵母細胞、植物細胞、または動物細胞 (例えば、哺乳動物細胞または昆虫細胞 (例えば、Sf9 細胞または High Five 細胞のようなバキュロウイルス感染性細胞)) が挙げられる。適切な哺乳動物細胞の例としては、種々の前立腺癌細胞株 (例えば、DU145 および TsuPr1)、他のトランスフェクト可能または形質導入可能な前立腺癌細胞株、一次細胞 (PREC)、および組換えタンパク質の発現のために慣用的に使用される多くの哺乳動物細胞 (例えば、COS 細胞、CHO 細胞、293 細胞、293T 細胞) が挙げられる。より詳細には、1 6 1 P 2 F 1 0 B のコード配列を含むポリヌクレオチド、またはそのフラグメント、アナログ、もしくはホモログは、当該分野で慣用的に使用され、そして広範に知られている任意の数の宿主 - ベクター系を用いて、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質またはそのフラグメントを生成するために使用され得る。

【 0 0 9 9 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質またはそのフラグメントの発現に適切な広範な範囲の宿主 - ベクター系が利用可能である (例えば、Sambrook ら、1989、前出 ; Cu

10

20

30

40

50

urrent Protocols in Molecular Biology、1995、前出を参照のこと)。哺乳動物での発現に好ましいベクターとしては、pcDNA3.1 myc-His-tag (Invitrogen) およびレトロウイルスベクター pSR tkneo (Mullerら、1991、MCB 11:1785) が挙げられるがこれらに限定されない。これらの発現ベクターを用いて、161P2F10Bは、いくつかの前立腺癌細胞株および非前立腺細胞株 (例えば、293、293T、rat-1、NIH3T3、およびTsuPr1を含む) において発現され得る。本発明の宿主-ベクター系は、161P2F10Bタンパク質またはそのフラグメントを生成するのに有用である。このような宿主-ベクター系は、161P2F10Bおよび161P2F10B変異体もしくはアナログの機能的特性を研究するために使用され得る。

10

【0100】

組換えヒト161P2F10Bタンパク質またはそのアナログもしくはホモログもしくはフラグメントは、161P2F10B関連ヌクレオチドをコードする構築物でトランスフェクトされた哺乳動物細胞により産生され得る。例えば、293T細胞は、161P2F10Bまたはそのフラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする発現プラスミドでトランスフェクトされ得、161P2F10B関連タンパク質が、293T細胞中で発現され、そして組換え161P2F10Bタンパク質が、標準的な精製方法 (例えば、抗161P2F10B抗体を用いるアフィニティー精製) を用いて単離される。別の実施形態において、161P2F10Bコード配列は、レトロウイルスベクター pSR MSV tkneo 中にサブクロニングされ、そして161P2F10B発現細胞株を樹立

20

【0101】

本明細書中で議論されるように、遺伝コードの重複性は、161P2F10B遺伝子配列におけるバリエーションを許容する。詳細には、特定の宿主種は、しばしば、特定のコードン優先性を有することが、当該分野で公知であり、従って、当業者は、開示された配列を、所望の宿主で優先されるよう適合し得る。例えば、優先されるアナログコードン配列は、代表的に、より高頻度のコードンと置きかえられた稀なコードン (すなわち、所望の宿主の公知の配列において約20%未満の使用頻度を有するコードン) を有する。特定種について

30

のコードン優先性は、例えば、インターネット上 (例えば、URL dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html) で利用可能なコードン使用表を用いることによって算出される。

【0102】

さらなる配列の改変は、細胞性宿主におけるタンパク質発現を増強することが知られている。これらとしては、偽ポリアデニル化シグナルをコードする配列の除去、エキソン/イントロンスプライス部位シグナル、トランスポゾン様反復、および/または遺伝子発現に対して有害な他のこのような十分特徴付けられた配列が挙げられる。配列のGC含量は、所定の細胞性宿主について平均的なレベル (その宿主細胞において発現される公知の遺伝子を参照することによって算出される) に調整される。可能な場合、配列は、予測されるヘアピン二次mRNA構造を回避するよう改変される。他の有用な改変としては、Kozak、Mol. Cell. Biol.、9:5073-5080 (1989) に記載されるような、オープンリーディングフレームの開始点での翻訳開始コンセンサス配列の追加が挙げられる。当業者は、真核生物リボソームが5'近位のAUGコードンで排他的に翻訳を開始という一般的な役割が、稀な条件下でのみ排除されることを理解する (例えば、Kozak PNAS 92(7):2662-2666、(1995) およびKozak NAR 15(20):8125-8148 (1987) を参照のこと)。

40

50

【 0 1 0 3 】

(I I I .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質)

本発明の別の局面は、1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質を提供する。1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質の特定の実施形態は、図 2 または図 3 に示されるようなヒト 1 6 1 P 2 F 1 0 B のアミノ酸配列の全てまたは一部を有するポリペプチドを包含する。あるいは、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質の実施形態は、図 2 または図 3 に示される 1 6 1 P 2 F 1 0 B のアミノ酸配列中に変更を有する改変体、ホモログ、またはアナログポリペプチドを包含する。

【 0 1 0 4 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチドの実施形態は、以下を含む：図 2 に示される配列を有する 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチド、図 2 に示される 1 6 1 P 2 F 1 0 B のペプチド配列（ここで、T は U）；図 2 に示される配列を有するポリペプチドの、少なくとも 10 個の連続したヌクレオチド；または図 2 に示される配列を有するポリペプチドの、少なくとも 10 個の連続したペプチド（ここで T は U）。例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B ペプチドの実施形態は、限定しないが、以下を含む。

10

【 0 1 0 5 】

(I) 図 2 A - G または図 3 A - E に示されるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらのアミノ酸配列からなるかまたは、それらのアミノ酸配列からなるタンパク質；

(I I) 図 2 A - G に示されるアミノ酸配列全体と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 相同な 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質；

20

(I I I) 図 2 A - G または図 3 A - E に示されるアミノ酸配列全体と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質；

(I V) 表 V I I I ~ X L I X に記載の少なくとも 1 つのペプチド（ただし、必要に応じて、このタンパク質は、図 2 のタンパク質全体ではない）を含むタンパク質；

(V) まとめて、表 V I I I ~ X X I に記載の少なくとも 1 つのペプチドを含むタンパク質であり、このペプチドはまた、まとめて、表 X X I I ~ X L I X に記載され、ただし、このタンパク質は、必要に応じて図 2 のタンパク質全体ではない；

(V I) 表 V I I I ~ X L I X に記載のペプチドから選択される少なくとも 2 つのペプチドを含むタンパク質（ただし、必要に応じて、このタンパク質は、図 2 のタンパク質全体ではない）；

30

(V I I) まとめて、表 V I I I ~ X L I X に記載のペプチドから選択される少なくとも 2 つのペプチドを含むタンパク質（ただし、このタンパク質は、図 2 のアミノ酸配列由来の連続配列ではない）；

(V I I I) 表 V I I I ~ X X I に記載のペプチドから選択される少なくとも 1 つのペプチドを含むタンパク質；および表 X X I I ~ X L I X に記載のペプチドから選択される少なくとも 1 つのペプチドを含むタンパク質であって、ただし、このタンパク質は、図 2 のアミノ酸配列由来の連続配列ではない。

【 0 1 0 6 】

(I X) 図 3 A、3 B、3 C、3 D、または 3 E（任意の全数の増加がそれぞれ 8 7 5、8 7 5、8 7 5、8 7 5 または 8 4 1 まで）のタンパク質の、少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 アミノ酸を含むポリペプチドであって、このペプチドは、図 5 の親水性プロフィールにおいて 0.5 より大きい値を有する少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 のアミノ酸位置を含む。

40

【 0 1 0 7 】

50

(X) 図3A、3B、3C、3D、または3E (任意の全数の増加がそれぞれ875、875、875、875または841まで) のタンパク質の少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35個のアミノ酸を含むポリペプチドであって、このポリペプチドは、図6のヒドロパシーロフィール (Hydrophobicity profile) において0.5未満の値を有する、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35のアミノ酸位置を含む。

【0108】

10

(XI) 図3A、3B、3C、3D、または3E (任意の全数の増加がそれぞれ875、875、875、875または841まで) のタンパク質の、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸を含むポリペプチドであって、このポリペプチドは、図7のパーセントアセンブリ残基プロフィールにおいて0.5より大きい値を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35のアミノ酸位置を含む。

【0109】

20

(XII) 図3A、3B、3C、3D、または3E (任意の全数の増加がそれぞれ875、875、875、875または841まで) のタンパク質の、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸を含むポリペプチドであって、このポリペプチドは、図8の平均可撓性プロフィールにおいて0.5より大きい値を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35のアミノ酸位置を含む。

【0110】

30

(XIII) 図3A、3B、3C、3D、または3E (任意の全数の増加がそれぞれ875、875、875、875または841まで) のタンパク質の少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35アミノ酸を含むポリペプチドであって、このポリペプチドは、図9のターンプロフィールにおいて0.5より大きい値を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35のアミノ酸位置を含む。

【0111】

40

(XIV) まとめて、表VIIII~XXIおよび表XXII~XLIX中に少なくとも2回現れるペプチド；

(XV) まとめて、表VIIII~XXIおよび表XXII~XLIX中に少なくとも3回現れるペプチド；

(XVI) まとめて、表VIIII~XXIおよび表XXII~XLIX中に少なくとも4回現れるペプチド；

(XVII) まとめて、表VIIII~XXIおよび表XXII~XLIX中に少なくとも5回現れるペプチド；

(XVIII) 表VIIII~XXI中に少なくとも1回、そして表XXII~XLIX中に少なくとも1回現れるペプチド；

50

(X I X) 表 V I I I ~ X X I 中に少なくとも 1 回、そして表 X X I I ~ X L I X 中に少なくとも 2 回現れるペプチド；

(X X) 表 V I I I ~ X X I 中に少なくとも 2 回、そして表 X X I I ~ X L I X 中に少なくとも 1 回現れるペプチド；

(X X I) 表 V I I I ~ X X I 中に少なくとも 2 回、そして表 X X I I ~ X L I X 中に少なくとも 2 回現れるペプチド；

(X X I I) 以下の特徴の 1 個、2 個、3 個、4 個、または 5 個を含むかまたは、そのようなペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを含むペプチド；

i) 図 3 の特定のペプチドの少なくとも 5 アミノ酸の領域 (図 3 におけるタンパク質の全長までの任意の全数の増加において) であって、この領域は、図 5 の親水性プロファイルにおいて、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 と等しいかもしくはこれらの値より大きい値を有するか、または 1.0 と等しい値を有するアミノ酸位置を含む；

i i) 図 3 の特定のペプチドの少なくとも 5 アミノ酸の領域 (図 3 におけるタンパク質の全長までの任意の全数の増加において) であって、この領域は、図 6 のヒドロパシープロファイルにおいて、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 と等しいかもしくはこれらの値より小さい値を有するか、または 0.0 と等しい値を有するアミノ酸位置を含む；

i i i) 図 3 の特定のペプチドの少なくとも 5 アミノ酸の領域 (図 3 におけるタンパク質の全長までの任意の全数の増加において) であって、この領域は、図 7 のパーセントアセンブリ残基プロファイルにおいて、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 と等しいかもしくは、これらの値より大きい値を有するか、または 1.0 と等しい値を有するアミノ酸位置を含む；

i v) 図 3 の特定のペプチドの少なくとも 5 アミノ酸の領域 (図 3 におけるタンパク質の全長までの任意の全数の増加において) であって、この領域は、図 8 の平均可携性プロファイルにおいて、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 と等しいかもしくは、これらの値より大きい値を有するか、または 1.0 と等しい値を有するアミノ酸位置を含む；

v) 図 3 の特定のペプチドの少なくとも 5 アミノ酸の領域 (図 3 におけるタンパク質の全長までの任意の全数の増加において) であって、この領域は、図 9 の ターンプロファイルにおいて、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 と等しいかもしくは、これらの値より大きい値を有するか、または 1.0 と等しい値を有するアミノ酸位置を含む；

(X X I I I) 2002 年 11 月 7 日にアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110 - 2209 USA) で受託されまた、アクセス番号 _____ として割り当てられた X41(3)15 と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；

(X X I V) 2002 年 11 月 7 日にアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110 - 2209 USA) に受託されまた、アクセス番号 _____ として割り当てられた X41(3)29 と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；

(X X V) 2002 年 11 月 7 日にアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110 - 2209 USA) に受託されまた、アクセス番号 _____ として割り当てられた X41(3)37 と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；

(X X V I) 2002 年 11 月 7 日にアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110 - 2209 USA) に受託されまた、アクセス番号 _____ として割り当てられ

10

20

30

40

50

たX41(4)6と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；

(XXVII) 2002年11月7日にアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)に受託されまた、アクセス番号_____として割り当てられたX41(3)17と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；

(XXVIII) 2002年11月7日にアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)に受託されまた、アクセス番号_____として割り当てられたX41(3)50と命名されたハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体またはその結合領域；

(XXIX) 薬学的賦形剤共に、かつ/またはヒト単位容量形態で、(I)~(XXII)のペプチドまたは、(XXIII~XXVIII)の抗体もしくはその結合領域を含む、組成物、

(XXX) 161P2F10bを発現する細胞を調節するための方法における、(I)~(XXII)のペプチド、または(XXIII~XXVIII)の抗体もしくはその結合領域または(XXX)の組成物を用いる、方法、

(XXXI) 161P2F10bを発現する細胞を有する個体を診断、予防、予知または処置するための方法における、(I)~(XXII)のペプチド、または(XXIII~XXVIII)の抗体もしくはその結合領域、または(XXX)の組成物を用いる、方法、

(XXXII) 161P2F10bを発現する細胞(表Iに列挙される組織の癌からの前記の細胞)を有する個体の診断、予防、予知、または処置するための方法における、(I)~(XXII)のペプチド、または(XXIII~XXVIII)の抗体もしくはその結合領域、あるいは(XXX)の組成物を用いる、方法、

(XXXIII) 癌を診断、予防、予知、または処置するための方法における、(I)~(XXII)のペプチド、または(XXIII~XXVIII)の抗体もしくはその結合領域、または(XXX)の組成物を用いる、方法、

(XXXIV) 表Iに列挙される組織の癌の診断、予防、予知、または処置するための方法における、(I)~(XXII)のペプチド、または(XXIII~XXVIII)の抗体もしくはその結合領域、または(XXX)の組成物を用いた、方法、および、

(XXXV) 161P2F10bを発現する細胞の調節因子を同定するか、または特徴付けるための方法における、(I)~(XXII)のペプチド、または(XXIII~XXVIII)の抗体もしくはその結合領域、または(XXX)の組成物を用いる、方法。

【0112】

本明細書中で使用する場合、ある範囲は、その全単位位置の全てを具体的に開示することが理解される。

【0113】

本明細書中に開示される発明の代表的な実施形態としては、160P2F10BのmRNA配列の特定の部分をコードする160P2F10Bポリヌクレオチド(およびこのような配列に相補的なポリヌクレオチド)が挙げられる(例えば、(a)160P2F10B変異体1の、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750

10

20

30

40

50

、775、800、825、850、860、870、875またはそれ以上の連続するアミノ酸の、タンパク質および/またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；他の変異体に関する最大長は：変異体2では、875アミノ酸；変異体3では875アミノ酸；変異体4では875；変異体7では841アミノ酸である）。

【0114】

一般的に、ヒト161P2F10Bの天然に存在する対立遺伝子改変体は、高い程度の構造的同一性および相同性（例えば、90%以上の相同性）を共有する。代表的に、161P2F10Bタンパク質の対立遺伝子改変体は、本明細書中に記載される161P2F10B配列中に保存的アミノ酸置換を含むか、または161P2F10Bのホモログにおいて対応する位置からのアミノ酸の置換を含む。161P2F10B対立遺伝子改変体の1つのクラスは、特定の161P2F10Bアミノ酸配列の少なくとも小部分と高い程度の相同性を共有するが、その配列由来の根本的な逸脱（例えば、非保存的置換、短縮、挿入、またはフレームシフト）をさらに含むタンパク質である。タンパク質配列の比較において、用語、類似性、同一性、および相同性は、各々、遺伝学分野で理解されるのと別個の意味を有する。さらに、オルソロジーおよびパラロジーは、ある生物における所定のタンパク質ファミリーのメンバーの、他の生物における同じファミリーのメンバーに対する関係を記載する重要な概念であり得る。

【0115】

アミノ酸略号は、表IIに提供される。保存的アミノ酸置換は、しばしば、そのタンパク質のコンホメーションまたは機能のいずれも変更することなくタンパク質中で起こり得る。本発明のタンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15の保存的置換を含み得る。このような変更としては、イソロイシン（I）、バリン（V）、およびロイシン（L）のいずれかの、これらの疎水性アミノ酸の他のいずれかでの置換；グルタミン酸（E）でのアスパラギン酸（D）の置換およびその逆；アスパラギン（N）でのグルタミン（Q）の置換およびその逆；ならびにスレオニン（T）でのセリン（S）の置換およびその逆が挙げられる。他の置換もまた、特定のアミノ酸の環境およびそのタンパク質の三次元構造におけるその役割に依存して、保存的であるとみなされ得る。例えば、グリシン（G）およびアラニン（A）は、しばしば、交換可能であり得、アラニン（A）およびバリン（V）も同様であり得る。比較的疎水性のメチオニン（M）は、しばしば、ロイシンおよびイソロイシンと交換され得、そして時々、バリンと交換され得る。リジン（K）およびアルギニン（R）は、しばしば、そのアミノ酸残基の重要な特徴がその電荷であり、これら2つのアミノ酸残基の異なるpKが重要な位置で交換可能である。さらに他の変更は、特定の環境で「保存的」とであるとみなされ得る（例えば、本明細書中の表III；13～15頁「Biochemistry」第2版、Lubert Stryer編（Stanford University）；Henikoffら、PNAS 1992 Vol 89 10915-10919；Leiraら、J Biol Chem 1995年5月19日；270（20）：11882-6を参照のこと）。

【0116】

本明細書中に開示される発明の実施形態として、161P2F10Bタンパク質の広範な種々の当該分野で受け入れられる改変体またはアナログ（例えば、アミノ酸の挿入、欠失、および置換を有するポリペプチド）が挙げられる。161P2F10B改変体は、当該分野で公知の方法（例えば、部位特異的変異誘発、アラニンスキヤニング、およびPCR変異誘発）を用いて作製され得る。部位特異的変異誘発（Carterら、Nucl. Acids Res.、13：4331（1986）；Zollerら、Nucl. Acids Res.、10：6487（1987））、カセット変異誘発（Wellsら、Gene、34：315（1985））、制限選択変異誘発（Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A、317：415（1986））、または他の公知の技術が、161P2F10B改変体DNAを生成するために、クローニングしたDNAにおいて実施され得る。

【0117】

スキャンニングアミノ酸分析はまた、特定の生物学的活性（例えば、タンパク質 - タンパク質相互作用）に関連する連続配列に沿って1つ以上のアミノ酸を同定するのに使用され得る。比較的小さく、中性のアミノ酸が、好ましいスキャンニングアミノ酸に含まれる。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが挙げられる。アラニンは、代表的に、この群の中で好ましいスキャンニングアミノ酸である。なぜならば、アラニンは、炭素の後ろの側鎖を排除し、そして改変体の主鎖のコンホメーションを変更する可能性がより低いからである。アラニンはまた、代表的に、それが、最も一般的なアミノ酸であるので好ましい。さらに、アラニンは、しばしば、埋もれた位置および露出した位置の両方において見出される（Creighton, *The Proteins*, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)）。アラニン置換が、十分な量の改変体を生じない場合、等比体積のアミノ酸が使用され得る。

10

【0118】

本明細書中で規定される場合、161P2F10B改変体、アナログ、またはホモログは、図3のアミノ酸配列を有する161P2F10Bタンパク質と「交叉反応性」である少なくとも1つのエピトープを有するという特徴的な特性を有する。この文で使用される場合、「交叉反応性」は、161P2F10B改変体に特異的に結合する抗体またはT細胞がまた、図3に示されるアミノ酸配列を有する161P2F10Bタンパク質に特異的に結合することを意味する。ポリペプチドは、出発161P2F10Bタンパク質に特異的に結合する抗体またはT細胞により認識され得るいかなるエピトープも含まない場合、図3に示すタンパク質の改変体でなくなる。当業者は、タンパク質を認識する抗体が、異なる大きさのエピトープに結合し、そして約4または5アミノ酸オーダーの一群（連続していようとしていまいと）が、最小エピトープにおける代表的な数のアミノ酸とみなされることを理解する。例えば、Nairら、*J. Immunol* 2000 165(12):6949-6955; Hebbesら、*Mol Immunol* (1989) 26(9):865-73; Schwartzら、*J. Immunol* (1985) 135(4):2598-608を参照のこと。

20

【0119】

別のクラスの161P2F10B関連タンパク質改変体は、図3のアミノ酸配列またはそのフラグメントと、70%、75%、80%、85%、または90%以上の類似性を共有する。別の特定のクラスの161P2F10Bタンパク質改変体またはアナログは、本明細書中に記載されるかまたは当該分野で現在公知の161P2F10Bの生物学的モチーフの1つ以上を含む。従って、出発フラグメントと比較して変更された機能的（例えば、免疫原性）特性を有する161P2F10Bフラグメント（核酸またはアミノ酸）のアナログは、本発明に包含される。現在当該分野の一部であるかまたは当該分野の一部となるモチーフが図2または図3の核酸配列またはアミノ酸配列に適用されることが理解される。

30

【0120】

本明細書中で議論されるように、本発明の実施形態は、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質の全長未満のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。例えば、本発明の代表的な実施形態は、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質の任意の4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上の連続するアミノ酸を有するペプチド/タンパク質を含む。

40

【0121】

さらに、本明細書中に開示される本発明の代表的な実施形態は、161P2F10Bアミノ酸配列全体を通して、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約1～アミノ酸約10からなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約10～アミノ酸約20からなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約20～アミノ酸約30か

50

らなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約30～アミノ酸約40からなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約40～アミノ酸約50からなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約50～アミノ酸約60からなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約60～アミノ酸約70からなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約70～アミノ酸約80からなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約80～アミノ酸約90からなるポリペプチド、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約90～アミノ酸約100からなるポリペプチドなどを含む。さらに、図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸約1（または20または30または40など）～アミノ酸約20（または130または140または150など）からなるポリペプチドが、本発明の実施形態である。この段落における開始位置および停止位置は、特定の位置およびプラス5残基マイナス5残基の位置をいうことが理解されるべきである。

10

【0122】

161P2F10B関連タンパク質は、標準的なペプチド合成技術を用いてかまたは当該分野で周知の化学切断方法を用いて生成される。あるいは、組み換え方法が、161P2F10B関連タンパク質をコードする核酸分子を生成するのに使用され得る。1つの実施形態において、核酸分子は、161P2F10Bタンパク質（またはその改変体、ホモログ、またはアナログ）の規定されたフラグメントを生成する手段を提供する。

20

【0123】

(III.A.) モチーフ保有タンパク質の実施形態)

本明細書中に開示される本発明のさらなる例示の実施形態は、図2または図3に示される161P2F10Bポリペプチド配列中に含まれる1つ以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む161P2F10Bポリペプチドを包含する。種々のモチーフが当該分野で周知であり、そしてタンパク質は、多くの公に利用可能なインターネットサイト（例えば、URLアドレス：pfam.wustl.edu/searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html；psort.ims.u-tokyo.ac.jp/；cbs.dtu.dk/；www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html；expasy.ch/tools/scnpsit1.html；EpimatrixTMおよびEpimerTM、Brown University、brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html；およびBIMAS、bimas.dcr.t.nih.gov/参照のこと）により、このようなモチーフの存在について評価され得る。

30

【0124】

全ての161P2F10B変異体タンパク質のモチーフ保有部分配列は、表VIII～XXIおよび表XXII～XLIXにおいて示されそして同定される。

【0125】

表Vは、pfamサーチ（URLアドレスpfam.wustl.edu/を参照のこと）に基づくいくつかの頻繁に生じるモチーフを示す。表Vの列は、(1)モチーフ名の略称、(2)このモチーフファミリーの異なるメンバーの間で見出された同一性(%)、(3)モチーフ名または詳細、および(4)最も一般的な機能を列挙し；位置情報は、そのモチーフが位置に関連性がある場合に含まれる。

40

【0126】

先に議論された1つ以上の161P2F10Bモチーフを含むポリペプチドは、先に議論された161P2F10Bモチーフが増殖調節不全に関連するという観察の観点で、および161P2F10Bが特定の癌で過剰発現されるという理由から、悪性の表現型の特異的な特徴を解明するのに有用である（例えば、表Iを参照のこと）。カゼインキナーゼII、cAMPおよびcamp依存性プロテインキナーゼ、ならびにプロテインキナーゼ

50

Cは、例えば、悪性の表現型の発生に関連することが公知である酵素である（例えば、Chenら、*Lab Invest.*、78(2):165-174(1998)；Gaiddonら、*Endocrinology* 136(10):4331-4338(1995)；Hallら、*Nucleic Acids Research* 24(6):1119-1126(1996)；Peterzielら、*Oncogene* 18(46):6322-6329(1999)、およびO'Brian、*Oncol. Rep.* 5(2):305-309(1998)を参照のこと）。さらに、グリコシル化およびミリスチル化の両方は、癌および癌の進行にも関連するタンパク質修飾である（例えば、Dennisら、*Biochem. Biophys. Acta* 1473(1):21-34(1999)；Rajuら、*Exp. Cell Res.* 235(1):145-154(1997)を参照のこと）。アミド化は、癌および癌の進行にも関連する別のタンパク質修飾である（例えば、Trestonら、*J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* (13):169-175(1992)を参照のこと）。

【0127】

別の実施形態において、本発明のタンパク質は、当該分野で認知された方法に従って同定された1つ以上の免疫反応性エピトープ（例えば、表VIII~XXIおよび表XXII~XLIXに示されるペプチド）を含む。CTLエピトープは、特定のHLA対立遺伝子に最適に結合し得る161P2F10Bタンパク質中のペプチドを同定するための特別なアルゴリズムを用いて決定され得る（例えば、表IV:EpimatrixTMおよびEpimerTM、Brown University、URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html；およびBIMAS、URL bmas.dcr.t.nih.gov/）。さらに、HLA分子に対して十分な結合親和性を有し、そして免疫原性エピトープであることに関連するペプチドを同定するためのプロセスが当該分野で周知であり、そして過度の実験を行うことなく実施される。さらに、免疫原性エピトープであるペプチドを同定するためのプロセスが、当該分野で周知であり、そしてインビトロまたはインビボのいずれかで、過度の実験を行わずに実施される。

【0128】

免疫原性を調節するために、このようなエピトープのアナログを作製するための原理もまた、当該分野で公知である。例えば、CTLまたはHTLモチーフ（例えば、表IVのHLAクラスIおよびHLAクラスIIモチーフ/スーパーモチーフを参照のこと）を有するエピトープを用いて開始する。このエピトープは、特定の位置のうちの1つのアミノ酸を置換し、そしてそれをその位置のために特定された別のアミノ酸で置き換えることにより、アナログを作製される。例えば、表IVに規定されているような残基に基づき、好ましい残基のような任意の他の残基に有利となるように、有害な残基を置換し得るか；さほど好ましくない残基を、好ましい残基で置換するか；または最初から存在する好ましい残基を、好ましい残基で置換し得る。置換は、ペプチド中の主要なアンカー位置または他の位置で生じ得る；例えば、表IVを参照のこと。

【0129】

種々の参考文献は、目的のタンパク質およびそのアナログにおけるエピトープの同定および生成に関する技術を反映している。例えば、Chesnutらに対するWO97/33602；Sette、*Immunogenetics* 1999 50(3-4):201-212；Setteら、*J. Immunol.* 2001 166(2):1389-1397；Sidneyら、*Hum. Immunol.* 1997 58(1):12-20；Kondoら、*Immunogenetics* 1997 45(4):249-258；Sidneyら、*J. Immunol.* 1996 157(8):3480-90；およびFalkら、*Nature* 351:290-6(1991)；Huntら、*Science* 255:1261-3(1992)；Parkerら、*J. Immunol.* 149:3580-7(1992)；Parkerら、*J. Immunol.* 15

10

20

30

40

50

2 : 1 6 3 - 7 5 (1 9 9 4) ; K a s t r a , 1 9 9 4 1 5 2 (8) : 3 9 0 4 - 1 2
 ; B o r r a s - C u e s t a r a , H u m . I m m u n o l . 2 0 0 0 6 1 (3) : 2
 6 6 - 2 7 8 ; A l e x a n d e r a , J . I m m u n o l . 2 0 0 0 1 6 4 (3) ;
 1 6 4 (3) : 1 6 2 5 - 1 6 3 3 ; A l e x a n d e r a , P M I D : 7 8 9 5 1 6 4
 、 U I : 9 5 2 0 2 5 8 2 ; O ' S u l l i v a n a , J . I m m u n o l . 1 9 9 1
 1 4 7 (8) : 2 6 6 3 - 2 6 6 9 ; A l e x a n d e r a , I m m u n i t y 1 9 9
 4 1 (9) : 7 5 1 - 7 6 1 、 お よ び A l e x a n d e r a , I m m u n o l . R e s
 . 1 9 9 8 1 8 (2) : 7 9 - 9 2 を 参 照 の 事 。

【 0 1 3 0 】

本発明の関連の実施形態は、表V Iに示される異なるモチーフ、ならびに/または表V
 I I ~ X X I および表X X I I ~ X L I Xの1つ以上の推定C T Lエピトープ、ならびに
 /または表X L V I ~ 表X L I Xの1つ以上の推定H T Lエピトープ、ならびに/または
 当該分野で公知の1つ以上のT細胞結合モチーフの組み合わせを含むポリペプチドを包含
 する。好ましい実施形態は、このポリペプチドのモチーフまたは介在配列内のいずれにも
 、挿入、欠失、または置換を含まない。さらに、これらのモチーフのいずれかの側に、多
 くのN末端および/またはC末端アミノ酸残基のいずれかを含む実施形態が、望ましくあ
 り得る(例えば、モチーフが位置するポリペプチド構造のより大きな部分を含むために)
 。代表的に、モチーフのいずれかの側のN末端および/またはC末端アミノ酸残基の数は
 、約1 ~ 約100アミノ酸残基の間、好ましくは、5 ~ 約50アミノ酸残基の間である。

【 0 1 3 1 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質は、多くの形態、好ましくは、単離された形態で具
 体化される。精製された1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質分子は、抗体、T細胞または他の
 リガンドへの1 6 1 P 2 F 1 0 Bの結合を障害する、他のタンパク質または分子を、実質
 的に含まない。単離および精製の性質および程度は、意図される用途に依存する。1 6 1
 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質の実施形態は、精製された1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク
 質、および機能的な可溶性1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質を含む。1つの実施形態に
 おいて、機能的な可溶性1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質またはそのフラグメントは、抗体
 、T細胞または他のリガンドによって結合される能力を維持する。

【 0 1 3 2 】

本発明はまた、図2または図3に示される1 6 1 P 2 F 1 0 Bアミノ酸配列の生物学的
 に活性なフラグメントを含む1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質を提供する。このようなタン
 パク質は、以下のような出発1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質の特性を示す：出発1 6 1 P
 2 F 1 0 Bタンパク質に関連するエピトープに特異的に結合する抗体の産生を誘発する能
 力；そのような抗体によって結合される能力；H T LまたはC T Lの活性化を誘発する能
 力；ならびに/あるいは、この出発タンパク質にもまた特異的に結合するH T LまたはC
 T Lによって認識される能力。

【 0 1 3 3 】

特に興味深い構造を含む1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連ポリペプチドは、当該分野で周知の種
 々の分析技術を使用してかまたは免疫原性に基づいて、予測および/または同定され得、
 これらの技術としては、例えば、C h o u - F a s m a n , G a r n i e r - R o b s o n ,
 K y t e - D o o l i t t l e , E i s e n b e r g , K a r p l u s - S c h u l t z または J a m e s o n - W o l f 分析の方法が挙げられる。このような構造を含むフ
 ラグメントは、サブユニット特異的な抗1 6 1 P 2 F 1 0 B抗体またはT細胞の生成にお
 いて、あるいは、1 6 1 P 2 F 1 0 Bに結合する細胞因子の同定において特に有用である
 。例えば、親水性プロフィールが作製され得、そして免疫原性ペプチドフラグメントは、
 H o p p , T . P . および W o o d s , K . P . , 1 9 8 1 , P r o c . N a t l . A c
 a d . S c i . U . S . A . 7 8 : 3 8 2 4 - 3 8 2 8 の方法を使用して、同定され得る
 。ヒドロパシー(h y d r o p a t h i c i t y)プロフィールが作製され得、そして免
 疫原性ペプチドフラグメントは、K y t e , J . および D o o l i t t l e , R . F . ,
 1 9 8 2 , J . M o l . B i o l . 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 2 の方法を使用して、同定され

10

20

30

40

50

得る。接近可能残基の%のプロフィールが作製され得、そして、免疫原性ペプチドフラグメントは、Janin J., 1979, Nature 277:491-492の方法を使用して、同定され得る。平均可撓性プロフィールが作製され得、そしてBhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255の方法を使用して、免疫原性ペプチドフラグメントが同定され得る。ターンプロフィールが作製され得、そして免疫原性ペプチドフラグメントは、Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294の方法を使用して、同定され得る。

【0134】

CTLエピトープは、指定されたHLA対立遺伝子に最適に結合し得る161P2F10Bタンパク質内のペプチドを同定するために、特定のアルゴリズムを使用して(例えば、World Wide Web URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/のSYFPEITHIサイト;表IV(A)~(E)の表;EpimatrixTMおよびEpimerTM、Brown University, URL (brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html);ならびに、BIMAS, URL bimas.dcr.t.nih.gov/を使用することによって)決定され得る。これを例示すると、ヒトMHCクラスI分子の状況において示される161P2F10B由来のペプチドエピトープ(例えば、HLA-A1、A2、A3、A11、A24、B7およびB35)が、予測された(例えば、表VIII~XXIおよび表XXII~XLIXを参照のこと)。具体的には、161P2F10Bタンパク質の完全なアミノ酸配列および他の改変体の関連部分(すなわち、HLAクラスIの予測については、この改変体に対応する変異点またはエキソン接合部のいずれかの側に位置する9隣接残基、およびHLAクラスIIの予測については、変異点またはエキソン接合部のいずれかの側に位置する14残基隣接)を、上記のBioinformatics and Molecular Analysis Section(BIMAS)ウェブサイト(URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/のサイトSYFPEITHIに加えて)において見出されるHLA Peptide Motif Searchアルゴリズムに入力した。

【0135】

HLAペプチドモチーフ検索アルゴリズムは、HLAクラスI分子、特に、HLA-A2(例えば、Falkら、Nature 351:290-6(1991);Huntら、Science 255:1261-3(1992);Parkerら、J. Immunol. 149:3580-7(1992);Parkerら、J. Immunol. 152:163-75(1994)を参照のこと)の溝における特定のペプチド配列の結合に基づいて、Dr. Ken Parkerによって開発された。このアルゴリズムは、HLA-A2および他の多くのHLAクラスI分子への予測される結合についての完全なタンパク質配列から、8マー、9マー、および10マーのペプチドを位置決定およびランク付けすることを可能にする。多数のHLAクラスI結合ペプチドは、8マー、9マー、10マーまたは11マーである。例えば、クラスI HLA-A2について、エピトープは、好ましくは、2位においてロイシン(L)またはメチオニン(M)を含み、そしてC末端においてバリン(V)またはロイシン(L)を含む(例えば、Parkerら、J. Immunol. 149:3580-7(1992)を参照のこと)。161P2F10B予測結合ペプチドの選択結果は、本明細書中の表VIII~XXIおよびXXII~XLIXに示される。表VIII~XXIおよびXXII~XLVIIにおいて、各ファミリーメンバーに対して選択される候補物である9マーおよび10マーが、それらの位置、各特定のペプチドのアミノ酸配列、および推定結合スコアとともに示される。表XLVI~XLIXにおいて、各ファミリーメンバーに対して選択される候補物である15マーが、それらの位置、各特定のペプチドのアミノ酸配列、および推定結合スコアとともに示される。この結合スコアは、37(pH6.5)においてペプチドを含む複合体の解離の、推定半減期に対応する。最も高い結合スコアを有するペプチドは、最良の期間にわたって

10

20

30

40

50

、細胞表面上でHLAクラスIに最も密接して結合され、そしてT細胞認識のための最良の免疫原性標的を示すと予測される。

【0136】

HLA対立遺伝子へのペプチドの実際の結合は、抗原プロセッシング欠損細胞株T2上でHLA発現を安定化させることによって評価され得る(例えば、Xueら、Prostate 30:73-8(1997)およびPeshwaら、Prostate 36:129-38(1998)を参照のこと)。特定のペプチドの免疫原性は、抗原提示細胞(例えば、樹状細胞)の存在下におけるCD8+細胞障害性Tリンパ球(CTL)を刺激することによって、インビトロで評価され得る。

【0137】

BIMASサイト、EpimerTMサイトおよびEpimatrixTMサイトによって予測されるか、あるいは当該分野で利用可能であるかまたは表IVに示されるような分野の一部である、HLAクラスIモチーフまたはHLAクラスIIモチーフによって指定される(あるいは、World Wide Web site URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/またはBIMAS, bimas.dcr.t.nih.gov/を使用して決定される)、全てのエピトープは、本発明に従って、161P2F10Bタンパク質に「適用」されることが理解される。この文脈において使用される場合、「適用される」とは、例えば、可視によってかまたは当業者によって理解されるような、コンピューターベースのパターン認定方法によって、161P2F10Bタンパク質が評価されることを意味する。HLAクラスIモチーフを保有する、8、9、10もしくは11のアミノ酸残基の161P2F10Bタンパク質の全ての部分配列、またはHLAクラスIIモチーフを保有する9アミノ酸残基以上の部分配列は、本発明の範囲内である。

【0138】

(III.B.)161P2F10B関連タンパク質の発現)

以下の実施例において記載される実施形態において、161P2F10Bは、市販の発現ベクター(例えば、C末端6xHisおよびMYCタグ(pCDNA3.1/mycHis, InvitrogenまたはTag5, GenHunter Corporation, Nashville TN)を用いて161P2F10Bをコードする、CMV駆動発現ベクター)でトランスフェクトした細胞(例えば、293T細胞)中で簡便に発現され得る。Tag5ベクターは、IgGK分泌シグナルを提供し、このシグナルを使用して、トランスフェクト細胞中の分泌される161P2F10Bタンパク質の生成を容易にし得る。培養培地中の分泌されたHISタグ化161P2F10Bは、例えば、標準技術を使用するニッケルカラムを使用して、精製され得る。

【0139】

(III.C.)161P2F10B関連タンパク質の改変)

161P2F10B関連タンパク質の改変(例えば、共有結合的改変)は、本発明の範囲内に含まれる。共有結合的改変の1つの型は、161P2F10Bポリペプチドの標的化アミノ酸残基を、有機誘導体化因子(これは、161P2F10Bタンパク質の選択される側鎖残基またはN末端もしくはC末端の残基と反応し得る)と反応させることを包含する。本発明の範囲内に含まれる161P2F10Bポリペプチドの共有結合的改変の別の型は、本発明のタンパク質のネイティブなグリコシル化パターンを変化させることを包含する。161P2F10Bの共有結合的改変の別の型は、161P2F10Bポリペプチドを、種々の非タンパク様ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン)のうちの1つに、米国特許第4,640,835号;同第4,496,689号;同第4,301,144号;同第4,670,417号;同第号4,791,192;または同第4,179,337号に記載される様式で連結させることを包含する。

【0140】

本発明の161P2F10B関連タンパク質はまた、キメラ分子を形成するように改変

10

20

30

40

50

され得、このキメラ分子は、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合された 1 6 1 P 2 F 1 0 B を含む。このようなキメラ分子は、化学的にかまたは組換え的に、合成され得る。キメラ分子は、別の腫瘍関連抗原またはそのフラグメントに融合された本発明のタンパク質を有し得る。あるいは、本発明に従うタンパク質は、1 6 1 P 2 F 1 0 B 配列のフラグメントの融合体（アミノ酸または核酸）を含み得、その結果、その長さに起因して、図 2 または図 3 に示されるアミノ酸配列または核酸配列に直接的に相同でない分子が作製される。このようなキメラ分子は、1 6 1 P 2 F 1 0 B の複数の同じ部分配列を含み得る。キメラ分子は、1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質の、ポリヒスチジンエピトープタグとの融合体を含み得、これは、固定化されたニッケルが選択的に結合し得るエピトープに、サイトカインまたは増殖因子を提供する。エピトープタグは、一般に、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質のアミノ末端またはカルボキシル末端に位置される。代替の実施形態において、キメラ分子は、1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質の、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合体を含み得る。二価の形態のキメラ分子（「免疫接着因子（immuno adhesion）とも呼ばれる」）について、このような融合体は、Ig G 分子の F c 領域に対するものであり得る。この Ig 融合体は、好ましくは、Ig 分子内の少なくとも 1 つの可変領域に代わる、可溶性（膜貫通ドメインを欠失または不活性化した）形態の 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチドでの置換を含む。好ましい実施形態において、免疫グロブリン融合体は、Ig G 分子のヒンジ領域、C H 2 領域および C H 3 領域、またはヒンジ領域、C H 1 領域、C H 2 領域および C H 3 領域を含む。免疫グロブリン融合体の産生については、例えば、米国特許第 5, 4 2 8, 1 3 0 号（1 9 9 5 年 6 月 2 7 日発行）を参照のこと。

10

20

【 0 1 4 1 】

（ I I I . D . ） 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質の用途）

本発明のタンパク質は、多くの異なる特定の用途を有する。1 6 1 P 2 F 1 0 B が前立腺癌および他の癌において高度に発現されるので、1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質は、癌組織に対して、正常な組織における 1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子産物の状態を評価する方法において使用され、それによって悪性表現型が明らかになる。代表的には、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質の特定の領域由来のポリペプチドが、それらの領域（例えば、1 つ以上のモチーフを含む領域）における摂動（例えば、欠失、挿入、点変異など）の存在を評価するために使用される。例示的なアッセイは、癌性組織に対して正常な組織における領域の特徴を評価するか、またはエピトープに対する免疫応答を惹起させるために、1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチド配列に含まれる 1 つ以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質を標的化する抗体または T 細胞を用いる。あるいは、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質において 1 つ以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質を使用して、1 6 1 P 2 F 1 0 B のその領域と相互作用する因子についてスクリーニングする。

30

【 0 1 4 2 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質フラグメント / 部分配列は、ドメイン特異的抗体（例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質の細胞外エピトープまたは細胞内エピトープを認識する抗体）を作製しそして特徴付ける際に、1 6 1 P 2 F 1 0 B またはその特定の構造ドメインに結合する薬剤または細胞因子を同定するために、そして種々の治療状況および診断状況（診断アッセイ、癌ワクチンおよびこのようなワクチンを調製する方法が挙げられるがこれらに限定されない）において、特に有用である。

40

【 0 1 4 3 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子によってコードされるタンパク質、またはそれらのアナログ、ホモログもしくはフラグメントによってコードされるタンパク質は、種々の用途を有し、これらの用途としては、抗体の作製、ならびに 1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子産物に結合する、リガンドおよび他の薬剤および細胞構築物を同定するための方法が挙げられるがこれらに限定されない。1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質またはそのフラグメントに対して惹起される抗体は、診断アッセイおよび予後アッセイ、ならびに 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク

50

質の発現によって特徴付けられるヒト癌（例えば、表1に列挙されるような癌）の管理における画像化方法に有用である。このような抗体は、細胞内で発現され得、そしてこのような癌を有する患者を処置する方法において使用され得る。161P2F10B関連核酸または161P2F10B関連タンパク質はまた、HTL応答またはCTL応答を生じさせる際に使用される。

【0144】

161P2F10Bタンパク質を検出するために有用な種々の免疫学的アッセイが、使用され、これらのアッセイとしては、種々の型の放射免疫アッセイ、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光アッセイ（ELIFA）、免疫細胞化学方法などが挙げられるがこれらに限定されない。抗体は、161P2F10B発現細胞を検出し得る免疫学的画像化試薬として（例えば、放射性核種（radioscintigraphic）画像化方法において）、標識および使用され得る。161P2F10Bタンパク質はまた、本明細書中でさらに記載されるように、癌ワクチンを作製する際に、特に有用である。

10

【0145】

（IV.）161P2F10B抗体）

本明細書中の別の局面は、161P2F10B関連タンパク質に結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、161P2F10B関連タンパク質に特異的に結合し、そして161P2F10B関連タンパク質ではないペプチドまたはタンパク質には結合しない（または弱く結合する）。例えば、161P2F10Bに結合する抗体は、161P2F10B関連タンパク質（例えば、それらのホモログまたはアナログ）に結合し得る。

20

【0146】

本発明の161P2F10B抗体は、癌（表I参照のこと）の診断アッセイおよび予後アッセイ、および画像化方法論において、特に有用である。同様に、このような抗体は、161P2F10Bがまた、他の癌において発現されるかまたは過剰に発現される程度まで、これらの他の癌を処置、診断および/または予後診断する際に有用である。さらに、細胞内で発現される抗体（例えば、単鎖抗体）は、161P2F10Bの発現が関与する癌（例えば、進行性または転移性の前立腺癌）の処置において、治療学的に有用である。

【0147】

本発明はまた、161P2F10Bタンパク質および変異161P2F10B関連タンパク質の検出および定量化のために有用な種々の免疫学的アッセイを提供する。このようなアッセイは、適切な場合、161P2F10B関連タンパク質を認識および結合し得る、1種以上の161P2F10B抗体を含み得る。これらのアッセイは、当該分野で周知の種々の免疫学的アッセイ様式の範囲内で実施され得、これらのアッセイとしては、種々の型の放射免疫アッセイ、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光アッセイ（ELIFA）などが挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0148】

本発明の免疫学的非抗体アッセイはまた、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）ならびに主要組織適合遺伝子複合体（MHC）結合アッセイも含む。

【0149】

さらに、161P2F10Bを発現する前立腺癌および他の癌を検出し得る免疫学的画像化方法もまた、本発明によって提供され、これらとしては、標識された161P2F10B抗体を使用する、放射性核種画像化方法が挙げられるがこれらに限定されない。このようなアッセイは、161P2F10Bを発現する癌（例えば、前立腺癌）の検出、モニタリング、および予後診断において、臨床学的に有用である。

40

【0150】

161P2F10B抗体はまた、161P2F10B関連タンパク質を精製するための方法、ならびに161P2F10Bホモログおよび161P2F10B関連分子を単離するための方法において使用され得る。例えば、161P2F10B関連タンパク質を精製する方法は、以下の工程を包含する：固体マトリクスに結合している161P2F10B

50

抗体を、溶解物または161P2F10B関連タンパク質を含有する他の溶液とともに、161P2F10B抗体が161P2F10B関連タンパク質に結合することが可能な条件下でインキュベートする工程；この固体マトリクスを洗浄して、不純物を取り除く工程；ならびに、結合している抗体から、161P2F10B関連タンパク質を溶出する工程。本発明に従う、161P2F10B抗体の他の用途としては、161P2F10Bタンパク質を模倣する抗イディオタイプ抗体を産生することが挙げられる。

【0151】

抗体を調製するための種々の方法が、当該分野で周知である。例えば、抗体は、161P2F10B関連タンパク質、ペプチド、またはフラグメントを使用して、適切な哺乳動物宿主を免疫することによって、単離形態または免疫結合体化形態で、調製され得る (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, 編, Harlow, and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989))。さらに、161P2F10B GST融合タンパク質のような161P2F10B融合タンパク質もまた、使用され得る。特定の実施形態において、図2または図3のアミノ酸配列の全てまたは大部分を含むGST融合タンパク質が生成され、次いで、これを免疫原として使用して、適切な抗体を産生する。別の実施形態において、161P2F10B関連タンパク質が合成され、そして免疫原として使用される。

【0152】

さらに、当該分野で公知の裸のDNA免疫技術が使用され (精製された161P2F10B関連タンパク質または161P2F10B発現細胞を用いてかまたは用いずに)、そのコードされた免疫原に対する免疫応答が生じる (総説としては、Donnellyら、1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648を参照のこと)。

【0153】

図2または図3に示される161P2F10Bタンパク質のアミノ酸配列を分析して抗体を産生するための、161P2F10Bタンパク質の特定の領域を選択し得る。例えば、161P2F10Bアミノ酸配列の疎水性分析および親水性分析を使用して、161P2F10B構造における親水性領域を同定する。免疫原構造を示す161P2F10Bタンパク質の領域、ならびに他の領域およびドメインは、当該分野で公知の種々の他の方法 (例えば、Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Karplus-SchultzまたはJameson-Wolf分析) を使用して、容易に同定され得る。親水性プロフィールは、Hopp, T. P. およびWoods, K. R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 3824-3828の方法を使用して、産生され得る。ヒドロパシープロフィールは、Kyte, J. およびDoolittle, R. F., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-132の方法を使用して、産生され得る。アクセス可能なパーセント (%) 残基プロフィールは、Janin J., 1979, Nature 277: 491-492の方法を使用して、産生され得る。平均可撓性プロフィールは、Bhaskaran R., Ponnuswamy P. K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255の方法を使用して、産生され得る。ターンプロフィールは、Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1: 289-294の方法を使用して、産生され得る。従って、これらのプログラムまたは方法のいずれかによって同定される各領域は、本発明の範囲内である。161P2F10B抗体を産生するための方法は、本明細書中で提供される実施例によって、さらに例示される。免疫原として使用するためのタンパク質またはポリペプチドを調製するための方法は、当該分野で周知である。キャリア (例えば、BSA、KLHまたは他のキャリアタンパク質) とタンパク質との免疫原性結合体を調製するための方法もまた、当該分野で周知である。いくつかの状況において、例えば、カルボジイミド試薬を使用する直接的結合体化が使用され；別の例においては、Pierce Chemical Co., Rockford, ILによって供給され

10

20

30

40

50

る結合試薬が有効である。161P2F10B免疫原の投与は、当該分野で理解されるように、適切な期間にわたって、適切なアジュバントを使用して注射することによって、しばしば行われる。免疫スケジュールの間、抗体の力価を用いて、抗体形成の妥当性を決定し得る。

【0154】

161P2F10Bモノクローナル抗体は、当該分野で周知の種々の手段によって生成され得る。例えば、所望なモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株は、KohlerおよびMilsteinの標準的なハイブリドーマ技術、または一般に公知のように、抗体産生B細胞を不死化する改変を使用して、調製される。所望な抗体を分泌する不死化細胞株は、免疫アッセイによってスクリーニングされる（このアッセイにおいて、抗原は、161P2F10B関連タンパク質である）。適切な不死化細胞培養物が同定された場合、この細胞が拡大され得、そしてインビトロ培養物または腹水のいずれかから、抗体が生成され得る。

10

【0155】

本発明の抗体またはフラグメントはまた、組換え手段によっても生成され得る。161P2F10Bタンパク質の所望な領域に特異的に結合する領域はまた、複数の種起源のキメラ抗体または相補性決定領域(CDR)移植化(grafted)抗体の状況下で産生され得る。ヒト化161P2F10B抗体またはヒト161P2F10B抗体もまた産生され得、そして治療的状況下での使用のために好ましい。1つ以上の非ヒト抗体CDRを、対応するヒト抗体配列と置換することによる、マウス抗体および他の非ヒト抗体をヒト化するための方法は、周知である（例えば、Jonesら、1986、Nature 321:522-525; Riechmannら、1988、Nature 332:323-327; Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-1536を参照のこと）。Carterら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285、およびSimsら、1993、J. Immunol. 151:2296もまた参照のこと。

20

【0156】

完全なヒトモノクローナル抗体を産生するための方法としては、ファージディスプレイ方法およびトランスジェニック方法が挙げられる（概要については、Vaughanら、1998、Nature Biotechnology 16:535-539を参照のこと）。完全なヒト161P2F10Bモノクローナル抗体は、大きいヒトIg遺伝子コンビナトリアルライブラリー（すなわち、ファージディスプレイ）を使用するクローニング技術を使用して生成され得る（Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications (Man. Clark, M. 編)、Nottingham Academic、45-64頁(1993)のGriffithsおよびHoogenboom、Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries; BurtonおよびBarbas、Human Antibodies from combinatorial libraries (同書) 65-82頁)。完全なヒト161P2F10Bモノクローナル抗体はまた、1997年12月3日公開のPCT特許出願WO98/24893 (KucherlapatiおよびJakobovitsら)に記載されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作されたトランスジェニックマウスを使用して産生され得る（Jakobovits、1998、Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):607-614; 米国特許第6,162,963号(2000年12月19日発行); 米国特許第6,150,584号(2000年11月12日発行); および米国特許第6,114,598号(2000年9月5日発行)もまた参照のこと）。この方法は、ファージディスプレイ技術に必要とされるインビトロ操作を回避し、そして高い親和性の真正ヒト抗体を効率的に産生する。

30

40

50

【0157】

161P2F10B抗体の161P2F10B関連タンパク質との反応性は、多数の周知方法によって確立され得、これらの方法としては、ウェスタンブロット、免疫沈降、ELISA、および適切な場合、161P2F10B関連タンパク質、161P2F10B発現細胞またはそれらの抽出物を使用する、FACS分析が挙げられる。161P2F10B抗体またはそれらのフラグメントは、検出可能なマーカーで標識され得るか、または第二の分子に結合体化され得る。適切な検出可能なマーカーとしては、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、2つ以上の161P2F10Bエピトープに特異的な二重特異性(bi-specific)抗体が、当該分野で一般に公知の方法を使用して、

10

（V.）161P2F10B細胞免疫応答）

T細胞が抗原を認識する機構は、解明されている。本発明の有効なペプチドエピトープワクチン組成物は、世界中の集団の非常に広範な区分において治療的免疫応答または予防的免疫応答を誘導する。細胞免疫応答を誘導する本発明の組成物の価値および効力の理解のために、免疫学関連技術の簡単な総説を示す。

【0158】

HLA分子とペプチド抗原との複合体は、HLA拘束T細胞によって認識されるリガンドとして作用する(Buus, Sら、Cell 47:1071, 1986; Babbitt, B.P.ら、Nature 317:359, 1985; Townsend, A.およびBodmer, H., Annu. Rev. Immunol. 7:601, 1989; Germain, R.N., Annu. Rev. Immunol. 11:403, 1993)。単一のアミノ酸が置換された抗原アナログおよび内因性結合した天然でプロセシングされたペプチドの配列決定を通して、HLA抗原分子への特異的結合に必要なモチーフに対応する重要な残基が、同定されており、表IVに記載される(例えば、Southwoodら、J. Immunol. 160:3363, 1998; Rammenseeら、Immunogenetics 41:178, 1995; Rammenseeら、SYFPEITHI(World Wide Webを介してURL 134.2.96.221/scripts.hlaserver.dll/home.htmにアクセスのこと); Sette, A.およびSidney, J. Curr. Opin. Immunol. 10:478, 1998; Engelhard, V.H., Curr. Opin. Immunol. 6:13, 1994; Sette, A.およびGrey, H.M., Curr. Opin. Immunol. 4:79, 1992; Sinigaglia, F.およびHammer, J. Curr. Biol. 6:52, 1994; Ruppertら、Cell 74:929-937, 1993; Kondoら、J. Immunol. 155:4307-4312, 1995; Sidneyら、J. Immunol. 157:3480-3490, 1996; Sidneyら、Human Immunol. 45:79-93, 1996; Sette, A.およびSidney, J. Immunogenetics 1999 nov; 50(3-4):201-12、総説を参照のこと)。

20

30

40

【0159】

さらに、HLA-ペプチド複合体のX線結晶学的分析は、対立遺伝子特異的様式においてペプチドリガンドにより保有される残基を収容するHLA分子のペプチド結合間隙/溝部内のポケットを明らかにし; 次いで、これらの残基は、この残基が存在するペプチドのHLA結合能を決定する(例えば、Madden, D.R. Annu. Rev. Immunol. 13:587, 1995; Smithら、Immunity 4:203, 1996; Fremontら、Immunity 8:305, 1998; Sternら、Structure 2:245, 1994; Jones, E.Y. Curr. Opin. Immunol. 9:75, 1997; Brown, J.H.ら、Nature 364:33, 1993; Guo, H.C.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. US

50

A 90:8053, 1993; Guo, H. C. ら、Nature 360:364, 1992; Silver, M. L. ら、Nature 360:367, 1992; Matsumura, M. ら、Science 257:927, 1992; Madden ら、Cell 70:1035, 1992; Fremont, D. H. ら、Science 257:919, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. および Wilely, D. C., J. Mol. Biol. 219:277, 1991を参照のこと)。

【0160】

従って、クラスIおよびクラスIIの対立遺伝子特異的HLA結合モチーフ、ならびにクラスIまたはクラスIIのスーパーモチーフの定義は、特定のHLA抗原への結合と関連するタンパク質内の領域の同定を可能にする。

10

【0161】

従って、HLAモチーフの同定プロセスによって、エピトープベースのワクチンの候補が、同定されている；このような候補は、エピトープとその対応するHLA分子との会合の結合親和性および/または期間を決定するために、HLA-ペプチド結合アッセイによりさらに評価され得る。これらのワクチン候補の中から、集団適用範囲および/または免疫原性の観点で好ましい特徴を有するエピトープを選択するために、さらなる確証実験が行われ得る。

【0162】

種々のストラテジーが、細胞免疫原性を評価するために使用され得、これには以下が挙げられる：

20

1) 正常な個体由来の一次T細胞培養物の評価(例えば、Wentworth, P. A. ら、Mol. Immunol. 32:603, 1995; Celis, E. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2105, 1994; Tsai, V. ら、J. Immunol. 158:1796, 1997; Kawashima, I. ら、Human Immunol. 59:1, 1998を参照のこと)。この手順は、抗原提示細胞の存在下で、インビトロで数週間の期間にわたって、正常な被験体由来の末梢血リンパ球(PBL)を試験ペプチドで刺激することを包含する。このペプチドに特異的なT細胞は、この時間の間に活性化され、そして例えば、ペプチドで感作された標的細胞を包含するリンホカイン放出アッセイまたは ^{51}Cr 放出アッセイを使用して、検出される。

30

【0163】

2) HLAトランスジェニックマウスの免疫(例えば、Wentworth, P. A. ら、J. Immunol. 26:97, 1996; Wentworth, P. A. ら、Int. Immunol. 8:651, 1996; Alexander, J. ら、J. Immunol. 159:4753, 1997を参照のこと)。例えば、このような方法において、不完全フロイントアジュバント中のペプチドが、HLAトランスジェニックマウスに皮下投与される。免疫の数週間後、脾細胞が取り出され、そして試験ペプチドの存在下で、約1週間インビトロで培養される。ペプチド特異的T細胞は、例えば、ペプチドで感作された標的細胞および内因的に生成された抗原を発現する標的細胞を含む、 ^{51}Cr 放出アッセイを使用して、検出される。

40

【0164】

3) 効果的にワクチン接種された免疫個体および/または慢性的に病気の患者のいずれか由来のリコールT細胞応答の証明(例えば、Rehermann, B. ら、J. Exp. Med. 181:1047, 1995; Doolan, D. L. ら、Immunity 7:97, 1997; Bertoni, R. ら、J. Clin. Invest. 100:503, 1997; Threlkeld, S. C. ら、J. Immunol. 159:1648, 1997; Diepolder, H. M. ら、J. Virol. 71:6011, 1997を参照のこと)。従って、リコール応答は、疾患に起因して抗原に曝露され、従って「自然に」免疫応答を生成した被験体由来のPBL、または抗原に対してワクチン接種された患者由来のPBLを培養することによって、検出される。被験体由来のPB

50

Lは、試験ペプチド+抗原提示細胞（APC）の存在下で1～2週間、インビトロで培養され、「未刺激」T細胞と比較して「メモリー」T細胞の活性化を可能にする。この培養期間の最後に、T細胞活性が、ペプチドで感作した標的を含む⁵¹Cr放出、T細胞増殖またはリンホカイン放出を含むアッセイを使用して、検出される。

【0165】

（VI.）161P2F10Bトランスジェニック動物）

161P2F10B関連タンパク質をコードする核酸はまた、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物のいずれかを産生するために使用され得、この動物は、次いで、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である。確立された技術によって、161P2F10BをコードするcDNAが、161P2F10BをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用され得る。次いで、このクローン化されたゲノム配列は、161P2F10BをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を産生するために使用され得る。トランスジェニック動物（特に、マウスまたはラットのような動物）を産生するための方法は、当該分野で通常になっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号（1988年4月12日発行）および同第4,870,009号（1989年9月26日発行）において記載されている。代表的には、特定の細胞が、組織特異的エンハンサーを用いる161P2F10B導入遺伝子組込みのために標的化される。

【0166】

161P2F10Bをコードする1コピーの導入遺伝子を含むトランスジェニック動物は、161P2F10BをコードするDNAの発現を増加する効果を試験するために使用され得る。このような動物は、例えば、その過剰発現に関連する病理学的状態からの防御を付与すると考えられる試薬についてのテスター動物として使用され得る。本発明のこの局面によると、動物は、試薬で処置され、そしてこの導入遺伝子を有する未処置の動物と比較して減少した病理学的状態の発生率は、この病理学的状態に対する潜在的な治療的介入を示す。

【0167】

あるいは、161P2F10Bの非ヒトホモログは、161P2F10B「ノックアウト」動物を構築するために使用され得、この161P2F10B「ノックアウト」動物は、161P2F10Bをコードする内在性遺伝子と、この動物の胚性細胞に導入された161P2F10Bをコードする変化したゲノムDNAとの間の相同組換えの結果として、161P2F10Bをコードする欠損遺伝子または変化した遺伝子を有する。例えば、161P2F10BをコードするcDNAは、確立された技術に従って、161P2F10BをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用され得る。161P2F10BをコードするゲノムDNAの一部は、欠失され得るか、または別の遺伝子（例えば、組込みをモニターするために使用され得る選択マーカーをコードする遺伝子）で置換され得る。代表的には、数千ベースの変化していない隣接DNA（5'末端と3'末端との両方）が、ベクター中に含まれる（例えば、相同組換えベクターの説明については、ThomasおよびCapecci, Cell, 51:503（1987）を参照のこと）。このベクターは、胚性幹細胞株に（例えば、エレクトロポレーションによって）導入され、そしてこの導入されたDNAが内因性DNAと相同組換えされた細胞が、選択される（例えば、Lira, Cell, 69:915（1992）を参照のこと）。ついで、この選択された細胞は、動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞に注入されて、凝集キメラが形成される（例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編（IRL, Oxford, 1987）, pp. 113-152を参照のこと）。キメラ胚は、次いで、適切な偽妊娠雌性代理母動物に移植され得、そしてこの胚は、出産されて、「ノックアウト」動物が産生される。生殖細胞中に相同組換えされたDNAを有する子孫が、標準的な技術によって同定され得、そして動物の全ての細胞が相同組み替えされたDNAを含む、動物を育種させるために使用され得る。

ノックアウト動物は、例えば、特定の病理学的状態に対して防御する能力について、または161P2F10Bポリペプチドの非存在に起因する病理学的状態の発症について、特徴付けされ得る。

【0168】

(VII.) 161P2F10Bの検出のための方法)

本発明の別の局面は、161P2F10Bポリヌクレオチドおよび161P2F10B関連タンパク質を検出するための方法、ならびに161P2F10Bを発現する細胞を同定するための方法に関する。161P2F10Bの発現プロファイルは、161P2F10Bを、転移した疾患についての診断マーカーにする。従って、161P2F10B遺伝子産物の状態は、進行した病期の疾患に対する感受性、進行速度および/または腫瘍の攻撃性を含む種々の因子を推定するために有用な情報を提供する。本明細書中で詳細に議論されるように、患者サンプル中の161P2F10B遺伝子産物の状態が、当該分野で周知の種々のプロトコルによって分析され得、このプロトコルとしては、免疫組織化学分析、種々のノーザンプロット技術(インサイチュハイブリダイゼーションを含む)、RT-PCR分析(例えば、レーザー捕捉微小解剖サンプルについて)、ウェスタンプロット分析および組織アレイ分析が挙げられる。

10

【0169】

より詳細には、本発明は、生物学的サンプル(例えば、血清、骨、前立腺および他の組織、尿、精液、細胞調製物など)中の161P2F10Bポリヌクレオチドの検出のためのアッセイを提供する。検出可能な161P2F10Bポリヌクレオチドとしては、例えば、161P2F10B遺伝子またはそのフラグメント、161P2F10B mRNA、選択的スプライス改変体161P2F10B mRNA、および161P2F10Bポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子またはRNA分子が挙げられる。161P2F10Bポリヌクレオチドを増幅し、そして/または161P2F10Bポリヌクレオチドの存在を検出するための多数の方法が、当該分野で周知であり、本発明のこの局面の実施において用いられ得る。

20

【0170】

一実施形態において、生物学的サンプル中の161P2F10B mRNAを検出するための方法は、少なくとも1つのプライマーを使用して、逆転写によりこのサンプルからcDNAを生成する工程;センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして161P2F10Bポリヌクレオチドを使用して、このようにして生成されたcDNAを増幅して、その中の161P2F10B cDNAを増幅する工程;およびこの増幅された161P2F10B cDNAの存在を検出する工程、を包含する。必要に応じて、この増幅された161P2F10B cDNAの配列が、決定され得る。

30

【0171】

別の実施形態において、生物学的サンプル中の161P2F10B遺伝子を検出する方法は、第1に、このサンプルからゲノムDNAを単離する工程;センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして161P2F10Bポリヌクレオチドを使用して、この単離されたゲノムDNAを増幅する工程;およびこの増幅された161P2F10B遺伝子の存在を検出する工程、を包含する。多数の適切なセンスプローブとアンチセンスプローブとの組合せが、161P2F10Bヌクレオチド配列から設計され得(例えば、図2を参照のこと)、そしてこの目的のために使用され得る。

40

【0172】

本発明はまた、組織または他の生物学的サンプル(例えば、血清、精液、骨、前立腺、尿、細胞調製物など)中の161P2F10Bタンパク質の存在を検出するためのアッセイを提供する。161P2F10B関連タンパク質を検出するための方法もまた、周知であり、これには、例えば、免疫沈降、免疫組織化学分析、ウェスタンプロット分析、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFAなどが挙げられる。例えば、生物学的サンプル中の161P2F10B関連タンパク質の存在を検出する方法は、第1に、このサンプルと、161P2F10B抗体、その161P2F10B反応性フラグメント、または161

50

P 2 F 1 0 B 抗体の抗原結合領域を含む組換えタンパク質とを接触させる工程；次いで、このサンプル中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質の結合を検出する工程、を包含する。

【 0 1 7 3 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B を発現する細胞を同定するための方法もまた、本発明の範囲内である。一実施形態において、1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子を発現する細胞を同定するためのアッセイは、この細胞中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B mRNA の存在を検出する工程を包含する。細胞中の特定の mRNA を検出するための方法は、周知であり、そして例えば、相補的 DNA プロブを使用するハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、標識された 1 6 1 P 2 F 1 0 B リボプロブを使用するインサイチュハイブリダイゼーション、ノーザンブロットおよび関連の技術）、および種々の核酸増幅アッセイ（例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B に対して特異的な相補的プライマーを使用する RT - PCR、および他の増幅型検出方法（例えば、分枝状 DNA、S I S B A、T M A など））が挙げられる。あるいは、1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子を発現する細胞を同定するためのアッセイは、この細胞中に存在するか、またはこの細胞により分泌される 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質の存在を検出する工程を包含する。タンパク質の検出のための種々の方法が、当該分野で周知であり、そして 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質および 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連タンパク質を発現する細胞の検出のために用いられる。

10

【 0 1 7 4 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現分析はまた、1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子発現を調節する因子を同定および評価するための手段として有用である。例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現は、前立腺癌において有意にアップレギュレートされ、そして表 I に列挙される組織の癌において発現される。癌細胞における 1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現または 1 6 1 P 2 F 1 0 B 過剰発現を阻害する分子または生物学的因子の同定は、治療的価値を有する。例えば、このような因子は、RT - PCR、核酸ハイブリダイゼーションまたは抗体結合により 1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現を定量するスクリーニングを使用することによって、同定され得る。

20

【 0 1 7 5 】

(V I I I .) 1 6 1 P 2 F 1 0 B 関連遺伝子およびその産物の状態をモニターするための方法)

腫瘍形成は、細胞増殖が次第に調節不全になり、細胞が正常な生理学的状態から前癌状態まで進行し、次いで癌状態まで進行する、多段階プロセスであることが知られている（例えば、A l e r s ら、L a b I n v e s t . 7 7 (5) : 4 3 7 - 4 3 8 (1 9 9 7) および I s a a c s ら、C a n c e r S u r v . 2 3 : 1 9 - 3 2 (1 9 9 5) を参照のこと）。この状況において、生物学的サンプルを調節不全性の細胞増殖の証拠（例えば、癌における異常な 1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現）について試験することにより、癌のような病理学的状態が、治療選択肢がより制限される段階まで進行する前、そして/または予後が悪化する前に、このような異常な生理機能を早期に検出することが可能になる。このような試験において、目的の生物学的サンプル中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態が、例えば、対応する正常なサンプル（例えば、病理により影響を受けていない、この個体または代替の別の個体由来のサンプル）中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態と比較され得る。生物学的サンプル中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態における（正常なサンプルと比較した場合の）変化は、調節不全性の細胞増殖の証拠を提供する。病理により影響を受けていない生物学的サンプルを正常なサンプルとして使用することに加えて、所定の規範値（例えば、mRNA 発現の所定の正常なレベル）（例えば、G r e v e r ら、J . C o m p . N e u r o l . 1 9 9 6 D e c 9 ; 3 7 6 (2) : 3 0 6 - 1 4 および米国特許第 5 , 8 3 7 , 5 0 1 号を参照のこと）が、サンプル中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態を比較するために使用され得る。

30

40

【 0 1 7 6 】

この文脈において、用語「状態」は、当該分野で認められた意味に従って使用され、遺伝子およびその産物の状態 (c o n d i t i o n または s t a t e) をいう。代表的には

50

、当業者は、多数のパラメーターを使用して、遺伝子およびその産物の状態 (c o n d i t i o n または s t a t e) を評価する。これには、発現された遺伝子産物の位置 (1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現細胞の位置を含む)、ならびに発現された遺伝子産物 (例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B m R N A、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド) のレベルおよび生物学的活性が挙げられるが、これらに限定されない。代表的に、1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態における変化は、1 6 1 P 2 F 1 0 B および / または 1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現細胞の位置における変化、ならびに / あるいは 1 6 1 P 2 F 1 0 B m R N A および / または 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質の発現の増加を含む。

【 0 1 7 7 】

サンプル中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態は、当該分野で周知の多数の手段によって分析され得、この手段としては、免疫組織化学分析、インサイチュハイブリダイゼーション、レーザー捕捉微小解剖サンプルに対する R T - P C R 分析、ウェスタンブロット分析および組織アレイ分析が挙げられるが、これらに限定されない。1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子および遺伝子産物の状態を評価するための代表的なプロトコルは、例えば、A u s u b e l 編、1 9 9 5 , C u r r e n t P r o t o c o l s I n M o l e c u l a r B i o l o g y , U n i t s 2 (N o r t h e r n B l o t t i n g) , 4 (S o u t h e r n B l o t t i n g) , 1 5 (I m m u n o b l o t t i n g) a n d 1 8 (P C R A n a l y s i s) に見出される。従って、生物学的サンプル中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態は、当業者により使用される種々の方法によって評価され、これらの方法としては、ゲノムサザン分析 (例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子中の変動 (p e r t u r b a t i o n) を試験するため)、1 6 1 P 2 F 1 0 B m R N A のノーザン分析および / または P C R 分析 (例えば、ポリヌクレオチド配列または 1 6 1 P 2 F 1 0 B m R N A の発現レベルにおける変化を試験するため)、ならびにウェスタン分析および / または免疫組織化学分析 (例えば、ポリペプチド配列における変更、サンプル内のポリペプチドの局在化における変化、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質の発現レベルにおける変化、および / または 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質とポリペプチド結合パートナーとの会合を試験するため) が挙げられるが、これらに限定されない。検出可能な 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチドとしては、例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B 遺伝子またはそのフラグメント、1 6 1 P 2 F 1 0 B m R N A、選択的スプライス改変体、1 6 1 P 2 F 1 0 B m R N A、および 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチドを含む組換え D N A 分子または組換え R N A 分子が挙げられる。

【 0 1 7 8 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B の発現プロフィールは、1 6 1 P 2 F 1 0 B を局所疾患および / または転移性疾患についての診断マーカーとし、そして生物学的サンプルの増殖または腫瘍形成の可能性についての情報を提供する。特に、1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態は、特定の疾患段階、進行および / または腫瘍の攻撃性に対する感受性を推定するために有用な情報を提供する。本発明は、1 6 1 P 2 F 1 0 B の状態を決定し、1 6 1 P 2 F 1 0 B を発現する癌 (例えば、表 I に列挙される組織の癌) を診断するための方法およびアッセイを提供する。例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B m R N A は、正常な前立腺組織と比較して前立腺癌および他の癌において非常に発現されるので、生物学的サンプル中の 1 6 1 P 2 F 1 0 B m R N A 転写物または 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質のレベルを評価するアッセイが、1 6 1 P 2 F 1 0 B の調節不全と関連する疾患を診断するために使用され得、そして適切な治療選択肢を規定する際に有用な予後情報を提供し得る。

【 0 1 7 9 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B の発現状態は、形成異常細胞、前癌状態の細胞および癌細胞の存在、病期および位置を含む、種々の段階の疾患に対する感受性を予測する情報、および / または腫瘍の攻撃性を評価するための情報を提供する。さらに、発現プロフィールは、1 6 1 P 2 F 1 0 B を、転移性疾患のための画像化試薬として有用にする。結果的に、本発明の局面は、生物学的サンプル (例えば、調節不全性の細胞増殖により特徴付けられる病理 (例えば、癌) に罹患している個体由来のサンプル、またはこのような病理に罹患してい

10

20

30

40

50

る疑いのある個体由来のサンプル)中の161P2F10Bの状態を試験するための種々の分子予後方法および分子診断方法に関する。

【0180】

上記のように、生物学的サンプル中の161P2F10Bの状態は、当該分野で周知の多数の手順によって試験され得る。例えば、身体の特定の位置から採取された生物学的サンプル中の161P2F10Bの状態は、このサンプルを、161P2F10B発現細胞(例えば、161P2F10B mRNAまたは161P2F10Bタンパク質を発現する細胞)の存在または非存在について評価することによって、試験され得る。この試験は、例えば、161P2F10B発現細胞が、通常ではこのような細胞を含まない生物学的サンプル(例えば、リンパ節)中に見出された場合、調節不全性の細胞増殖の証拠を提供し得る。なぜなら、生物学的サンプル中の161P2F10Bの状態におけるこのような変化は、しばしば、調節不全性の細胞増殖に付随するからである。詳細には、調節不全性の細胞増殖の1つの指標は、起源の器官(例えば、前立腺)から身体の異なる領域(例えば、リンパ節)への癌細胞の転移である。この状況において、調節不全性の細胞増殖の証拠は、重要である。なぜなら、例えば、前立腺癌を有する患者のうちのかなりの比率において、潜伏性リンパ節転移が検出され得、そしてこのような転移は、疾患の進行の既知の予測因子と関連するからである(例えば、Murphyら、Prostate 42(4):315-317(2000);Suら、Semin.Surg.Oncol.18(1):17-28(2000)およびFreemanら、J Urol 1995 Aug 154(2 Pt 1):474-8を参照のこと)。

10

20

【0181】

1つの局面において、本発明は、調節不全性の細胞増殖に関連する疾患(例えば、過形成または癌)を有すると疑われる個体由来の細胞により発現される161P2F10B遺伝子産物の状態を決定し、次いでこのように決定した状態を、対応する正常なサンプル中の161P2F10B遺伝子産物の状態と比較することによって、161P2F10B遺伝子産物をモニターするための方法を提供する。正常なサンプルと比較して、試験サンプル中の異常な161P2F10B遺伝子産物の存在は、個体の細胞内の調節不全性の細胞増殖の存在の指標を提供する。

【0182】

別の局面において、本発明は、個体における癌の存在を決定する際に有用なアッセイを提供し、このアッセイは、対応する正常な細胞または正常な組織における発現レベルと比較して、試験細胞サンプルまたは試験組織サンプル中の161P2F10B mRNAまたは161P2F10Bタンパク質の発現の有意な増加を検出する工程を包含する。例えば、161P2F10B mRNAの存在は、表Iに列挙される組織を包含するがそれに限定されない組織において評価され得る。これらの組織のいずれかにおける有意な161P2F10B発現の存在は、癌の発症、存在および/または重篤度を示すために有用である。なぜなら、対応する正常な組織は、161P2F10B mRNAを発現しないか、これを低レベルでしか発現しないからである。

30

【0183】

関連の実施形態において、161P2F10Bの状態は、核酸レベルでよりもむしろタンパク質レベルで決定される。例えば、このような方法は、試験組織サンプル中の細胞により発現される161P2F10Bタンパク質のレベルを決定し、このように決定されたレベルを、対応する正常なサンプルにおいて発現される161P2F10Bのレベルと比較する工程を包含する。一実施形態において、161P2F10Bタンパク質の存在は、例えば、免疫組織化学方法を使用して、評価される。161P2F10Bタンパク質発現を検出し得る161P2F10B抗体または161P2F10B結合パートナーが、この目的のために、当該分野で周知の種々のアッセイ様式で使用される。

40

【0184】

さらなる実施形態において、生物学的サンプル中の161P2F10Bヌクレオチド配列および161P2F10Bアミノ酸配列の状態が、これらの分子の構造における変動を

50

同定するために、評価され得る。これらの変動としては、挿入、欠失、置換などが挙げられ得る。このような評価は、有用である。なぜなら、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における変動は、増殖調節不全性の表現型と関連する多数のタンパク質において観察されるからである（例えば、Marrोगीら、1999, J. Cutan. Pathol. 26(8):369-378を参照のこと）。例えば、161P2F10Bの配列における変異は、腫瘍の存在または発癌補助作用を示し得る。従って、このようなアッセイは、161P2F10Bにおける変異が潜在的な機能喪失または腫瘍増殖の増加を示す場合、診断的価値および予測的価値を有する。

【0185】

ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における変動を観察するための種々のアッセイが、当該分野で周知である。例えば、161P2F10B遺伝子産物の核酸配列またはアミノ酸配列のサイズおよび構造は、本明細書中で考察されるノーザンプロトコル、サザンプロトコル、ウェスタンプロトコル、PCRプロトコルおよびDNA配列決定プロトコルにより観察される。さらに、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における変動を観察するための他の方法（例えば、一本鎖高次構造多型分析）が、当該分野で周知である（例えば、米国特許第5,382,510号（1999年9月7日発行）および同第5,952,170号（1995年1月17日発行）を参照のこと）。

【0186】

さらに、生物学的サンプル中の161P2F10B遺伝子のメチル化状態が試験され得る。遺伝子の5'調節領域中のCpGアイランドの異常な脱メチル化および/または過剰メチル化が、しばしば、不死化細胞および形質転換細胞において生じ、種々の遺伝子の変化した発現を生じ得る。例えば、クラスのグルタチオンS-トランスフェラーゼ（正常な前立腺において発現されるタンパク質であり、前立腺癌の90%より多くにおいては発現されない）のプロモーター過剰メチル化は、この遺伝子の転写を永久的に止めるようであり、最も頻繁に検出される前立腺癌におけるゲノム変化である（De Marzora, Am. J. Pathol. 155(6):1985-1992(1999)）。さらに、この変化は、高度な前立腺上皮内新形成（PIN）の症例のうちの少なくとも70%において存在する（Brooksら、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536）。別の例において、LAGE-I腫瘍特異的遺伝子の発現（これは、正常な前立腺においては発現されないが、前立腺癌の25~50%において発現される）は、リンパ芽球細胞においてデオキシ-アザシチジンにより誘導され、このことは、腫瘍発現が脱メチル化に起因することを示唆している（Letheら、Int. J. Cancer 76(6):903-908(1998)）。遺伝子のメチル化状態を試験するための種々のアッセイが、当該分野で周知である。例えば、当業者は、サザンハイブリダイゼーションアプローチにおいて、メチル化されたCpG部位を含む配列を切断し得ないメチル化感受性制限酵素を使用して、CpGアイランドのメチル化状態を評価し得る。さらに、MSP（メチル化特異的PCR）は、所定の遺伝子のCpGアイランド中に存在する全てのCpG部位のメチル化状態を容易にプロファイルし得る。この手順は、亜硫酸水素ナトリウム（これはメチル化されていない全てのシトシンをウラシルに変換する）によりまずDNAを改変し、続いてメチル化されていないDNAに対してメチル化されたDNAに特異的なプライマーを使用して増幅することを包含する。メチル化干渉を含むプロトコルはまた、例えば、Current Protocols

In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubelら編、1995において見出され得る。

【0187】

遺伝子増幅は、161P2F10Bの状態を評価するためのさらなる方法である。遺伝子増幅は、本明細書中で提供される配列に基づいて、例えば、適切に標識されたプローブを使用して、mRNAの転写を定量するための従来のサザンプロットティングまたはノーザンプロットティング（Thomas, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci.

10

20

30

40

50

USA, 77:5201-5205)、ドットプロット(DNA分析)、またはインサイチュハイブリダイゼーションによってサンプル中で直接測定される。あるいは、特定の二重鎖(DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む)を認識する抗体が、使用される。次いで、この抗体は、標識され、そしてアッセイが実施され、このアッセイにおいて、この二重鎖は、表面に結合され、その結果、この表面上で二重鎖が形成されると、この二重鎖に結合した抗体の存在が、検出され得る。

【0188】

生検組織または末梢血が、例えば、ノーザン分析、ドットプロット分析またはRT-PCR分析を使用して、癌細胞の存在について簡便にアッセイされて、161P2F10B 10
発現が検出され得る。RT-PCR増幅可能な161P2F10B mRNAの存在は、癌の存在の指標を提供する。RT-PCRアッセイは、当該分野で周知である。末梢血中の腫瘍細胞のためのRT-PCR検出アッセイは、多数のヒト固形腫瘍の診断および管理において使用するために、現在評価されている。前立腺癌の分野において、このアッセイには、PSAおよびPSMを発現する細胞の検出のためのRT-PCRアッセイが挙げられる(Verkaikら、1997、Urol. Res. 25:373-384; Ghosseinら、1995、J. Clin. Oncol. 13:1195-2000; Hestonら、1995、Clin. Chem. 41:1687-1688)。

【0189】

本発明のさらなる局面は、発症中の癌に対して個体が有する感受性の評価である。一実施形態において、癌に対する感受性を予想するための方法は、組織サンプル中の161P2F10B mRNAまたは161P2F10Bタンパク質(その存在は、癌に対する感受性を示す)を検出する工程を包含し、ここで、161P2F10B mRNA発現の程度は、感受性の程度と相関する。特定の実施形態において、前立腺または他の組織中の161P2F10Bの存在が、試験され、ここで、このサンプル中の161P2F10Bの存在は、前立腺癌感受性(または前立腺腫瘍の発症もしくは存在)の指標を提供する。同様に、生物学的サンプル中の161P2F10Bヌクレオチド配列および161P2F10Bアミノ酸配列の完全性を評価し得、これらの分子の構造における変動(例えば、挿入、欠失、置換など)を同定し得る。このサンプル中の161P2F10B遺伝子産物の1つ以上の変動の存在は、癌感受性(または腫瘍の発症もしくは存在)の指標である。 20
30

【0190】

本発明はまた、腫瘍の攻撃性を評価するための方法を包含する。一実施形態において、腫瘍の攻撃性を評価するための方法は、腫瘍細胞によって発現される161P2F10B mRNAまたは161P2F10Bタンパク質のレベルを決定する工程、このように決定したレベルを、同じ個体もしくは正常な組織参照サンプルから採取した対応する正常な組織において発現される161P2F10B mRNAまたは161P2F10Bタンパク質のレベルと比較する工程を包含し、ここで正常なサンプルに対する腫瘍サンプルにおける161P2F10B mRNAまたは161P2F10Bタンパク質の発現の程度は、攻撃性の程度を示す。特定の実施形態において、腫瘍の攻撃性は、161P2F10Bが腫瘍細胞において発現される程度を決定することによって評価され、ここでより高い発現レベルは、より攻撃性の腫瘍を示す。別の実施形態は、161P2F10Bヌクレオチドおよびアミノ酸の構造における変動(例えば、挿入、欠失、置換など)を同定するための、生物学的サンプル中のこの161P2F10Bヌクレオチドおよびアミノ酸配列の完全性の評価である。1つ以上の変動の存在は、より攻撃性の腫瘍を示す。 40

【0191】

本発明の別の実施形態は、個体における悪性腫瘍の進行を経時的に観察するための方法に関する。一実施形態において、個体における悪性腫瘍の進行を経時的に観察するための方法は、この腫瘍のサンプル中の細胞により発現される161P2F10B mRNAまたは161P2F10Bタンパク質のレベルを決定する工程、このようにして決定されたレベルを、異なる時間に同じ個体から採取した同等な組織サンプルにおいて発現される1 50

6 1 P 2 F 1 0 B mRNAまたは1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質のレベルと比較する工程、を包含し、ここで、経時的な腫瘍サンプルにおける1 6 1 P 2 F 1 0 B mRNAまたは1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質の発現の程度は、癌の進行についての情報を提供する。特定の実施形態において、癌の進行は、腫瘍細胞における1 6 1 P 2 F 1 0 Bの発現を経時的に決定することにより評価され、ここで経時的に増加した発現は、癌の進行を示す。また、生物学的サンプル中の1 6 1 P 2 F 1 0 Bヌクレオチド配列および1 6 1 P 2 F 1 0 Bアミノ酸配列の完全性を評価し得、1 6 1 P 2 F 1 0 Bヌクレオチドおよび1 6 1 P 2 F 1 0 Bアミノ酸の構造における変動（例えば、挿入、欠失、置換など）を同定し得、ここで、1つ以上の変動の存在は、癌の進行を示す。

【0192】

上記の診断アプローチは、当該分野で公知の種々の予後プロトコルおよび診断プロトコルのいずれか1つと組み合わせられ得る。例えば、本発明の別の実施形態は、1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子の発現および1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子産物の発現（または1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子の変動および1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子産物における変動）、組織サンプルの状態を診断および予想するための手段としての悪性腫瘍に関連する因子との間の同時発生を観測する方法に関する。悪性腫瘍に関連する種々の因子（例えば、悪性腫瘍に関連する遺伝子（例えば、前立腺癌についてのPSA、PSCAおよびPSMの発現など）、ならびに肉眼で見える細胞学的知見）が、使用され得る（例えば、Bockingら、1984, Anal. Quant. Cytol. 6(2): 74-88; Epstein, 1995, Hum. Pathol. 26(2): 223-9; Thorsonら、1998, Mod. Pathol. 11(6): 543-51; Baisdenら、1999, Am. J. Surg. Pathol. 23(8): 918-24を参照のこと）。1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子の発現および1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子産物の発現（または、1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子および1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子産物における変動）と、悪性腫瘍に関連する別の因子との間の同時発生を観察するための方法は、有用である。なぜなら、例えば、疾患と同時に生じる特定の因子のセットの存在は、組織サンプルの状態を診断および予後診断するために重要な情報を提供するからである。

【0193】

一実施形態において、1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子の発現および1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子産物の発現（または、1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子および1 6 1 P 2 F 1 0 B遺伝子産物における変動）と、悪性腫瘍に関連する別の因子との間の同時発生を観察するための方法は、組織サンプル中の1 6 1 P 2 F 1 0 B mRNAまたは1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質の過剰発現を検出すること、組織サンプル中のPSA mRNAまたはPSAタンパク質の過剰発現（またはPSCA発現もしくはPSM発現）を検出すること、および1 6 1 P 2 F 1 0 B mRNAもしくは1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質の過剰発現と、PSA mRNAもしくはPSAタンパク質の過剰発現（またはPSCA発現もしくはPSM発現）との同時発生を観察することを伴う。特定の実施形態において、前立腺組織における1 6 1 P 2 F 1 0 B mRNAおよびPSA mRNAの発現が、試験され、ここで、このサンプル中の1 6 1 P 2 F 1 0 B mRNA過剰発現とPSA mRNA過剰発現との同時発生は、前立腺癌の存在、前立腺癌感受性または前立腺腫瘍の発症もしくは状態を示す。

【0194】

1 6 1 P 2 F 1 0 B mRNAまたは1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質の発現を検出および定量するための方法が、本明細書中に記載されており、そして標準核酸およびタンパク質の検出技術および定量技術は、当該分野で周知である。1 6 1 P 2 F 1 0 B mRNAの検出および定量するための標準方法としては、標識1 6 1 P 2 F 1 0 Bリボプローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーション、1 6 1 P 2 F 1 0 Bポリヌクレオチドプローブを使用するノーザンプロットおよび関連する技術、1 6 1 P 2 F 1 0 Bに対して特異的なプライマーを使用するRT-PCR分析、並びに他の増幅型検出方法（例えば、分枝DNA、SISBA、TMAなど）が挙げられる。特定の実施形態において、半定量的

10

20

30

40

50

RT-PCRを使用して、161P2F10B mRNA発現を検出および定量する。161P2F10Bを増幅し得る任意の数のプライマーを、この目的のために使用し得、このプライマーとしては、本明細書中で具体的に記載される種々のプライマーセットが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、野生型161P2F10Bタンパク質と特異的に反応するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を、生検組織の免疫組織化学アッセイにおいて使用し得る。

【0195】

(IX. 161P2F10Bと相互作用する分子の同定)

本明細書中に開示される161P2F10Bタンパク質および核酸配列は、当業者が、161P2F10Bと相互作用するタンパク質、低分子および他の薬剤、ならびに種々の分野で受け入れられたプロトコルのうちのいずれか1つを介して、161P2F10Bによって活性化される経路を同定することを可能にする。例えば、いわゆる相互作用トラップ系(「2ハイブリッドアッセイ」とも呼ばれる)のうちの1つを利用し得る。このような系において、分子は、レポーター遺伝子の発現を指向する転写因子と相互作用し、そして再構成し、一方でこのレポーター遺伝子の発現をアッセイする。他の系は、真核生物転写活性化因子の再構築を介して、インピボでタンパク質-タンパク質相互作用を同定する(例えば、1999年9月21日に発行された米国特許第5,955,280号、1999年7月20日に発行された同第5,925,523号、1998年12月8日に発行された同第5,846,722号、および1999年12月21日に発行された同第6,004,746号を参照のこと)。アルゴリズムもまた、タンパク質機能のゲノムベースの予測のために当該分野で利用可能である(例えば、Marcotteら, Nature 402:1999年11月4日, 83-86を参照のこと)。

【0196】

あるいは、161P2F10Bタンパク質配列と相互作用する分子を同定するために、ペプチドライブラリーをスクリーニングし得る。このような方法において、161P2F10Bに結合するペプチドは、アミノ酸のランダムな収集物または制御された収集物をコードするライブラリーをスクリーニングすることによって同定される。このライブラリーによってコードされたペプチドは、バクテリオファージコートタンパク質の融合タンパク質として発現され、次いで、このバクテリオファージ粒子は、161P2F10Bタンパク質に対してスクリーニングされる。

【0197】

従って、種々の広範の用途(例えば、治療剤、予後剤または診断剤)を有するペプチドは、予想されるリガンド分子またはレセプター分子の構造に関する以前の情報なしで同定される。161P2F10Bタンパク質配列と相互作用する分子を同定するために使用され得る、代表的なペプチドライブラリーおよびスクリーニング方法は、例えば、1998年3月3日に発行された米国特許第5,723,286号、および1998年3月31日に発行された同第5,733,731号で開示される。

【0198】

あるいは、161P2F10Bを発現する細胞株は、161P2F10Bによって媒介されるタンパク質-タンパク質相互作用を同定するために使用される。このような相互作用は、免疫沈降技術(例えば、Hamilton B. J.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1999, 261:646-51を参照のこと)を使用して試験され得る。161P2F10Bタンパク質は、抗161P2F10B抗体を使用する161P2F10B発現細胞株から免疫沈降され得る。あるいは、His-tagに対する抗体は、161P2F10BおよびHis-tag(上記のベクター)の融合物を発現するように操作された細胞株中で使用され得る。この免疫沈降複合体は、ウェスタンブロット、タンパク質の³⁵S-メチオニン標識、タンパク質のマイクロシーケンシング、銀染色および2次元ゲル電気泳動のような手順に沿ってタンパク質に関して試験され得る。

【0199】

161P2F10Bと相互作用する低分子およびリガンドは、このようなスクリーニングアッセイの関連する実施形態を介して同定され得る。例えば、タンパク質機能に干渉する低分子（リン酸化および脱リン酸化、DNA分子またはRNA分子との相互作用を媒介し得る161P2F10Bの能力に干渉する分子を含む）により、細胞サイクル、第2メッセンジャーシグナル伝達、または腫瘍形成の調節の指標として同定され得る。同様に、161P2F10B関連イオンチャネル、タンパク質ポンプ、または細胞連絡機能を調節する低分子を、161P2F10Bを発現する癌を有する患者を処置するために、同定および使用される（例えば、Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes* 第2版, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992）。さらに、161P2F10B機能を調節するリガンドは、161P2F10Bに結合し、そしてレポーター構築物を活性化するためのそれらの能力に基づいて同定され得る。代表的な方法は、例えば、1999年7月27日に発行された米国特許第5,928,868号において議論されており、そして少なくとも1つのリガンドが低分子である、ハイブリッドリガンドを形成するための方法を含む。例示の実施形態において、161P2F10BおよびDNA結合タンパク質の融合タンパク質を発現するために操作された細胞を使用して、ハイブリッドリガンド/低分子の融合タンパク質およびcDNAライブラリー転写活性化タンパク質を同時発現する。この細胞は、レポーター遺伝子（この発現は、第1融合タンパク質および第2融合タンパク質が互いに隣接した状態に調整される）をさらに含み、この事象は、ハイブリッドリガンドが、両方のハイブリッドタンパク質の標的部位に結合する場合のみ生じる。レポーター遺伝子が発現するこれらの細胞を選択し、そして未知の低分子または未知のリガンドを同定する。この方法は、161P2F10Bを活性化または阻害する、調節因子を同定する手段を提供する。

【0200】

本発明の実施形態は、図2または図3に示される161P2F10Bアミノ酸配列と相互作用する分子をスクリーニングする方法を含み、この方法は、一群の分子と161P2F10Bアミノ酸配列とを接触させる工程、上記一群の分子と上記161P2F10Bアミノ酸配列とを、相互作用を容易にする条件下で相互作用させる工程、161P2F10Bアミノ酸配列と相互作用する分子の存在を決定する工程、次いで、161P2F10Bアミノ酸配列を相互作用しない分子を相互作用する分子から分離する工程を包含する。特定の実施形態において、この方法は、161P2F10Bアミノ酸配列と相互作用する分子を精製する工程、特徴付けする工程および同定する工程をさらに包含する。この同定された分子は、161P2F10Bによって実施される機能を調節するために使用され得る。好ましい実施形態において、161P2F10Bアミノ酸配列は、ペプチドライブラリーと接触される。

【0201】

（X．治療方法および組成物）

限定されたセットの組織において正常に発現されるが、前立腺癌および他の癌においても発現されるタンパク質のような161P2F10Bの同定により、多数の治療アプローチをこのような癌の処置に広げる。本明細書において企図されるように、161P2F10Bは、腫瘍促進遺伝子を活性化すること、または腫瘍形成をブロックする遺伝子を抑制することに関連する転写因子として機能する。

【0202】

従って、161P2F10Bタンパク質の活性を阻害する治療アプローチは、161P2F10Bを発現する癌を患った患者に有用である。このような治療アプローチは、一般に、2つのクラスに入る。一つのクラスは、161P2F10Bタンパク質とその結合パートナーまたは他のタンパク質との結合または会合を阻害するための種々の方法を含む。別のクラスは、161P2F10B遺伝子の転写または161P2F10B mRNAの翻訳を阻害するための種々の方法を含む。

【0203】

10

20

30

40

50

(X . A . 抗癌ワクチン)

本発明は、161P2F10B関連タンパク質または161P2F10B関連核酸を含む、癌ワクチンを提供する。161P2F10Bの発現に関して、癌ワクチンは、非標的組織において最小の効果または効果なしで、161P2F10B発現癌を予防および/または処置する。抗癌治療として、体液性免疫応答および/または細胞媒介免疫応答を生じるワクチンにおける腫瘍抗原の使用は、当該分野で周知であり、ヒトPSMAおよびげっ歯類PAP免疫原を使用して前立腺癌において利用されている (Hodgeら, 1995, *Int. J. Cancer* 63: 231 - 237; Fongら, 1997, *J. Immunol.* 159: 3113 - 3117)。

【0204】

このような方法は、161P2F10B関連タンパク質、または161P2F10Bコード核酸分子および161P2F10B免疫原(これは、代表的に、多数の抗体またはT細胞エピトープを含む)を発現および提示し得る組換えベクターを利用することによって容易に実施され得る。当業者は、免疫反応性エピトープの送達のための広範な種々のワクチン系が当該分野で周知であることを理解する(例えば、Herylnら, *Ann Med* 1999年2月, 31(1): 66 - 78; Maruyamaら, *Cancer Immunol Immunother* 2000年6月, 49(3): 123 - 32)。簡潔には、哺乳動物において、免疫応答(例えば、体液性免疫応答および/または細胞媒介免疫応答)を生じるこのような方法は、以下の工程を包含する: 免疫反応性エピトープ(例えば、エピトープは、図3に示される161P2F10Bタンパク質、またはそのアナログもしくはホモログ中に存在する)に哺乳動物の免疫系を曝露し、その結果、この哺乳動物に、エピトープに対して特異的な免疫応答を生じさせる(例えば、このエピトープを特異的に認識する抗体を生じさせる)工程。好ましい方法において、161P2F10B免疫原は、生物学的モチーフを含む(例えば、表VIIII-XXIおよびXXII-XLIX、または図5、図6、図7、図8、および図9に示される161P2F10B由来のあるサイズ範囲のペプチドを参照のこと)。

【0205】

完全161P2F10Bタンパク質、免疫原性領域またはそれらのエピトープを、種々の手段によって合わせ、および送達し得る。このようなワクチン組成物としては、例えば、以下が挙げられる: リポペプチド(例えば、Vitiello, A.ら, *J. Clin. Invest.* 95: 341, 1995)、ポリ(DL-ラクチド-コ-グリコリド)(「PLG」)マイクロカプセル中にカプセル化されたペプチド組成物(例えば、Eldridgeら, *Molec. Immunol.* 28: 287 - 294, 1991; Alonsoら, *Vaccine* 12: 299 - 306, 1994; Jonesら, *Vaccine* 13: 675 - 681, 1995を参照のこと)、免疫刺激複合体(ISCOMS)に含まれたペプチド組成物(例えば、Takahashiら, *Nature* 344: 873 - 875, 1990; Huら, *Clin Exp Immunol.* 113: 235 - 243, 1998を参照のこと)、多抗原ペプチド系(MAP)(例えば、Tam, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5409 - 5413, 1988; Tam, J. P., *J. Immunol. Methods* 196: 17 - 32, 1996を参照のこと)、多価ペプチドとして処方されたペプチド、弾道送達系において使用するためのペプチド(代表的に、結晶化したペプチド)、ウイルス送達ベクター(Perkus, M. E.ら, *Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E. 編, 第379頁, 1996; Chakrabarti, S.ら, *Nature* 320: 535, 1986; Hu, S. L.ら, *Nature* 320: 537, 1986; Kienny, M. - P.ら, *AIDS Bio/Technology* 4: 790, 1986; Top, F. H.ら, *J. Infect. Dis.* 124: 148, 1971; Chanda, P. K.ら, *Virology* 175: 535, 1990)、ウイルス起源または合成起源の粒子(例えば、Kofler, N.ら, *J. Immunol. Methods* 192: 25, 1996

10

20

30

40

50

; Eldridge, J. H. *ら*, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993; Fallo, L. D. Jr. *ら*, *Nature Med.* 7:649, 1995)、アジュバント (Warren, H. S., Vogel, F. R. および Chedid, L. A. *Ann. Rev. Immunol.* 4:369, 1986; Gupta, R. K. *ら*, *Vaccine*

11:293, 1993)、リポソーム (Reddy, R. *ら*, *J. Immunol.* 148:1585, 1992; Rock, K. L., *Immunol. Today* 17:131, 1996) または裸の cDNA もしくは粒子吸収 cDNA (Ulmer, J. B. *ら*, *Science* 259:1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L. A. および Webster, R. G., *Vaccine* 11:957, 1993; Shiver, J. W. *ら*, *Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E. 編, 第423頁, 1996; Cease, K. B. および Berzofsky, J. A., *Ann. Rev. Immunol.* 12:923, 1994 および Eldridge, J. H. *ら*, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993)。毒素標的送達技術 (レセプター媒介標的化 (例えば、Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts) のレセプター媒介標的化) としても公知) もまた、使用され得る。

10

【0206】

161P2F10B に関連する癌を有する患者において、本発明のワクチン組成物はまた、癌のために使用される他の処置 (例えば、手術、化学療法、薬物治療、放射線治療など (IL-2、IL-12、GM-CSF などのような免疫アジュバントと組み合わせた使用を含む)) と合わせて使用され得る。

20

【0207】

(細胞ワクチン)

CTL エピトープは、対応する HLA 対立遺伝子に結合する 161P2F10B タンパク質内のペプチドを同定するための特定のアルゴリズムを使用して決定され得る: (例えば表 IV; EpimerTM および EpimatrixTM, Brown University (URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); および BIMAS (URL biomas.dcr.t.nih.gov/; SYFPEITHI URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com))。好ましい実施形態において、161P2F10B 免疫原は、当該分野で周知の技術を使用して同定された 1 種以上のアミノ酸配列を含み、これらは、表 VII I - XX I および XX II ~ XL IX に示される配列、または HLA クラス I モチーフ/スーパーモチーフによって特定された 8 個、9 個、10 個もしくは 11 個のアミノ酸のペプチド (例えば、表 IV (A)、表 IV (D)、または表 IV (E))、および/または HLA クラス II モチーフ/スーパーモチーフを含む、少なくとも 9 個のアミノ酸のペプチド (例えば、表 IV (B)、または表 IV (C)) である。当該分野で理解されているように、HLA クラス I 結合溝は、本質的に、閉鎖的に終結され、その結果、特定のサイズ領域のみのペプチドが、溝に適合し、かつ、結合され得、一般に、HLA クラス I エピトープは、8、9、10、または 11 個のアミノ酸長である。対照的に、HLA クラス II 結合溝は、本質的に、開放的に終結され、従って、約 9 個以上のアミノ酸のペプチドは、HLA クラス II 分子によって結合され得る。HLA クラス I と HLA クラス II との間の結合溝の差異に起因して、HLA クラス I モチーフは、長さ特異的である。すなわち、クラス I モチーフの 2 つの位置は、このペプチドのアミノからカルボキシル方向の第 2 アミノ酸である。クラス II モチーフのアミノ酸位置は、互いに対してのみ相関し、全体のペプチドに対して相関していない。すなわち、さらなるアミノ酸は、モチーフ保有配列のアミノ末端および/またはカルボキシル末端に付着され得る。HLA クラス II エピトープは、しばしば、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 アミノ酸

30

40

50

長、または25アミノ酸長よりも長い。

【0208】

(抗体ベースのワクチン)

哺乳動物において免疫応答を発生するための広範な種々の方法は、(例えば、ハイブリドーマの発生における第1工程として)当該分野で公知である。哺乳動物における免疫応答を発生させる方法は、タンパク質(例えば、161P2F10Bタンパク質)上の免疫原性エピトープに哺乳動物の免疫系を曝露し、その結果、免疫応答を発生させる工程を包含する。代表的な実施形態は、十分な量の少なくとも1つの161P2F10B B細胞もしくは細胞傷害性T細胞エピトープまたはそれらのアナログを宿主と接触させ;そして少なくとも1回の周期的な間隔の後、161P2F10B B細胞もしくは細胞傷害性T細胞エピトープまたはそれらのアナログを宿主と再び接触させることによって、宿主において、161P2F10Bに対する免疫応答を発生させるための方法からなる。特定の実施形態は、161P2F10B関連タンパク質または人工多エピトープペプチドに対する免疫応答を発生する方法からなり、この方法は、161P2F10B免疫原(例えば、161P2F10Bタンパク質またはそのペプチドフラグメント、161P2F10B融合タンパク質またはアナログなど)を、ヒトまたは別の哺乳動物に対してワクチン調製物として投与する工程を包含する。代表的に、このようなワクチン調製物は、さらに、適切なアジュバント(例えば、米国特許第6,146,635号)またはPADRE™ペプチドのような汎用ヘルパーエピトープ(Epimmune Inc., San Diego, CA;例えば、Alexanderら, J. Immunol. 2000 164(3); 164(3):1625-1633; Alexanderら, Immunity 1994 1(9):751-761およびAlexanderら, Immunol. Res. 1998 18(2):79-92を参照のこと)を含む。代替方法は、161P2F10B免疫原をコードするDNA配列、DNA配列の発現を制御する調製配列に作動可能に連結されたDNA配列を含むDNA分子を、個体の身体の筋肉または皮膚にインビボで投与することによって、161P2F10B免疫原に対して個体の免疫応答を発生させる工程を包含し、ここで、このDNA分子は、細胞によって取り込まれ、DNA配列は、この細胞において発現され、そして免疫応答を、免疫原に対して発生する(例えば、米国特許第5,962,428号を参照のこと)。必要に応じて、遺伝子ワクチン促進因子(facilitator)(例えば、アニオン性脂質;サポニン;レクチン;エストロゲン化合物;ヒドロキシル化低級アルキル;ジメチルスルホキシド;および尿素)がまた、投与される。さらに、161P2F10Bを模倣する抗イディオタイプ抗体が、標的抗原に対する応答を発生させるために投与され得る。

【0209】

(核酸ワクチン)

本発明のワクチン組成物は、核酸媒介様式を含む。本発明のタンパク質をコードするDNAまたはRNAは、患者に投与され得る。遺伝子免疫方法は、161P2F10Bを発現する癌細胞に対する、予防的または治療的な体液性免疫応答および細胞性免疫応答を発生させるために利用され得る。161P2F10B関連タンパク質/免疫原をコードするDNAを含む構成物および適切な調節配列は、個体の筋肉または皮膚に直接注射され得、その結果、筋肉または皮膚の細胞は、この構成物を取り込み、そしてコードされた161P2F10Bタンパク質/免疫原を発現する。あるいは、ワクチンは、161P2F10B関連タンパク質を含む。161P2F10B関連タンパク質免疫原の発現は、161P2F10Bタンパク質を保有する細胞に対する、予防的または治療的な体液性免疫および細胞性免疫の発生を生じる。当該分野で公知の、種々の予防的および治療的な遺伝子免疫技術は、使用され得る(総説については、インターネットアドレス genweb.comで公開されている情報および参考文献を参照のこと)。核酸ベース送達は、例えば、Wolffら, Science 247:1465(1990)および米国特許第5,580,859号;同第5,589,466号;同第5,804,566号;同第5,739,118号;同第5,736,524号;同第5,679,647号;WO 98/04

10

20

30

40

50

720に記載されている。DNAベースの送達技術の例としては、「裸のDNA」、促進された(ブピバカイン(bupivacaine)、ポリマー、ペプチド媒介)送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介送達(「遺伝子銃」)または圧力媒介送達(例えば、米国特許第5,922,687号を参照のこと)を含む。

【0210】

治療的または予防的な免疫の目的のために、本発明のタンパク質は、ウイルスベクターまたは細菌ベクターを介して発現され得る。本発明の実施において使用され得る種々のウイルス遺伝子送達系としては、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、およびシンドビスウイルス(例えば、Restifo, 1996, *Current Opin. Immunol.* 8:658-663; Tsangら, *J. Natl. Cancer Inst.* 87:982-990(1995)を参照のこと)が挙げられるが、これらに限定されない。非ウイルス送達系もまた、抗腫瘍応答を誘導するために、161P2F10B関連タンパク質をコードする裸のDNAを(例えば筋内または皮内で)患者に導入することにより利用され得る。

10

【0211】

ワクシニアウイルスは、例えば、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するためのベクターとして使用される。宿主への導入の際に、組換えワクシニアウイルスは、タンパク質免疫原性ペプチドを発現し、そしてこれによって、宿主免疫応答を惹起する。免疫プロトコルにおいて有用なワクチンベクターおよび方法は、例えば、米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターは、BCG(Bacille Calmette Guerin)である。BCGベクターは、Stoverら, *Nature* 351:456-460(1991)に記載されている。本発明のペプチドの治療的投与または免疫のための有用な、広範な種々の他のベクター(例えば、アデノウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、Salmonella typhiベクター、無毒化炭疽毒素ベクターなど)は、本明細書の記載から当業者に明らかである。

20

【0212】

従って、遺伝子送達系は、161P2F10B関連核酸分子を送達するために使用される。一つの実施形態において、全長ヒト161P2F10B cDNAを使用する。別の実施形態において、特異的な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)および/または抗体エピートープをコードする161P2F10B核酸分子を使用する。

30

【0213】

(エキソピボワクチン)

種々のエキソピボストラテジーを利用して、免疫応答もまた発生させ得る。一つのアプローチは、患者の免疫系に対して161P2F10B抗原を提示する樹状細胞(DC)のような抗原提示細胞(APC)の使用に関する。樹状細胞は、MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子、B7補助刺激因子、ならびにIL-12を発現し、従って、高度に特異的な抗原提示細胞である。前立腺癌において、前立腺特異的膜抗原(PSMA)のペプチドによりパルスされる自己樹状細胞が、前立腺癌患者の免疫系を刺激するために、第I相臨床試験において使用される(Tjoaら, 1996, *Prostate* 28:65-69; Murphyら, 1996, *Prostate* 29:371-380)。従って、樹状細胞は、MHCクラスI分子またはMHCクラスII分子の内容物中で、161P2F10BペプチドをT細胞に提示するために使用され得る。一つの実施形態において、自己樹状細胞は、MHCクラスI分子および/またはMHCクラスII分子に結合し得る161P2F10Bペプチドでパルスされる。別の実施形態において、樹状細胞は、完全161P2F10Bタンパク質でパルスされる。なお別の実施形態は、当該分野で公知の種々の実行ベクターを使用する樹状細胞中で、161P2F10B遺伝子の過剰発現を操作することに関する(例えば、アデノウイルス(Arthurら, 1997, *Cancer Gene Ther.* 4:17-25)、レトロウイルス(Henderso

40

50

nら、1996、Cancer Res. 56:3763-3770)、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、DNAトランスフェクション(Ribasら、1997、Cancer Res. 57:2865-2869)、または腫瘍誘導RNAトランスフェクション(Ashleyら、1997、J. Exp. Med. 186:1177-1182))。161P2F10Bを発現する細胞はまた、免疫調節因子(例えば、GM-CSF)を発現するように操作され得、そして免疫剤として使用され得る。

【0214】

(X.B.抗体ベースの治療のための標的としての161P2F10B)

161P2F10Bは、抗体ベースの治療ストラテジーのための魅力的な標的である。多数の抗体ストラテジーは、細胞外分子と細胞内分子との両方を標的するために、当該分野で公知である(例えば、相補体およびADCC媒介の死滅および身体内での使用を参照のこと)。161P2F10Bは、対応する正常な細胞に対する種々の系統の癌細胞によって発現されるので、免疫活性組成物を非標的器官および組織に結合することによって生じる、毒性効果、非特異的効果および/または非標的効果なしで、優れた感受性を示す、161P2F10B免疫活性組成物の全身投与を調製する。161P2F10Bのドメインと特異的に反応する抗体は、トキシンまたは治療剤と組み合わせるか、または細胞増殖または機能を阻害し得る裸の抗体としてのいずれかで、全身的に161P2F10Bを発生する癌を処置するために有用である。

10

【0215】

161P2F10B抗体は、抗体が161P2F10Bに結合し、そして機能(例えば、結合パートナーとの相互作用)を調節し、そして結果として腫瘍細胞の破壊を媒介し、そして/または腫瘍細胞の増殖を阻害するように、患者に導入され得る。このような抗体が治療効果を発揮する機構としては、補体媒介性細胞溶解、抗体依存性細胞性細胞傷害、161P2F10Bの生理学的機能を調節すること、リガンド結合またはシグナル伝達経路を阻害すること、腫瘍細胞分化を調節すること、腫瘍脈管形成因子プロファイルを変化させること、および/またはアポトーシスを包含し得る。

20

【0216】

当業者は、抗体が、免疫原性分子(例えば、図2または図3に示される161P2F10B配列の免疫原性領域)を特異的に標的および結合するために使用され得ることを理解する。さらに、当業者は、抗体を細胞傷害性薬剤に結合体化することは慣用的であることを理解する(例えば、Sleversら、Blood 93:113678-3684(1999年6月1日)を参照のこと)。細胞傷害性薬剤および/または治療剤が、例えば、この細胞(例えば、161P2F10B)によって発現される分子に対して特異的な抗体にそれらの薬剤を結合体化させることによって、細胞に直接送達される場合、この細胞傷害性薬剤は、それらの細胞上において公知の生物学的効果(例えば、細胞傷害性)を発揮する。

30

【0217】

抗体-細胞傷害性薬剤結合体を使用して細胞を死滅させるための広範な種々の組成物および方法が、当該分野で公知である。癌の状況において、代表的な方法は、腫瘍を有する哺乳動物に、生物学的に有効な量の結合体を投与する工程を包含し、この結合体は、発現されたか、結合に接触可能か、または細胞表面上に局在化された、マーカー(例えば、161P2F10B)に結合する標的試薬(例えば、抗161P2F10B抗体)に連結される、選択された細胞傷害性薬剤および/または治療剤を含む。代表的な実施形態は、細胞傷害性薬剤および/または治療剤を、161P2F10Bを発現する細胞に送達する方法であり、この方法は、161P2F10Bエピトープに免疫特異的に結合する抗体に細胞傷害性薬剤を結合体化させる工程、および抗体薬剤結合体に細胞を曝露する工程を包含する。別の例示的な実施形態は、転移癌を患ったと疑われる個体を処置する方法であり、この方法は、細胞傷害性薬剤および/または治療剤に結合体化された、治療有効量の抗体を含む薬学的組成物を個体に非経口的に投与する工程を包含する。

40

【0218】

50

抗161P2F10B抗体を使用する癌免疫治療は、他の型の癌の処置に首尾良く使用される種々のアプローチに従ってなされ、この癌としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：結腸癌（Arlenら、1998、Crit. Rev. Immunol. 18:133~138）、多発性骨髄腫（Ozakiら、1997、Blood 90:3179~3186；Tsunenariら、1997、Blood 90:2437~2444）、胃癌（Kasprzykら、1992、Cancer Res. 52:2771~2776）、B細胞リンパ腫（Funakoshiら、1996、J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:903~101）、白血病（Zhongら、1996、Leuk. Res. 20:581~589）、結腸直腸癌（Mounら、1994、Cancer Res. 54:6160~6166；Veldersら、1995、Cancer Res. 55:4398~4403）、および乳癌（Shepardら、1991、J. Clin. Immunol. 11:117~127）。いくつかの治療アプローチは、毒素への裸の抗体の結合（例えば、抗CD20抗体へのY⁹1またはI¹3¹の結合（例えば、ZevalinTM、IDEC Pharmaceuticals Corp.、またはBexxarTM、Coulter Pharmaceuticals）を含むが、一方他のアプローチは、抗体と他の治療薬剤との（例えば、HerceptinTM（トラスツズマブ（trastuzumab）とパクリタキセル（Genentech, Inc.）との）共投与を含む。前立腺癌の処置のために、例えば、161P2F10B抗体が、照射、化学療法またはホルモン切除と組み合わせ、投与され得る。また、抗体は、カリ-チェマイシン（例えば、Mylotarg（商標）、Wyeth-Ayerst, Madison, NJ、抗腫瘍抗生物質カリ-チェマイシンに結合体された組換えヒト化されたIgG₄抗体）のようなトキシンまたはマイタンシノイド（例えば、タキサンベース腫瘍活性プロドラッグ、TAP、platform、免疫原、ケンブリッジ、MA；また例えば米国特許第5,416,064号を参照）に対し、結合体化され得る。

【0219】

161P2F10B抗体治療は、癌の全てのステージに対して有用であるが、進行癌または転移癌において特に適切であり得る。本発明の抗体治療を用いた処置は、1つ以上の一連の化学療法を受けている患者に示される。あるいは、本発明の抗体療法は、化学療法処置を受けていない患者のために、化学療法レジメンまたは照射レジメンと組み合わせられる。さらに、抗体療法は、減少した投薬量の共化学療法の使用を、特に、その化学療法薬剤の毒性をあまり許容しない患者にとって、可能にし得る。Fanら（Cancer Res. 53:4637-4642、1993）、Prewettら（International Onco.のJ. 9:217-224、1996）、およびHancockら（Cancer Res. 51:4575-4580、1991）は、化学療法薬とともに種々の抗体の用途を述べている。

【0220】

161P2F10B抗体治療は、癌の全てのステージに対して有用であるが、進行癌または転移癌において特に適切であり得る。本発明の抗体治療を用いた処置は、1つ以上の一連の化学療法を受けている患者に示される。あるいは、本発明の抗体療法は、化学療法処置を受けていない患者のために、化学療法レジメンまたは放射線照射レジメンと組み合わせられる。さらに、抗体療法は、減少した投薬量の共化学療法の使用を、特に、その化学療法薬剤の毒性をあまり許容しない患者にとって、可能にし得る。

【0221】

癌患者は、好ましくは、腫瘍組織の免疫組織化学的評価、定量的161P2F10B画像化、または161P2F10B発現の存在および程度を確かに示し得る他の技術を使用して、161P2F10B発現の存在およびレベルについて評価され得る。腫瘍生検または外科的標本の免疫組織化学分析が、この目的に好ましい。腫瘍組織の免疫組織化学的分析のための方法は、当該分野で周知である。

【0222】

10

20

30

40

50

前立腺癌および他の癌を処置する抗161P2F10Bモノクローナル抗体としては、その腫瘍に対する強力な免疫応答を示し得る抗体、または直接細胞傷害性であり得る抗体が挙げられる。これに関して、抗161P2F10Bモノクローナル抗体(mAb)は、補体媒介性細胞傷害または抗体依存性細胞傷害(ADCC)のいずれかの機構によって、腫瘍細胞溶解を惹起し得、これらの機構の両方が、補体タンパク質上のエフェクター細胞Fcレセプター部位との相互作用のために、その免疫グロブリン分子のインタクトなFc部分を必要とする。さらに、腫瘍増殖に対して直接の生物学的効果を発揮する抗161P2F10B mAbが、161P2F10Bを発現する癌を処置するのに有用である。直接的に細胞傷害性mAbが作用する機構としては、細胞増殖の阻害、細胞分化の調節、腫瘍脈管形成因子プロフィールの調節、およびアポトーシスの誘導が、挙げられる。特定の抗161P2F10B mAbが抗腫瘍効果を発揮する機構は、当該分野で一般的に知られているように、ADCC、ADMMC、補体媒介性細胞溶解などの細胞死を評価する、任意の数のインビトロアッセイを使用して、評価される。

10

【0223】

何人かの患者において、マウスまたは他の非ヒトのモノクローナル抗体の使用、あるいはヒト/マウスキメラmAbの使用が、非ヒト抗体に対する中程度から強力な免疫応答を誘導し得る。これは、循環からの抗体のクリアランスおよび減少した効力をもたらし得る。最も深刻な場合において、このような免疫応答は、潜在的に腎不全を引き起こし得る、免疫複合体の広範な形成をもたらし得る。従って、本発明の治療法の方法において使用される好ましいモノクローナル抗体は、高い親和性で標的161P2F10B抗原に特異的に結合するが、患者において低い抗原性を示すかまたは全く抗原性を示さない、完全にヒトであるかまたはヒト化されているかのいずれかである抗体である。

20

【0224】

本発明の治療法は、単一の抗161P2F10B mAbの投与、ならびに異なるmAbの組み合わせまたはカクテルの投与を意図する。このようなmAbカクテルは、それらが、異なるエピトープを標的とするmAb含むか、異なるエフェクター機構を使用するか、または免疫エフェクター機能性に依存するmAbと直接細胞傷害性mAbを組み合わせるので、特定の利点を有し得る。組み合わせたこのようなmAbは、相乗的治療効果を示し得る。さらに、抗161P2F10B mAbは、種々の化学療法薬剤、アンドロゲン遮断薬、免疫調節因子(例えば、IL-2、GM-CSF)、手術または放射線を含むがこれらに限定されない、他の治療薬剤と同時に投与され得る。抗161P2F10B mAbは、その「裸」の形態または非結合形態で投与され得るか、またはそれらに結合した治療薬剤を有し得る。

30

【0225】

抗161P2F10B抗体処方物は、腫瘍細胞に抗体を送達し得る任意の経路を介して投与される。投与の経路としては、静脈内経路、腹腔内経路、筋肉内経路、腫瘍内経路、皮内経路などが挙げられるが、これらに限定されない。処置は一般的に、代表的に、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20または25mg/kg体重の範囲の用量で、受容可能な投与経路(例えば、静脈内注射(IV))を介する、抗161P2F10B抗体調製物の繰り返し投与を含む。一般に、1週間に10~1000mg mAbの範囲の用量が、効果的であり得かつ十分に許容され得る。

40

【0226】

転移性乳癌の処置においてHerceptin mAbを用いる臨床実験に基づいて、抗161P2F10B mAb調製物の約4mg/kg患者体重(IV)の初回負荷用量に引き続いて、約2mg/kg(IV)の毎週の用量が、受容可能な投薬レジメンを示す。好ましくは、この初回負荷用量が、90分以上の注入として投与される。その初回用量が十分に許容された場合、周期的維持用量が、30分以上の注入として投与される。当業者が理解するように、種々の因子が、特定の場における理想的な用量レジメンに影響し得る。このような因子としては、例えば、使用されるAbまたはmAbの結合親和性およ

50

び半減期、患者における161P2F10B発現の程度、循環する放出された(s h e d)161P2F10B抗原の程度、所望される安定状態の抗体濃度レベル、処置の頻度、および本発明の処置方法と組み合わせて使用される化学療法薬剤または他の因子の影響ならびに特定の患者の健康状態が、挙げられる。

【0227】

必要に応じて、患者は、最も有効な投与レジメンなどの決定を補助するために、所定のサンプル中の161P2F10Bのレベル(例えば、循環する161P2F10B抗原および/または161P2F10B発現細胞のレベル)について評価されるべきである。このような評価はまた、治療全体を通じてのモニタリングの目的で使用され、そして他のパラメーター(例えば、膀胱癌治療における尿細胞学および/またはImmunoCytle 10レベル、あるいは、類推されるところによれば、前立腺癌治療における血清PSAレベル)を評価することと組合せて治療的成功を評価するために有用である。

【0228】

抗イディオタイプ抗161P2F10B抗体はまた、抗癌療法において、161P2F10B関連タンパク質を発現する細胞に対する免疫応答を誘導するためのワクチンとして使用され得る。詳細には、抗イディオタイプ抗体の生成は、当該分野で周知であり;この方法論は、161P2F10B関連タンパク質上のエピトープを模倣する抗イディオタイプ抗161P2F10B抗体を生成するように容易に適合され得る(例えば、Wagne 20ら、1997、Hybridoma 16:33~40;Foonら、1995、J. Clin. Invest. 96:334~342;Herlynら、1996、Cancer Immunol. Immunother. 43:65~76を参照のこと)。このような抗イディオタイプ抗体は、癌ワクチンストラテジーにおいて使用され得る。

【0229】

(X.C.)細胞免疫応答についての標的としての161P2F10B)

本明細書に記載される、免疫原的に有効量の1つ以上のHLA結合ペプチドを含むワクチンおよびこのワクチンを調製する方法は、本発明のさらなる実施形態である。さらに、本発明に従うワクチンは、1つ以上の特許請求されるペプチドの組成物を含む。ペプチドは、ワクチンにおいて個々に存在し得る。あるいは、ペプチドは、同じペプチドの複数コピーを含むホモポリマーとして、または種々のペプチドのヘテロポリマーとして存在し得る。ポリマーは、増加した免疫学的反応の利点を有し、そして異なるペプチドエピトープ 30がポリマーを構成するために使用される場合、免疫応答を標的化する病原性生物または腫瘍関連ペプチドの異なる抗原決定基と反応する抗体および/またはCTLを誘導するというさらなる能力を有する。この組成物は、抗原の天然に存在する領域に存在し得るか、または例えば、組換えもしくは化学合成によって調製され得る。

【0230】

本発明のワクチンとともに使用され得るキャリアは、当業者に周知であり、そして例えば、サイログロブリン、アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン)、破傷風トキソイド、ポリアミノ酸(例えば、ポリL-リジン、ポリL-グルタミン酸)、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコアタンパク質などが挙げられる。ワクチンは、生理学的に許容可能(すなわち、受容可能)な希釈剤(例えば、水、または生理食塩水、好ましくは、リン酸緩 40化衝生理食塩水)を含み得る。ワクチンはまた、代表的に、アジュバントを含む。不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、またはミョウバンのようなアジュバントは、当該分野で周知の材料の例である。さらに、本明細書中で開示されるように、CTL応答は、本発明のペプチドを脂質(例えば、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン(P₃CSS))に結合体化することによって、初回刺激され得る。さらに、アジュバント(例えば、合成シトシン-ホスホロチオール化グアニン含有(CpG)オリゴヌクレオチド)は、CTL応答を10~100倍増加することが見出された(例えば、DavillaおよびCelis、J. Immunol. 165:539~547(2000)を参照のこと)。

【0231】

10

20

30

40

50

注射、エアロゾル、経口、経皮、経粘膜、胸内、髄腔内、または他の適切な経路による、本発明に従うペプチド組成物での免疫に際して、宿主の免疫系は、所望の抗原に特異的な、大量のCTLおよび/またはHTLを産生することによってワクチンに応答する。結果として、宿主は、161P2F10B抗原を発現するかまたは過剰発現する細胞の後期発生に少なくとも部分的に免疫されるか、あるいは抗原が腫瘍関連であった場合、少なくともいくつかの治療的利益を導く。

【0232】

いくつかの実施形態において、クラスIペプチド成分を、標的抗原に対する中和抗体および/またはヘルパーT細胞応答を誘導するかまたは促進する成分と組み合わせることが望ましくあり得る。このような組成物の好ましい実施形態は、本発明に従うクラスIエピトープおよびクラスIIエピトープを含む。このような組成物の代替の実施形態は、交叉反応性HTLエピトープ（例えば、PADRETM（Epimmune、San Diego、CA）分子（例えば、米国特許第5,736,142号に記載される））とともに、本発明に従うクラスIエピトープおよび/またはクラスIIエピトープを含む。

10

【0233】

本発明のワクチンはまた、抗原提示細胞（APC）（例えば、樹状細胞（DC））を、本発明のペプチドを提示するためのビヒクルとして含み得る。樹状細胞を動員（mobilization）し、そして収集し、これによって、樹状細胞の負荷をインビトロで生じさせた後に、ワクチン組成物が、インビトロで作製され得る。例えば、樹状細胞は、例えば、本発明に従うミニ遺伝子でトランスフェクトされるか、またはペプチドでパルスされる。次いで、樹状細胞は、インビボで免疫応答を惹起するために患者に投与され得る。ワクチン組成物（DNAベースまたはペプチドベースのいずれか）はまた、樹状細胞動員とともにインビボで投与され得、これによって、樹状細胞の負荷がインビボで生じる。

20

【0234】

好ましくは、以下の原理が、ワクチンにおける使用のためにポリエピトープ組成物中での封入のために、あるいはワクチンに含まれるべき、そして/または核酸（例えば、ミニ遺伝子）によってコードされるべき別々のエピトープを選択するためにエピトープのアレイを選択する場合に利用される。以下の原理のそれぞれが選択を行うためにバランスをとられることが好ましい。所定のワクチン組成物に組み込まれるマルチエピトープは、エピトープが由来するネイティブ抗原において連続した配列であり得る（しかし、必要ではない）。

30

【0235】

1.) 投与のとき、腫瘍クリアランスと相関して観測された免疫応答を模倣するエピトープが選択される。HLAクラスIについて、これは、少なくとも1つの腫瘍関連抗原（TAA）に由来する3~4エピトープを含む。HLAクラスIIについて、類似の原理が使用される；再び、3~4エピトープは、少なくとも1つのTAAから選択される（例えば、Rosenbergら、Science 278:1447~1450を参照のこと）。1つのTAAからのエピトープは、1つ以上のさらなるTAAからのエピトープと組み合わせ使用し、頻繁に発現されるTAAの種々の発現パターンを有する腫瘍を標的化するワクチンを産生し得る。

40

【0236】

2.) 免疫原性と関連することが確認された必須の結合親和性を有するエピトープが選択される：HLAクラスIについて、500nM以下（しばしば、200nM以下）のIC₅₀；およびクラスIIについて、1000nM以下のIC₅₀。

【0237】

3.) 十分なスーパーモチーフ保有ペプチド、または対立遺伝子特異的モチーフ保有ペプチドの十分なアレイが、広い集団範囲を与えるように選択される。例えば、少なくとも80%の集団範囲を有することが好ましい。モンテカルロ解析（当該分野で公知の統計的評価）を使用して、集団範囲の幅または重複性を評価し得る。

【0238】

50

4.) 癌関連抗原由来のエピトープが選択される場合、アナログを選択することがしばしば有用である。なぜなら、この患者は、ネイティブのエピトープに対して耐性を発生し得るからである。

【0239】

5.) 「ネスト化エピトープ (nested epitope)」と呼ばれるエピトープが、特に関連する。ネスト化エピトープは、少なくとも2つのエピトープが所定のペプチド配列で重なる場合に生じる。ネスト化ペプチド配列は、B細胞エピトープ、HLAクラスIエピトープおよび/またはHLAクラスIIエピトープを含み得る。ネスト化エピトープを提供する場合、一般的な目的は、配列当たり最も多くの数のエピトープを提供することである。従って、1つの局面は、ペプチド中のアミノ末端エピトープのアミノ末端およびカルボキシル末端エピトープのカルボキシル末端よりも長いペプチドを提供することを避けることである。マルチエピトープ配列(例えば、ネスト化エピトープを含む配列)を提供する場合、病理学的なまたは他の有害な生物学的特性を有さないことを保証するために、配列をスクリーニングすることが一般的に重要である。

10

【0240】

6.) ポリエピトープタンパク質を作製する場合、またはミニ遺伝子を作製する場合、目的のエピトープを含む最小のペプチドを作製することが、目的である。この原理は、ネスト化エピトープを含むペプチドを選択する場合に使用される原理と同じでない場合、類似する。しかし、人工ポリエピトープペプチドを用いる場合、サイズ最小化の目的は、ポリエピトープタンパク質中のエピトープ間に任意のスペーサー配列を組み込む必要性に対してバランスがとられる。例えば、スペーサーアミノ酸残基は、接合エピトープ(junctional epitope)(免疫系によって認識され、標的抗原に存在せず、かつエピトープの人工並置によってのみ作製されるエピトープ)を避けるためにか、またはエピトープ間の切断を容易にし、それによって、エピトープ提示を増強するために導入され得る。接合エピトープは、一般的に、避けられるべきである。なぜなら、レシピエントは、その非ネイティブなエピトープに対する免疫応答を生成し得るからである。「優性エピトープ」である接合エピトープが特に関心が高い。優性エピトープは、他のエピトープに対する免疫応答が減少されるかまたは抑制されるような強い(zetalous)応答を導き得る。

20

【0241】

7.) 同じ標的タンパク質の複数の改変体の配列が存在する場合、潜在的なペプチドエピトープはまた、それらの保存性に基づいて選択され得る。例えば、保存性についての基準は、HLAクラスI結合ペプチドの配列全体またはクラスII結合ペプチドの9マーのコア全体が、特定のタンパク質抗原について評価される配列の指定された割合で保存されることを規定し得る。

30

【0242】

(X.C.1.) ミニ遺伝子ワクチン)

複数のエピトープの共送達を可能にする多くの異なるアプローチが利用可能である。本発明のペプチドをコードする核酸は、本発明の特に有用な実施形態である。ミニ遺伝子中への封入のためのエピトープは、好ましくは、先の節に記載されるガイドラインに従って選択される。本発明のペプチドをコードする核酸を投与する好ましい手段は、本発明の1つのエピトープまたはマルチエピトープを含むペプチドをコードするミニ遺伝子構築物を使用する。

40

【0243】

マルチエピトープミニ遺伝子の使用は、以下およびIshiohara, J. Immunol. 162: 3915~3925, 1999; An, L. およびWhitton, J. L., J. Virol. 71: 2292, 1997; Thomson, S. A.ら、J. Immunol. 157: 822, 1996; Whitton, J. L.ら、J. Virol. 67: 348, 1993; Hanke, R.ら、Vaccine 16: 426, 1998に記載される。例えば、161P2F10B由来のスーパーモチーフ保有エピト

50

ープおよび/またはモチーフ保有エピトープをコードするマルチエピトープDNAプラスミド、PADRE（登録商標）ユニバーサルヘルパーT細胞エピトープ（または161P2F10B由来の複数のHTLエピトープ）、および小胞体トランスロケーションシグナル配列が操作され得る。ワクチンはまた、他のTAA由来のエピトープを含み得る。

【0244】

マルチエピトープミニ遺伝子の免疫原性は、試験されるエピトープに対するCTL誘導応答の大きさを評価するためにトランスジェニックマウスで確認され得る。さらに、インビボのDNAコードエピトープの免疫原性は、DNAプラスミドをトランスフェクトされた標的細胞に対する特定のCTL株のインビトロ応答と関連し得る。従って、これらの実験は、ミニ遺伝子が、1) CTL応答を生成すること、および2) 誘導されたCTLが、

10

【0245】

例えば、ヒト細胞における発現のために選択されたエピトープ（ミニ遺伝子）をコードするDNA配列を作製するために、エピトープのアミノ酸配列は、逆翻訳され得る。ヒトコドン使用頻度表は、各アミノ酸に対するコドン選択の指針のために使用され得る。これらのエピトープコードDNA配列は、直接隣接し得、その結果、翻訳された場合に、連続したポリペプチド配列が作製される。発現および/または免疫原性を最適化するために、さらなるエレメントが、ミニ遺伝子設計に組み込まれ得る。ミニ遺伝子配列に逆翻訳され得、そして含まれ得るアミノ酸配列の例としては、以下が挙げられる：HLAクラスIエピトープ、HLAクラスIIエピトープ、抗体エピトープ、ユビキチン化シグナル配列、

20

【0246】

ミニ遺伝子配列は、ミニ遺伝子のプラス鎖およびマイナス鎖をコードするオリゴヌクレオチドを組み立てることによってDNAに変換され得る。重複オリゴヌクレオチド（30～100塩基長）は、周知技術を使用して、適切な条件下で、合成され得、リン酸化され得、精製され得、そしてアニーリングされ得る。オリゴヌクレオチドの末端は、例えば、T4 DNAリガーゼを使用して結合され得る。次いで、この合成ミニ遺伝子（エピトープポリペプチドをコードする）は、所望の発現ベクターにクローン化され得る。

30

【0247】

当業者に周知の標準的な調節配列は、好ましくは、標的細胞における発現を確実にするためにベクターに含まれる。いくつかのベクターエレメントが、望ましい：ミニ遺伝子挿入のための下流クローニング部位を有するプロモーター；効率的な転写終結のためのポリアデニル化シグナル；E. coli複製起点；およびE. coli選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性またはカナマイシン耐性）。多くのプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）プロモーター）がこの目的のために使用され得る。他の適切なプロモーター配列について、例えば、米国特許第5,580,859号および同第5,589,466号を参照のこと。

40

【0248】

さらなるベクター改変は、ミニ遺伝子発現および免疫原性を最適化するために所望され得る。いくつかの場合において、イントロンは、効率的な遺伝子発現に必要とされ、そして1つ以上の合成イントロンまたは天然に存在するイントロンが、ミニ遺伝子の転写領域に組み込まれ得る。mRNA安定化配列および哺乳動物細胞における複製のための配列を含ませることもまた、ミニ遺伝子発現を増加するために考慮され得る。

【0249】

一旦、発現ベクターが選択されると、ミニ遺伝子は、プロモーターの下流のポリリンカー領域にクローン化される。このプラスミドは、適切なE. coli株に形質転換され、そしてDNAは、標準的な技術を使用して調製される。ミニ遺伝子の方向およびDNA配

50

列、ならびにベクターに含まれる全ての他のエレメントは、制限マッピングおよびDNA配列分析を使用して確認される。正しいプラスミドを有する細菌細胞は、マスター細胞バンクおよび作業細胞バンクとして保存され得る。

【0250】

さらに、免疫刺激配列 (ISSまたはCpG) は、DNAワクチンの免疫原性において役割を果たすようである。これらの配列は、免疫原性を増強することが望ましい場合に、ミニ遺伝子コード配列の外側で、ベクターに含まれ得る。

【0251】

いくつかの実施形態において、ミニ遺伝子コードエピトープおよび第2タンパク質 (免疫原性を増強または減少するために含まれる) の両方の産生を可能にするビシストロニック (bi-cistronic) 発現ベクターが使用され得る。共発現される場合に免疫応答を有利に増強し得るタンパク質またはポリペプチドの例としては、サイトカイン (例えば、IL-2、IL-12、GM-CSF)、サイトカイン誘導分子 (例えば、LeIF)、共刺激分子、または、HTL応答について、pan-DR結合タンパク質 (PADRETM、Epimmune、San Diego、CA) が挙げられる。ヘルパー (HTL) エピトープは、細胞内標的化シグナルに結合され得、そして発現されるCTLエピトープから別々に発現され得る；これは、CTLエピトープとは異なる細胞区画へのHTLエピトープの方向付けを可能にする。必要とされる場合、これは、HTLエピトープにHLAクラスII経路へのより効率的な進入を促進し得、それによって、HTL誘導を改善する。HTL誘導またはCTL誘導と対照的に、免疫抑制分子 (例えば、TGF-) の共発現によって免疫応答を特異的に減少させることは、特定の疾患において有益であり得る。

【0252】

治療量のプラスミドDNAは、例えば、E. coliにおける発酵、続く精製によって生成され得る。運用中の細胞バンクからのアリコートを使用して、増殖培地に播種し、そして周知技術に従ってシェーカーフラスコまたはバイリアクターで飽和まで増殖される。プラスミドDNAは、QIAGEN, Inc. (Valencia, California) によって供給される固相アニオン交換樹脂のような標準的な生物分離技術を使用して精製され得る。必要な場合、スーパーコイルDNAは、ゲル電気泳動または他の方法を使用して、開環状態および直鎖状態から単離され得る。

【0253】

精製プラスミドDNAは、種々の処方物を使用して注射のために調製され得る。これらのうち最も簡単なものは、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中での凍結乾燥されたDNAの再構成である。このアプローチ (「裸 (naked) のDNA」として公知である) は、臨床試験における筋肉内 (IM) 投与のために現在使用される。ミニ遺伝子DNAワクチンの免疫治療効果を最大化するために、精製プラスミドDNAを処方するための代替方法が、望ましくあり得る。種々の方法が記載され、そして新規な技術が利用可能となり得る。カチオン性脂質、糖脂質、および膜融合 (fusogenic) リポソームもまた、処方物中で使用され得る (例えば、WO93/24640; Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7): 682 (1988); 米国特許第5,279,833号; WO91/06309; およびFelgnerら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987) を参照のこと)。さらに、保護性の相互作用性非凝縮化合物 (PINC) として総称されるペプチドおよび化合物もまた、安定性、筋肉内分散性、あるいは特定の器官または細胞型への輸送のような変数に影響するように、精製プラスミドDNAに複合化され得る。

【0254】

標的細胞感作は、ミニ遺伝子コードCTLエピトープの発現およびHLAクラスII提示についての機能性アッセイとして使用され得る。例えば、プラスミドDNAは、標準的なCTLクロム放出アッセイのための標的として適切な哺乳動物細胞株に導入される。使用されるトランスフェクション方法は、最終処方物に依存する。エレクトロポレーションは

10

20

30

40

50

、「裸」のDNAのために使用され得るが、カチオン性脂質は、直接的なインビトロトランスフェクションを可能とする。緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するプラスミドは、蛍光細胞分離分析装置（FACS）を使用して、トランスフェクトされた細胞の濃縮を可能にするために共トランスフェクトされ得る。次いで、これらの細胞は、クロム - 51（⁵¹Cr）標識され、そしてエピトープ特異的CTL株に対する標的細胞として使用され；細胞溶解（⁵¹Cr放出によって検出される）は、ミニ遺伝子コード化CTLエピトープの産生およびHLA提示の両方を示す。HTLエピトープの発現は、HTL活性を評価するためのアッセイを使用して、類似の様式で評価され得る。

【0255】

インビボ免疫原性は、ミニ遺伝子DNA処方物の機能試験についての第2のアプローチである。適切なヒトHLAタンパク質を発現するトランスジェニックマウスを、DNA産物を用いて免疫する。用量および投与経路は、処方物依存である（例えば、PBS中のDNAについてIM、脂質複合化DNAについて腹腔内（i.p.））。免疫の21日後、脾細胞を収集し、そして試験される各エピトープをコードするペプチドの存在下で1週間、再刺激する。その後、CTLエフェクター細胞について、標準的技術を使用して、ペプチド負荷⁵¹Cr標識標的細胞の細胞溶解についてのアッセイを行う。ミニ遺伝子コードエピトープに対応するペプチドエピトープを負荷されたHLAによって感作された標的細胞の溶解は、CTLのインビボ導入についてのDNAワクチン機能を実証する。HTLエピトープの免疫原性は、類似の方法で、トランスジェニックマウスにおいて確認される。

【0256】

あるいは、核酸は、例えば、米国特許第5,204,253号に記載されるように、弾道的（ballistic）送達を使用して投与され得る。この技術を使用して、DNAのみから構成される粒子が投与される。さらなる代替の実施形態において、DNAは、粒子（例えば、金粒子）に接着され得る。

【0257】

ミニ遺伝子はまた、当該分野で周知の他の細菌送達系またはウイルス送達系を使用して送達され得る（例えば、本発明のエピトープをコードする発現構築物が、ワクシニアのようなウイルスベクターに組み込まれ得る）。

【0258】

（X.C.2.）CTLペプチドとヘルパーペプチドとの組合せ）

本発明のCTLペプチドを含むワクチン組成物は、所望の性状（例えば、改善された血清半減期、広げられた集団適用範囲、または増強された免疫原性）を提供するために改変（例えば、アナログ化）され得る。

【0259】

例えば、ペプチドがCTL活性を誘導する能力は、ペプチドを、Tヘルパー細胞応答を誘導し得る少なくとも1つのエピトープを含む配列に連結することによって増強され得る。CTLペプチドは直接Tヘルパーペプチドに連結され得るが、しばしば、CTLエピトープ/HTLエピトープ結合体は、このスペーサー分子によって連結される。このスペーサーは、代表的に、比較的小さな中性の分子（例えば、アミノ酸またはアミノ酸模倣物）（これは、生理学的条件下において、実質的に荷電されていない）から構成される。このスペーサーは、代表的に、例えば、Ala、Gly、あるいは非極性アミノ酸または中性極性アミノ酸の他の中性スペーサーから選択される。任意に存在するスペーサーが同じ残基から構成される必要はなく、従って、ヘテロオリゴマーまたはホモオリゴマーであり得ることが理解される。存在する場合、スペーサーは、通常、少なくとも1つまたは2つの残基、より通常には、3～6個の残基、ときどき、10以上の残基である。CTLペプチドエピトープは、CTLペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにおいて、直接的またはスペーサーを介してのいずれかで、Tヘルパーペプチドに連結され得る。免疫原性ペプチドまたはTヘルパーペプチドのいずれかのアミノ末端は、アシル化され得る。

【0260】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、Tヘルパーペプチドは、遺伝的に多様な集団の大部分に存在するTヘルパー細胞によって認識されるペプチドである。これは、多くの、ほとんどの、または全てのHLAクラスII分子に結合するペプチドを選択することによって達成され得る。多くのHLAクラスII分子に結合するこのようなアミノ酸の例は、破傷風トキソイドの830~843位QYIKANSKFIGITE(配列番号25)、Plasmodium falciparumサーカムスポロゾイト(circumsporozoite)(CS)タンパク質の378~398位DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS(配列番号26)、およびStreptococcus 18kDタンパク質の116~131位GAVDSILGGVATYGA(配列番号27)のような抗原由来の配列を含む。他の例としては、DR1-4-7スーパーモチーフ、またはDR3モチーフのいずれかを有するペプチドを含む。

10

【0261】

あるいは、天然に見出されないアミノ酸配列を使用して、緩いHLA拘束様式(loosely HLA-restricted fashion)で、Tヘルパーリンパ球を刺激し得る合成ペプチドを調製することが可能である(例えば、PCT公開WO95/07707を参照のこと)。Pan-DR結合エピトープ(例えば、PADRETM、Epimmune, Inc., San Diego, CA)と呼ばれるこれらの合成化合物は、大部分のHLA-DR(ヒトHLAクラスII)分子に最も好ましく結合するように設計される。例えば、式:aKXVAAWTLKAA(配列番号28)(ここで、「X」は、シクロヘキシルアラニン、フェニルアラニン、またはチロシンのいずれかであり、そしてaは、D-アラニンまたはL-アラニンのいずれかである)を有するpan-DR結合エピトープペプチドは、大部分のHLA-DR対立遺伝子に結合し、そしてそれらのHLA型に関わりなく、大部分の個体由来のTヘルパーリンパ球の応答を刺激することが見出された。pan-DR結合エピトープの代替物は、全て「L」天然アミノ酸を含み、そしてエピトープをコードする核酸の形態で提供され得る。

20

【0262】

HTLペプチドエピトープはまた、それらの生物学的特性を変更するために改変され得る。例えば、これらは、プロテアーゼに対するそれらの耐性を増加し、従って、それらの血清半減期を拡大するためにD-アミノ酸を含むように改変され得るか、あるいはこれらは、それらの生物学的活性を増加させるために、脂質、タンパク質、炭水化物などのような他の分子に結合され得る。例えば、Tヘルパーペプチドは、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、1つ以上のパルミチン酸に結合体化され得る。

30

【0263】

(X.C.3.)CTLペプチドとT細胞プライミング剤との組合せ)

いくつかの実施形態において、本発明の薬学的組成物中に、Bリンパ球またはTリンパ球をプライミングする少なくとも1つの成分を含むことが望ましくあり得る。脂質は、CTLをインビボでプライミングし得る薬剤として同定されている。例えば、パルミチン酸残基は、リジン残基の - アミノ基および - アミノ基に結合され得、次いで、例えば、Gly、Gly-Gly、Ser、Ser-Serなどのような1つ以上の連結残基を介して免疫原性ペプチドに連結され得る。次いで、脂質化ペプチドは、ミセルまたは粒子で直接的に投与され得るか、リボソームに組み込まれ得るか、またはアジュバント(例えば、不完全フロイントアジュバント)中で乳化され得るかのいずれかで投与され得る。好ましい実施形態において、特に有効な免疫原性組成物は、Lysの - アミノ基および - アミノ基に結合されたパルミチン酸(これは、免疫原性ペプチドのアミノ末端に連結(例えば、Ser-Ser)を介して結合される)を含む。

40

【0264】

CTL応答の脂質プライミングの別の例として、E.coliリポタンパク質(例えば、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン(P₃CSS))は、適切なペプチドに共有結合される場合、ウイルス特異的CTLをプライミングするために使用され得る(例えば、Deresら、Nature 342:561, 1989を参照

50

のこと)。本発明のペプチドは、例えば、P₃CS₃に結合され得、そしてこのリポペプチドは、標的抗原に免疫応答を特異的にプライミングするために個体に投与され得る。さらに、中和抗体の導入がまたP₃CS₃結合エピトープを用いてプライミングされ得るので、2つのこのような組成物は、体液性応答および細胞媒介応答の両方をより効率的に惹起するように組み合わせられ得る。

【0265】

(X.C.4.)CTLペプチドおよび/またはHTLペプチドでパルスされたDCを含むワクチン組成物)

本発明に従うワクチン組成物の実施形態は、患者血液由来のPBMC、またはそれら由来の単離されたDCに対する、エピトープ保有ペプチドのカクテルのエキソビボ投与を含む。DCの収集を容易にする薬物(例えば、ProgenipoinetinTM(Pharmacia-Monsanto, St. Louis, MO)またはGM-CSF/IL-4)が使用され得る。DCをペプチドでパルスした後、そして患者に再注入する前に、未結合ペプチドを除去するためにDCを洗浄する。この実施形態において、ワクチンは、それらの表面に、HLA分子を複合体化した、パルスされたペプチドエピトープを提示するペプチドパルス化DCを含む。

10

【0266】

DCは、ペプチドのカクテルを用いてエキソビボでパルスされ得、これらのうちのいくつかは、161P2F10Bに対するCTL応答を刺激する。必要に応じて、ヘルパーT細胞(HTL)ペプチド(例えば、天然または人工の緩い拘束性HLAクラスIIペプチド)は、CTL応答を促進するために含められ得る。従って、本発明に従うワクチンは、161P2F10Bを発現するかまたは過剰発現する癌を処置するために使用される。

20

【0267】

(X.D.)養子免疫療法)

抗原性161P2F10B関連ペプチドは、エキソビボでCTL応答および/またはHTL応答もまた惹起するために使用される。得られるCTL細胞またはHTL細胞は、他の従来の形式の治療に応答しないか、または本発明に従う治療ワクチンペプチドまたは核酸に応答しない患者の腫瘍を処置するために使用され得る。特定の抗原に対するエキソビボCTL応答またはHTL応答は、組織培養物中において、患者のまたは遺伝的に適合性のCTL前駆細胞またはHTL前駆細胞を、抗原提示細胞(APC)(例えば、樹状細胞)の供給源および適切な免疫原性ペプチドとともにインキュベートすることによって誘導される。適切なインキュベーション時間(代表的には、約7~28日)(ここで、前駆細胞が、活性化され、そして効果細胞に増殖する)後に、細胞は、患者に注入して戻され、ここで、これらは、特定の標的細胞(例えば、腫瘍細胞)を破壊する(CTL)か、または破壊を促進する(HTL)。トランスフェクトされた樹状細胞はまた、抗原提示細胞として使用され得る。

30

【0268】

(X.E.)治療目的または予防目的のためのワクチンの投与)

本発明の薬学的組成物およびワクチン組成物は、代表的に、161P2F10Bを発現するかまたは過剰発現する癌を処置および/または予防するために使用される。治療適用において、ペプチド組成物および/または核酸組成物は、抗原に対して有効なB細胞応答、CTL応答および/またはHTL応答を誘発し、そして症状および/または合併症を治癒するかあるいは少なくとも部分的に停止または遅延させるのに十分な量で患者に投与される。これを達成するのに適切な量は、「治療的有效用量」として規定される。この使用のための有効量は、例えば、投与される特定の組成物、投与方法、処置される疾患の病期および重篤度、患者の体重および全身状態、ならびに処方する医師の判断に依存する。

40

【0269】

薬学的組成物について、本発明の免疫原性ペプチド、またはそれらをコードするDNAは、一般的に、161P2F10Bを発現する腫瘍をすでに有する個体に投与される。ペプチドまたはそれらをコードするDNAは、個々に、または1つ以上のペプチド配列の融

50

合物として投与され得る。患者は、適切なように、別々にまたは他の処置（例えば、外科手術）とともに、免疫原性ペプチドを用いて処置され得る。

【0270】

治療的使用のために、投与は、一般的に、161P2F10B関連癌の第1の診断において開始すべきである。これは、少なくとも症状が実質的に停止するまで、そしてその後の一定期間の間、用量を追加免疫することによって続けられる。患者に送達されるワクチン組成物の実施形態（すなわち、ペプチドカクテル、ポリエピトープポリペプチド、ミニ遺伝子、またはTAA特異的CTLまたはパルスされた樹状細胞のような実施形態を含むが、これらに限定されない）は、疾患の病期または患者の健康状態に従って、変化し得る。例えば、161P2F10Bを発現する腫瘍を有する患者において、161P2F10B特異的CTLを含むワクチンは、代替の実施形態よりも進行した疾患を有する患者において腫瘍細胞を殺す際に、より有効であり得る。

10

【0271】

細胞傷害性T細胞応答を効率的に刺激するのに十分な投与の様式によって送達されるペプチドエピトープの量を提供することが一般的に重要である；ヘルパーT細胞応答を刺激する組成物はまた、本発明のこの実施形態に従って、与えられ得る。

【0272】

最初の治療的免疫化のための投薬量は、一般的に、下限値が約1 μ g、5 μ g、50 μ g、500 μ g、または1,000 μ gであり、かつ上限値が約10,000 μ g；20,000 μ g；30,000 μ g；または50,000 μ gである単位用量範囲で存在する。ヒトのための投薬量値は、代表的に、70kgの患者当たり、約500 μ g～約50,000 μ gの範囲である。数週間～数ヶ月にわたるブーストレジメンに従って、約1.0 μ g～約50,000 μ gの間のブースト投薬量のペプチドが、患者の血液から得られたCTLおよびHTLの比活性を測定することによって決定されるような患者の応答および状態に依存して投与され得る。投与は、少なくとも臨床的症状または実験室の試験によって、新生物形成が、排除されるかまたは減少することを示すまで、そしてその後、一定期間続けられるべきである。投薬量、投与の経路、および用量スケジュールは、当該分野に公知の方法論に従って調整される。

20

【0273】

特定の実施形態において、本発明のペプチドおよび組成物は、重篤な疾患状態（すなわち、生命を脅かすかまたは潜在的に生命を脅かす状態）で使用される。このような場合、本発明の好ましい組成物では、外来性物質が最小量でありそしてペプチドが比較的非毒性の性質であることの結果として、これらの記載された投薬量と比較してかなり過剰のこれらのペプチド組成物を投与することが可能であり、そして処置する医師によって望ましく感じられ得る。

30

【0274】

本発明のワクチン組成物はまた、純粋に予防薬剤として使用され得る。一般的に、初回の予防免疫のための投薬量は一般に、低い値が約1、5、50、500または1000 μ gでありかつ高い値が約10,000；20,000；30,000；または50,000 μ gである単位投薬量範囲で存在する。ヒトのための投薬量の値は、代表的に、70kgの患者あたりで約500 μ g～約50,000 μ gの範囲である。これに続いて、初回のワクチン投与から約4週間後～6ヵ月後の規定された間隔で、約1.0 μ g～約50,000 μ gの間のペプチドのブースト投薬量が投与される。ワクチンの免疫原性は、患者の血液サンプルから得られるCTLおよびHTLの比活性を測定することによって評価され得る。

40

【0275】

治療的処置のための薬学的組成物は、非経口投与、局所的（topical）投与、経口投与、経鼻投与、クモ膜下腔内（intrathecal）投与、または局部的（local）投与（例えば、クリームまたは局所的軟膏として）のために意図される。好ましくは、この薬学的組成物は、非経口的（例えば、静脈内、皮下的、皮内、または筋内）に

50

投与される。従って、本発明は、受容可能なキャリア（好ましくは、水性キャリア）中に溶解または懸濁された免疫原性ペプチドの溶液を含む、非経口投与のための組成物を提供する。

【0276】

種々の水性キャリア（例えば、水、緩衝化水、0.8%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸など）が使用され得る。これらの組成物は、従来からの周知の滅菌技術によって滅菌され得るか、または濾過滅菌され得る。得られた水溶液は、使用のためにその状態のままパッケージされ得るか、または凍結乾燥され得る（この凍結乾燥された調製物は、投与前に滅菌溶液と合わせられる）。

【0277】

この組成物は、必要に応じて、生理的条件に近づくために、薬学的に受容可能な補助物質（例えば、pH調整剤および緩衝化剤、張度調整剤、湿潤剤、防腐薬など（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸ソルピタン、オレイン酸トリエタノールアミンなど））を含み得る。

【0278】

薬学的処方物における本発明のペプチドの濃度は、広範に（すなわち、重量で、約0.1%未満から、通常は、約2%であるかもしくは少なくとも約2%から、20%~50%ほど多くまで、またはそれより多くまで）変動し得、そして選択された特定の投与様式に従って、主に流体容量、粘度などにより選択される。

【0279】

組成物のヒト単位用量形態は、代表的に、ヒト単位用量の受容可能なキャリア（1つの実施形態では、水性キャリア）を含む薬学的組成物中に含まれ、そしてヒトへのこのような組成物の投与のために使用されることが当業者に公知（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, 編者A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985を参照のこと）の容量/量で投与される。例えば、初回免疫のためのペプチド用量は、70kgの患者について、約1~約50,000 μ g、一般的には、100~5,000 μ gであり得る。例えば、核酸については、初回免疫は、裸の核酸の形態で発現ベクターを使用して実施され得、複数の部位に0.5~5mgの量でIM（またはSCもしくはID）投与され得る。核酸（0.1~1000 μ g）もまた、遺伝子銃を使用して投与され得る。3~4週間のインキュベーション期間後に、次いで、ブースター用量が投与される。ブースターは、 5×10^7 ~ 5×10^9 pfuの用量で投与される組換え鶏痘ウイルスであり得る。

【0280】

抗体について、処置は一般に、静脈内注射（IV）のような受容可能な投与経路を介して、代表的には約0.1~約10mg/kg体重の範囲の用量で、抗161P2F10B抗体調製物を反復投与することを包含する。一般的には、1週間あたり10~500mg mAbの範囲の用量が有効であり、かつ十分に許容される。さらに、抗161P2F10B mAb調製物を、IVで約4mg/kg患者体重の初回負荷用量で与え、次いで毎週、IVで約2mg/kgの用量を与えることは、受容可能な投薬レジメンを表す。当業者に理解されるように、種々の要因が、特定の場における理想的な用量に影響を及ぼし得る。このような要因としては、例えば、組成物の半減期、Abの結合親和性、物質の免疫原性、患者における161P2F10Bの発現程度、循環しているシェッド（shed）161P2F10B抗原の程度、所望される定常状態の濃度レベル、処置の頻度、および本発明の処置方法と組み合わせて使用される化学療法剤または他の薬剤の影響、ならびに特定の患者の健康状態が挙げられる。限られない好まれるヒト単位の用量は、例えば、500 μ l~1mg、1mg~50mg、50mg~100mg、100mg~200mg、200mg~300mg、400mg~500mg、500mg~600mg、600~700mg、700mg~800mg、800mg~900mg、900mg~1g、または1mg~700mgである。特定の実施形態においては、用量は、以下の範囲で

10

20

30

40

50

ある、 $2 \sim 5 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重（例えば、毎週 $1 \sim 3 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量）； 0.5 mg 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重（例えば、毎週の用量で 2 、 3 または 4 週間； $0.5 \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重（例えば、毎週の用量で 2 、 3 または 4 週間；毎週の体範囲の 225 、 250 、 275 、 300 、 325 、 350 、 375 、 $400 \text{ mg} / \text{m}^2$ ；毎週の体範囲の $1 \sim 600 \text{ mg} / \text{m}^2$ ；毎週の体範囲の $225 \sim 400 \text{ mg} / \text{m}^2$ ；これらは、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 19 、 11 、 12 またはそれ以上の週の間、毎週の用量によって従われ得る。

【0281】

1つの実施形態では、ポリヌクレオチドのヒト単位投薬形態は、任意の治療的効果を与える適切な投薬量範囲または有効量を含む。当業者に理解されるように、治療的効果は、ポリヌクレオチドの配列、ポリヌクレオチドの分子量、および投与経路を含む多数の要因に依存する。投薬量は一般的に、症状の重篤度、患者の病歴などのような、当該分野で公知の種々のパラメーターに従って、医師または他の医療専門家により選択される。一般的には、約 20 塩基のポリヌクレオチドについて、投薬量範囲は、例えば、約 0.1 、 0.25 、 0.5 、 1 、 2 、 5 、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 200 、 300 、 400 または $500 \text{ mg} / \text{kg}$ のような独立して選択される下限から、その下限よりも大きな約 60 、 80 、 100 、 200 、 300 、 400 、 500 、 750 、 1000 、 1500 、 2000 、 3000 、 4000 、 5000 、 6000 、 7000 、 8000 、 9000 または $10,000 \text{ mg} / \text{kg}$ の独立して選択される上限までの中から選択され得る。例えば、用量は、以下のほぼいずれかであり得る： $0.1 \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $0.1 \sim 50 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $0.1 \sim 25 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $0.1 \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $1 \sim 500 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $100 \sim 400 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $200 \sim 300 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $1 \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $100 \sim 200 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $300 \sim 400 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $400 \sim 500 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $500 \sim 1000 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $500 \sim 5000 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または $500 \sim 10,000 \text{ mg} / \text{kg}$ 。一般的に、非経口的な投与経路は、疾患組織に対するより直接的なポリヌクレオチドの適用（増加する長さのポリヌクレオチドで行う場合）と比較して、より多い用量のポリヌクレオチドを必要とし得る。

【0282】

1つの実施形態では、T細胞のヒト単位投薬形態は、任意の治療的効果を与える適切な投薬量範囲または有効量を含む。当業者に理解されるように、治療的効果は、多数の要因に依存する。投薬量は一般的に、症状の重篤度、患者の病歴などのような、当該分野で公知の種々のパラメーターに従って、医師または他の医療専門家により選択される。用量は、約 10^4 細胞～約 10^6 細胞、約 10^6 細胞～約 10^8 細胞、約 10^8 細胞～約 10^{11} 細胞、または約 10^8 細胞～約 5×10^{10} 細胞であり得る。用量はまた、約 10^6 細胞/ m^2 ～約 10^{10} 細胞/ m^2 、または約 10^6 細胞/ m^2 ～約 10^8 細胞/ m^2 であり得る。

【0283】

本発明のタンパク質（1つまたは複数）および/またはそのタンパク質（1つまたは複数）をコードする核酸はまた、リポソームを介して投与され得、それらはまた以下のために役立つ： 1 ）リンパ系組織のような特定組織へのタンパク質（1つまたは複数）の標的化； 2 ）疾患細胞に対する選択的な標的化；または、 3 ）ペプチド組成物の半減期の増加。リポソームとしては、エマルジョン、泡沫体（foam）、ミセル、不溶性単層、液晶、リン脂質分散体、層状層などが挙げられる。これらの調製物において、送達されるペプチドは、単独かあるいはリンパ系細胞に蔓延しているレセプターに結合する分子（例えば、CD45抗原に結合するモノクローナル抗体）と組み合わせてかまたは他の治療用組成物もしくは免疫原性組成物と組み合わせて、リポソームの部分として組み込まれる。従って、本発明の所望のペプチドを充填しているかまたは施されているかのいずれかのリポソームは、リンパ系細胞の部位に指向され得、次いで、このリンパ系細胞に、リポソームはペプチド組成物を送達する。本発明に従って使用するためのリポソームは、標準的な小胞形成脂質から形成され、これは一般的に、中性リン脂質および負に荷電したリン脂

質、ならびにステロール（例えば、コレステロール）を含む。脂質の選択は一般的に、例えば、リポソームのサイズ、酸不安定性、および血流中でのリポソームの安定性の考慮により導かれる。リポソームを調製するためには、例えば、Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980) ならびに米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、および同第5,019,369号に記載されているように、種々の方法が利用可能である。

【0284】

免疫系の細胞を標的化するために、リポソームに取り込まれるべきリガンドとしては、例えば、所望される免疫系細胞の細胞表面決定基に特異的な抗体またはそのフラグメントが挙げられ得る。ペプチドを含むリポソーム懸濁物は、静脈内、局部的、局所的などによって、とりわけ投与様式、送達されるペプチド、および処置される疾患の病期に従って変動する用量において投与され得る。

10

【0285】

固形組成物については、従来非毒性の固形キャリアが使用され得、これには、例えば、製薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサクカリン、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。経口投与のために、薬学的に受容可能な非毒性の組成物は、任意の通常使用される賦形剤（例えば、先に列挙されたキャリアなど）と、一般的に10~95%の活性成分（すなわち、本発明の1つ以上のペプチド）そしてより好ましくは、25%~75%の濃度の活性成分とを組み込むことによって形成される。

20

【0286】

エアロゾル投与のために、免疫原性ペプチドは好ましくは、界面活性剤および噴霧剤と共に細かく分割された形態で供給される。ペプチドの代表的なパーセンテージは、約0.01重量%~20重量%、好ましくは、約1%~10%である。当然ながら、界面活性剤は非毒性でなければならず、そして好ましくは、噴霧剤に可溶性でなければならない。このような薬剤の代表例は、脂肪族多価アルコールまたはその環状無水物を有する、約6~22個の炭素原子を含む脂肪酸（例えば、カプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリック酸（olesteric acid）、およびオレイン酸）のエステルおよび部分エステルである。混合エステル（例えば、混合グリセリドまたは天然のグリセリド）が使用され得る。界面活性剤は、その組成物の約0.1重量%~20重量%、好ましくは、約0.25~5%を構成し得る。組成物の残りは通常、噴霧剤である。キャリアもまた、例えば、鼻腔内送達のためのレシチンの場合のように、所望の場合に含まれ得る。

30

【0287】

(XI.) 161P2F10Bの診断的实施形態および予後的実施形態)

本明細書中で開示されるように、161P2F10Bポリヌクレオチド、161P2F10Bポリペプチド、161P2F10B反応性の細胞傷害性T細胞(CTL)、161P2F10B反応性のヘルパーT細胞(HTL)および抗ポリペプチド抗体は、癌のような調節不全性の細胞増殖と関連した状態、特に、表Iに列挙された癌（例えば、その組織発現の特異的パターン、ならびに、例えば、「正常組織、および患者検体における161P2F10Bの発現分析」と表題を付けられた実施例に記載されているような特定の癌におけるその過剰発現の両方を参照のこと）を試験する周知の診断的アッセイ、予後的アッセイ、および治療的アッセイにおいて使用される。

40

【0288】

161P2F10Bは、前立腺関連抗原であるPSAに類似し得る。PSAは、前立腺癌の存在を同定およびモニターするために数年間にわたり医療従事者により使用されてきた原型マーカーである（例えば、Merri11ら、J. Urol. 163(2): 503-5120(2000); Polascikら、J. Urol. Aug; 162(2): 293-306(1999)およびFortierら、J. Nat. Cancer Inst. 91(19): 1635-1640(1999)を参照のこと）。種々の他の診

50

断マーカ―もまた、同様の状況下で使用され、これらには p 5 3 および K - r a s が挙げられる（例えば、T u l c h i n s k y ら , I n t J M o l M e d 1 9 9 9 J u l 4 (1) : 9 9 - 1 0 2 および M i n i m o t o ら , C a n c e r D e t e c t P r e v 2 0 0 0 ; 2 4 (1) : 1 - 1 2 を参照のこと）。従って、1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチドおよび 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチド（ならびに、これらの分子の存在を同定するために使用される 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチドプローブおよび抗 1 6 1 P 2 F 1 0 B 抗体）ならびにそれらの特性に関する本開示により、当業者は、使用された方法と類似した方法において（例えば、癌に関連した状態を試験することに関する種々の診断アッセイにおいて）これらの分子を利用することが可能となる。

【 0 2 8 9 】

1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチド、1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチド、1 6 1 P 2 F 1 0 B と反応性の T 細胞および抗体を利用する診断方法の代表的な実施形態は、例えば、P S A ポリヌクレオチド、P S A ポリペプチドならびに P S A と反応性の T 細胞および抗体を使用する十分に確立された診断アッセイ由来の方法と類似する。例えば、P S A の過剰発現または前立腺癌の転移をモニターする方法において、P S A m R N A の存在および / またはレベルを観察するために、まさしく P S A ポリヌクレオチドを、プローブ（例えば、ノーザン分析において（例えば、S h a r i e f ら、B i o c h e m . M o l . B i o l . I n t . 3 3 (3) : 5 6 7 ~ 7 4 (1 9 9 4) を参照のこと））およびプライマー（例えば、P C R 分析において（例えば、O k e g a w a ら、J . U r o l . 1 6 3 (4) : 1 1 8 9 ~ 1 1 9 0 (2 0 0 0) を参照のこと））として使用するよう、本明細書中に記載される 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチドは、1 6 1 P 2 F 1 0 B の過剰発現またはこの遺伝子を発現する前立腺癌および他の癌の転移を検出するために、同じ様式で利用され得る。あるいは、まさしく P S A ポリペプチドを使用して P S A に特異的な抗体を生成し、次いで、この抗体を、P S A タンパク質の過剰発現（例えば、S t e p h a n ら、U r o l o g y 5 5 (4) : 5 6 0 ~ 3 (2 0 0 0) を参照のこと）または前立腺細胞の転移（例えば、A l a n e n ら、P a t h o l . R e s . P r a c t . 1 9 2 (3) : 2 3 3 ~ 7 (1 9 9 6) を参照のこと）をモニターする方法において P S A タンパク質の存在および / またはレベルを観察するために使用し得るよう、本明細書中に記載される 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチドは、1 6 1 P 2 F 1 0 B の過剰発現またはこの遺伝子を発現する前立腺細胞および他の癌細胞の転移の検出するために使用するための抗体を生成するために使用され得る。

【 0 2 9 0 】

詳細には、転移は、元々の器官（例えば、肺または前立腺など）から身体の異なる領域（例えば、リンパ節）への癌細胞の移動を包含するので、1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチドおよび / または 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチドを発現する細胞の存在について生物学的サンプルを試験するアッセイが、転移の証拠を提供するために使用され得る。例えば、1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現細胞を通常含まない組織（リンパ節）由来の生物学的サンプルが、L A P C 4 および L A P C 9（それぞれ、リンパ節および骨の転移から単離された異種移植片）に見られる 1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現のような、1 6 1 P 2 F 1 0 B 発現細胞を含むことが見出される場合、この発見は転移を示す。

【 0 2 9 1 】

あるいは、1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリヌクレオチドおよび / または 1 6 1 P 2 F 1 0 B ポリペプチドは、例えば、通常 1 6 1 P 2 F 1 0 B を発現しないかまたは異なるレベルで 1 6 1 P 2 F 1 0 B を発現する生物学的サンプル中の細胞が、1 6 1 P 2 F 1 0 B を発現するかまたは 1 6 1 P 2 F 1 0 B の増加した発現を有することが見出された場合（例えば、表 I に列挙された癌および添付の図面に示される患者サンプルなどにおける 1 6 1 P 2 F 1 0 B の発現を参照のこと）に、癌の証拠を提供するために使用され得る。このようなアッセイにおいて、当業者は、（1 6 1 P 2 F 1 0 B に加えて）第二の組織制限マーカ―（例えば、P S A、P S C A など）の存在について生物学的サンプルを試験することによって、転移に関する補足的な証拠を生み出すことをさらに所望し得る（例えば、A l a n e

10

20

30

40

50

nら、Pathol. Res. Pract. 192(3):233-237(1996)を参照のこと)。

【0292】

まさしくPSAポリヌクレオチドフラグメントおよびPSAポリヌクレオチド改変体が、PSAをモニターする方法における使用のために当業者によって利用されるように、161P2F10Bポリヌクレオチドフラグメントおよび161P2F10Bポリヌクレチド改変体は、類似の様式で使用される。特に、PSAをモニターする方法において使用される代表的なPSAポリヌクレオチドは、PSA cDNA配列のフラグメントから構成されるプローブまたはプライマーである。これを例にとると、PSAポリヌクレオチドをPCR増幅するために使用されるプライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応において機能するように、PSA配列全体よりも短い配列を含まなくてはならない。このようなPCR反応の状況において、当業者は一般に、目的のポリヌクレオチドの異なる部分を増幅するためにかまたは増幅反応を最適化するためにプライマーとして使用され得る、種々の異なるポリヌクレオチドフラグメントを作製する(例えば、Caetano-Anolles, G. Biotechniques 25(3):472-476, 478-480(1998); Robertsonら, Methods Mol. Biol. 98:121-154(1998)を参照のこと)。このようなフラグメントの使用のさらなる例示が、「正常組織、および患者被験体における161P2F10Bの発現分析」と表題を付けられた実施例に提供され、ここで、161P2F10Bポリヌクレオチドフラグメントは、癌細胞における161P2F10B RNAの発現を示すためのプローブとして使用される。さらに、改変体ポリヌクレオチド配列は、代表的に、PCR分析およびノーザン分析において、対応するmRNAについてのプライマーおよびプローブとして使用される(例えば、Sawaira, Fetal Diagn. Ther. 1996 Nov-Dec;11(6):407-13およびCurrent Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 2, Frederick M. Ausubelら編, 1995を参照のこと)。ポリヌクレオチドフラグメントおよび改変体は、それらが、高ストリンジエンシー条件下で、標的ポリヌクレオチド配列(例えば、図2に示される161P2F10Bポリヌクレオチドまたはその改変体)に結合し得る状況下において有用である。

【0293】

さらに、抗体によって認識され得るエピトープを含むPSAポリペプチドまたはそのエピトープに特異的に結合するT細胞が、PSAをモニターする方法において使用される。161P2F10Bポリペプチドフラグメント、および161P2F10Bポリペプチドアナログまたは改変体もまた、類似の様式で使用され得る。ポリペプチドフラグメントまたはポリペプチド改変体を使用して抗体(例えば、抗PSA抗体またはT細胞)を生成するこの実施は、開業医によって使用されている融合タンパク質のような広範な種々の系と共に当該分野の技術において代表的である(例えば、Current Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubelら編, 1995を参照のこと)。この状況において、各エピトープ(単数または複数)は、抗体またはT細胞と反応性である構造体を提供するように機能する。代表的に、当業者は、目的のポリペプチドの異なる部分に特異的な免疫応答を生成するために使用され得る種々の異なるポリペプチドフラグメントを生成する(例えば、米国特許第5,840,501号および米国特許第5,939,533号を参照のこと)。例えば、本明細書中に考察される161P2F10Bの生物学的モチーフまたは当該分野で利用可能なモチーフに基づいて当業者により容易に同定されるモチーフ保有部分配列の1つを含むポリペプチドを利用することが好適であり得る。ポリペプチドのフラグメント、改変体またはアナログは代表的に、これらが標的ポリペプチド配列(例えば、図3に示される161P2F10Bポリペプチド)に特異的な抗体またはT細胞を生成し得るエピトープを含む限りにおいて、この状況で有用である。

【0294】

10

20

30

40

50

本明細書中に示されるように、161P2F10Bポリヌクレオチドおよび161P2F10Bポリペプチド(ならびに、これらの分子の存在を同定するために使用される161P2F10Bポリヌクレオチドプローブおよび抗161P2F10B抗体またはT細胞)は、表Iに列挙された癌のような癌を診断することにおいてそれらを有用なものとする特異的特性を示す。前立腺癌のような、本明細書中に記載の疾患状態の存在または発症を評価するために、161P2F10B遺伝子産物の存在を測定する診断アッセイは、PSAを用いて非常に首尾よく行われているように、予防的な測定またはさらなるモニタリングのための患者を同定するために使用される。さらに、これらの物質は、例えば、前立腺起源の転移の明確な診断がPSAのみについての試験に基づいてなされ得ず(例えば、Alanenら、Pathol. Res. Pract. 192(3):233-237(1996)を参照のこと)、そしてその結果、161P2F10Bポリヌクレオチドおよび161P2F10Bポリペプチド(ならびに、これらの分子の存在を同定するために使用される161P2F10Bポリヌクレオチドプローブおよび抗161P2F10B抗体)のような物質が、前立腺起源の転移を確認するために使用されることが必要である状況において、PSAに対して類似した特徴または補足的な特徴を有する分子についての当該分野での必要性を満たす。

10

【0295】

最後に、診断アッセイにおけるそれらの使用に加えて、本明細書中に開示される161P2F10Bポリヌクレオチドは、161P2F10B遺伝子がマッピングされる染色体領域(「161P2F10Bの染色体マッピング」と表題を付けられた以下の実施例を参照のこと)におけるオンコジーン関連染色体異常の同定におけるそれらの使用のような、多くの他の用途を有する。さらに、診断アッセイにおけるそれらの使用に加えて、本明細書中に開示される161P2F10B関連タンパク質および161P2F10B関連ポリヌクレオチドは、起源未知の組織の法医学的分析におけるそれらの使用のような他の有用性を有する(例えば、Takahama K Forensic Sci Int 1996 Jun 28;80(1-2):63-9を参照のこと)。

20

【0296】

さらに、本発明の161P2F10B関連タンパク質または161P2F10B関連ポリヌクレオチドを使用して、161P2F10Bの過剰発現により特徴付けられる病理学的状態を処置し得る。例えば、図2もしくは図3のアミノ酸配列もしくは核酸配列、またはいずれかのフラグメントを使用して、161P2F10B抗原に対する免疫応答を生成し得る。161P2F10Bと反応性の抗体または他の分子を使用して、この分子の機能を調節し得、それにより治療的利益を提供し得る。

30

【0297】

(XII.) 161P2F10Bタンパク質機能の阻害)

本発明は、161P2F10Bのその結合パートナーへの結合を阻害するためまたは他のタンパク質(単数または複数)とのその結合を阻害するための種々の方法および組成物、ならびに、161P2F10Bの機能を阻害するための方法を含む。

【0298】

(XII.A.) 細胞内抗体を用いた161P2F10Bの阻害)

1つのアプローチにおいて、161P2F10Bに特異的に結合する単鎖抗体をコードする組換えベクターが、161P2F10Bを発現する細胞へと遺伝子移入技術を介して導入される。それにより、そのコードされた単鎖抗161P2F10B抗体は細胞内で発現され、161P2F10Bタンパク質に結合し、そしてそれによりその機能を阻害する。このような細胞内単鎖抗体を操作するための方法は周知である。このような細胞内抗体(「内部抗体(intrabody)」としても公知)は、その細胞内の特定の区画に特異的に標的化され、その処置の阻害活性が焦点をあわせられる箇所に対する制御を与える。この技術は、当該分野で首尾良く適用されている(概説として、RichardsonおよびMarasco、1995、TIBTECH、第13巻を参照のこと)。内部抗体は、他の豊富な細胞表面レセプターの発現を実質的に排除することが示されている(例え

40

50

ば、Richardsonら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:3137~3141; Beerliら、1994、J. Biol. Chem. 289:23931~23936; Deshaneら、1994、Gene Ther. 1:332~337を参照のこと)。

【0299】

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

10

【0300】

1つの実施形態では、内部抗体を使用して、核に161P2F10Bを捕捉し、それにより核内でその活性を妨げる。核標的化シグナルが、所望の標的化を達成するために、このような161P2F10B内部抗体に操作される。このような161P2F10B内部抗体は、特定の161P2F10Bドメインに特異的に結合するように設計される。別の実施形態において、161P2F10Bタンパク質に特異的に結合する細胞質ゾル内部抗体を使用して、161P2F10Bが核に近づくことを妨げ、それにより、161P2F10Bが、核内においていかなる生物学的活性を発揮することを妨げる(例えば、161P2F10Bが他の因子と転写複合体を形成するのを妨げる)。

20

【0301】

このような内部抗体の発現を特定の細胞に特異的に指向するために、その内部抗体の転写は、適切な腫瘍特異的プロモーターおよび/またはエンハンサーの調節制御下に配置される。内部抗体の発現を前立腺に特異的に標的化するために、例えば、PSAプロモーターおよび/またはプロモーター/エンハンサーが、利用され得る(例えば、1999年7月6日付けで発行された、米国特許第5,919,652号を参照のこと)。

30

【0302】

(XII.B.)組換えタンパク質を用いた161P2F10Bの阻害)

別のアプローチにおいて、組換え分子は、161P2F10Bに結合し、それにより161P2F10Bの機能を妨げる。例えば、このような組換え分子は、161P2F10Bが、その結合パートナー(単数または複数)に接近/結合すること、または他のタンパク質(1つまたは複数)と結合することを防止または阻害する。このような組換え分子は、例えば、161P2F10B特異的抗体分子の反応性部分(単数または複数)を含み得る。特定の実施形態において、161P2F10B結合パートナーの161P2F10B結合ドメインは、二量体融合タンパク質へと操作され、これによってこの融合タンパク質は、ヒトIgG(例えば、ヒトIgG1)のFc部分に連結された2つの161P2F10Bリガンド結合ドメインを含む。このようなIgG部分は、例えば、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインならびにヒンジ領域を含み得るが、C_H1ドメインは含まない。このような二量体融合タンパク質は、161P2F10Bの発現と関連する癌に罹患している患者に可溶性形態で投与され、それによりこの二量体融合タンパク質は161P2F10Bに特異的に結合し、そして161P2F10Bの結合パートナーとの相互作用をブロックする。このような二量体融合タンパク質はさらに、公知の抗体連結技術を使用して、多量体タンパク質へと組み合わされる。

40

50

【0303】

(XII.C.) 161P2F10Bの転写または翻訳の阻害)

本発明はまた、161P2F10B遺伝子の転写を阻害するための種々の方法および組成物を含む。同様に、本発明はまた、161P2F10B mRNAからタンパク質への翻訳を阻害するための方法および組成物を提供する。

【0304】

1つのアプローチにおいて、161P2F10B遺伝子の転写を阻害する方法は、161P2F10B遺伝子を161P2F10Bアンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程を包含する。別のアプローチにおいて、161P2F10B mRNAの翻訳を阻害する方法は、161P2F10B mRNAをアンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程を包含する。別のアプローチにおいて、161P2F10B特異的リボザイムが、161P2F10Bメッセージを切断し、それにより翻訳を阻害するために使用される。このようなアンチセンスに基づく方法およびリボザイムに基づく方法はまた、161P2F10B遺伝子の調節領域(例えば、161P2F10Bプロモーターエレメントおよび/またはエンハンサーエレメント)に関し得る。同様に、161P2F10B遺伝子転写因子を阻害し得るタンパク質が、161P2F10B mRNAの転写を阻害するために使用される。上述の方法において有用な種々のポリヌクレオチドおよび組成物が、上記で記載されている。転写および翻訳を阻害するためのアンチセンス分子およびリボザイム分子の使用は、当該分野で周知である。

【0305】

161P2F10Bの転写活性化を妨害することにより161P2F10Bの転写を阻害する他の因子もまた、161P2F10Bを発現する癌を処置するために有用である。同様に、161P2F10Bのプロセッシングに干渉する因子は、161P2F10Bを発現する癌を処置するために有用である。このような因子を利用する癌の処置方法もまた、本発明の範囲内である。

【0306】

(XII.D.) 治療的戦略についての一般的な考慮事項)

遺伝子移入および遺伝子治療の技術が、161P2F10Bを合成している腫瘍細胞に、治療用ポリヌクレオチド分子(すなわち、アンチセンス、リボザイム、内部抗体をコードするポリヌクレオチド、および他の161P2F10B阻害分子)を送達するために使用され得る。多数の遺伝子治療アプローチが、当該分野で公知である。161P2F10Bアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、161P2F10Bの転写に干渉し得る因子などをコードする組換えベクターが、このような遺伝子治療アプローチを使用して標的腫瘍細胞に送達され得る。

【0307】

上記の治療的アプローチは、広範な種々の外科的レジメン、化学療法的レジメンまたは放射線療法レジメンのいずれか1つと組み合わせられ得る。本発明の治療的アプローチは、すべての患者に対して、そして特に、化学療法剤の毒性に十分に耐性ではない患者に対して利点となる、化学療法(または他の療法)の減少した投薬量の使用および/またはより低頻度の投与の使用を可能にし得る。

【0308】

特定の組成物(例えば、アンチセンス、リボザイム、内部抗体)、またはこのような組成物の組合せの抗腫瘍活性は、種々のインビトロアッセイ系およびインビボアッセイ系を使用して評価され得る。治療的活性を評価するインビトロアッセイとしては、細胞増殖アッセイ、軟寒天アッセイおよび腫瘍促進活性を示す他のアッセイ、治療用組成物が結合パートナーへの161P2F10Bの結合を阻害する程度を決定し得る結合アッセイなどが挙げられる。

【0309】

インビボでは、161P2F10B治療用組成物の効力は、適切な動物モデルにおいて評価され得る。例えば、異種間前立腺癌モデル(ここで、ヒト前立腺癌の外植片または継

10

20

30

40

50

代された異種移植片組織が、免疫無防備状態の動物（例えば、ヌードマウスまたはSCIDマウス）に導入される）が使用され得る（Kleinら、1997、Nature Medicine 3:402~408）。例えば、PCT特許出願WO98/16628および米国特許第6,107,540号は、原発性腫瘍の発生、微小転移、および疾患の後期段階に特徴的な骨芽細胞性転移の形成を反復し得るヒト前立腺癌の種々の異種移植片モデルを記載する。効力は、腫瘍形成、腫瘍後退または転移などの障害を測定するアッセイを使用して予測され得る。

【0310】

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

10

【0311】

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

20

【0312】

治療用処方物は、可溶化され得、そして腫瘍部位に治療用組成物を送達し得る任意の経路を介して投与され得る。潜在的に有効な投与経路としては、静脈内、非経口、腹腔内、筋内、腫瘍内、皮内、器官内、同所性（orthotopic）などが挙げられるがこれらに限定されない。静脈内注射に好ましい処方物は、保存静菌水、滅菌非保存水の溶液中および/または注射用0.9%滅菌塩化ナトリウムを含むポリビニルクロリド製またはポリエチレン製のバッグ（USP）に希釈された治療用組成物を含む。治療用タンパク質調製物は、凍結乾燥され得、そして滅菌粉末として、好ましくは減圧下で保存され得、次いで注射する前に、静菌水（例えば、ベンジルアルコール防腐剤を含む）または滅菌水中で再構成され得る。

30

【0313】

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

【0314】

(XIII.) 161P2F10bの調節因子の同定、性質決定、および使用 同定の方法および調節因子の使用)

1つの実施形態において、特定の発現プロフィールを誘導または抑制する、特定の経路を誘導または抑制する、好ましくは、それによって関連する表現型を生成する、調節因子を同定するためにスクリーニングを行う。別の実施形態において、特定の状態において重要な、差次的に発現する遺伝子を同定する場合；個々の遺伝子の発現を変更する（増大させるかまたは減少させる）調節因子を同定するためにスクリーニングを実行する。別の実施形態において、差次的に発現した遺伝子の発現産物の生物学的機能を変更する調節因子を同定するためにスクリーニングを実施する。再度、特定の状態での遺伝子の重要性を同定する際に、その遺伝子産物に結合し、そして/またはその遺伝子産物の生物学的活性を調節する因子を同定するためにスクリーニングを実施する。

40

【0315】

さらに、スクリーニングを、候補薬剤に回答して誘導される遺伝子に対して行う。調節因子（正常な発現パターンを引き起こす癌発現パターンを抑制する調節因子、または正常

50

な組織におけるように、遺伝子の発現を引き起こす癌遺伝子の調節因子)を同定した後、スクリーニングを実施して、薬剤に反応して特異的に調節される遺伝子を同定する。正常な組織と薬剤で処置した癌組織との間の発現プロファイルの比較により、正常な組織でも癌組織でも発現されないが、薬剤で処置した組織において発現される、またはその逆の遺伝子が明らかとなる。これらの薬剤特異的配列は、癌遺伝子または癌タンパク質について本明細書中で記載される方法により、同定および使用される。特に、これらの配列およびこの配列がコードするタンパク質が、薬剤で処置した細胞の作製または同定において使用される。さらに、抗体が、薬剤誘導性タンパク質に対して惹起され、そして新規の治療剤を処置した癌組織サンプルに標的化するために使用される。

【0316】

(調節因子に関連する同定およびスクリーニングアッセイ)
(遺伝子発現に関連するアッセイ)

本発明のタンパク質、核酸および抗体が、スクリーニングアッセイに使用される。癌関連のタンパク質、抗体、核酸、改変されたタンパク質およびこれらの配列を含む細胞が、スクリーニングアッセイ(例えば、「遺伝子発現プロファイル」、ポリペプチドの発現プロファイルまたは生物学的機能の変更に対する薬物候補の効果の評価)において使用される。一実施形態において、発現プロファイルは、好ましくは、候補薬剤で処置した後の遺伝子を、発現プロファイルについてモニタリングするために、ハイスループットスクリーニング技術と組合せて使用される(例えば、Davis, *GF5*, *J Biol Screen* 7:69(2002); Zlokarnik, *Science* 279:84-8(1998); Heid, *Genome Res* 6:986-94, 1996)。

【0317】

癌タンパク質、抗体、核酸、改変されたタンパク質、およびネイティブまたは改変された癌タンパク質または遺伝子を含む細胞が、スクリーニングアッセイにおいて使用される。すなわち、本発明は、本発明の癌タンパク質の癌表現型または生理学的機能を調節する組成物についてスクリーニングするための方法を包含する。これは、遺伝子自体について行われるか、あるいは「遺伝子発現プロファイル」または生物学的機能に対する薬物候補の効果の評価することによって行われる。一実施形態において、発現プロファイルは、好ましくは、候補薬剤で処理した後のモニタリングを可能にするハイスループットスクリーニング技術と組み合わせて使用される。Zlokarnik(前出)を参照のこと。

【0318】

種々のアッセイが、本発明の遺伝子およびタンパク質に対して実施される。個々の核酸またはタンパク質のレベルについて、アッセイが行われる。すなわち、一旦、特定のタンパク質が癌においてアップレギュレートされると同定されると、試験化合物が、遺伝子発現を調節する能力について、または本発明の癌タンパク質への結合についてスクリーニングされる。この状況に置いて、「調節」は、遺伝子発現の増加または減少を含む。調節の好ましい量は、正常な組織対癌に罹患した細胞における遺伝子発現の本来の変化に基づき、この変化は、少なくとも10%、好ましくは50%、より好ましくは100~300%、およびいくつかの実施形態においては300~1000%またはそれ以上である。従って、遺伝子が、正常な組織と比較して、癌組織において4倍の増加を示す場合、約4倍の減少が、しばしば所望され;同様に、遺伝子が、正常な組織と比較して、癌組織において10倍の減少を示す場合、試験化合物による発現における10倍の増加の目標値が、しばしば所望される。癌において観察される遺伝子発現の型を悪化する調節因子もまた、例えば、さらなる分析において、上方制御される標的として有用である。

【0319】

遺伝子発現の量は、核酸プローブおよび遺伝子発現レベルの定量化を使用してモニタリングされるか、あるいは、遺伝子産物自体が、例えば、癌タンパク質に対する抗体および標準的な免疫アッセイを使用することによって、モニタリングされる。

【0320】

(遺伝子発現を改変する化合物を同定するための発現モニタリング)

10

20

30

40

50

一実施形態において、遺伝子発現のモニタリング（すなわち、発現プロフィール）は、多数の実体について同時にモニタリングされる。このようなプロフィールは、代表的に、図2の遺伝子の1つ以上を含む。この実施形態において、例えば、癌核酸プローブは、特定の細胞における癌配列を検出および定量化するために、バイオチップに結合される。あるいは、PCRが、使用され得る。従って、例えば、一連のマイクロタイタープレートのウェルが、所望のウェルに分配されたプライマーと共に使用され得る。次いで、PCR反応が実施され、そして各ウェルについて分析される。

【0321】

発現モニタリングは、1つ以上の癌関連配列（例えば、図2に記載のポリヌクレオチド配列）の発現を改変する化合物を同定するために実施される。一般に、試験化合物は、分析の前に、細胞に加えられる。さらに、スクリーンもまた、癌を調節するか、本発明の癌タンパク質を調節するか、本発明の癌タンパク質に結合するか、または本発明の癌タンパク質および抗体もしくは他の結合パートナーの結合を妨害する薬剤を同定するために提供される。

10

【0322】

一実施形態において、ハイスループットスクリーニング方法は、多数の潜在的な治療化合物（候補化合物）を含むライブラリーを提供する工程を包含する。次いで、このような「コンビナトリアルケミカルライブラリー」が、1つ以上のアッセイにおいてスクリーニングされて、所望の特徴的な活性を示すライブラリーメンバー（特定の化学種またはサブクラス）が同定される。このように同定された化合物は、都合良い「リード化合物」として、スクリーニングのための化合物として、または治療剤として働き得る。

20

【0323】

特定の実施形態において、潜在的な調節因子のコンビナトリアルライブラリーは、癌ポリペプチドに結合する能力、または活性を調節する能力についてスクリーニングされる。都合良くは、有用な特性を有する新たな化学実体が、所望の特性または活性（例えば、阻害活性）を有する化合物（「リード化合物」と呼ばれる）を想定し、このリード化合物の改変体を作製し、そしてこれらの改変体化合物の特性および活性を評価することによって、生成される。しばしば、ハイスループットスクリーニング（HTS）法が、このような分析のために用いられる。

【0324】

上記のように、遺伝子発現モニタリングは、候補調節因子（例えば、タンパク質、核酸または小分子）を試験するために、都合良く用いられる。候補化合物を加え、そして細胞をある期間インキュベートした後、分析されるべき標的配列を含むサンプルが、例えば、バイオチップに添加される。

30

【0325】

所望の場合、標的配列は、公知の技術を使用して調製される。例えば、サンプルは、公知の溶解緩衝液、エレクトロポレーションなどを使用して、細胞を溶解するために処理され、精製および増幅（例えば、PCR）が、必要に応じて実施される。例えば、ヌクレオチドに供給結合された標識を用いるインビトロ転写が実施される。一般に、これらの核酸は、ピオチン-FITCまたはPEで、あるいはcy3またはcy5で標識される。

40

【0326】

標的核酸は、プローブへの標的配列の特異的結合を検出する手段を提供するために、例えば、蛍光シグナル、化学発光シグナル、化学市議成るまたは放射性シグナルで標識され得る。この標識はまた、酵素（例えば、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得、これは、適切な基質が提供された場合、産物を生成し、この産物が検出される。あるいは、この標識は、標識された化合物または小分子（例えば、エプタグまたはストレプトアビジンに特異的に結合するピオチン）であり得る。ピオチンの例について、ストレプトアビジンは、上記のようにして標識され、それにより、検出可能なシグナルを結合標的配列に提供する。未結合の標識ストレプトアビジンは、代表的に、分析の前に除去される。

50

【0327】

当業者により理解されるように、これらのアッセイは、直接ハイブリダイゼーションアッセイであり得るか、または「サンドイッチアッセイ」を含み得、この「サンドイッチアッセイ」は、多数のプロープの使用を含み、一般に、以下の米国特許に概説される：米国特許第5,681,702号；同第5,597,909号；同第5,545,730号；同第5,594,117号；同第5,591,584号；同第5,571,670号；同第5,580,731号；同第5,571,670号；同第5,591,584号；同第5,624,802号；同第5,635,352号；同第5,594,118号；同第5,359,100号；同第5,124,246号；および同第5,681,697号。この実施形態において、一般的に、標的核酸は、上で概説されたように調製され、次いで、ハイブリダイゼーション複合体の形成を可能にする条件下で、複数の核酸プロープを含むバイオチップに添加される。

10

【0328】

上で概説されるような様々なハイブリダイゼーション条件（高いストリンジェンシー条件、中程度のストリンジェンシー条件および低いストリンジェンシー条件を含む）が、使用される。これらのアッセイは、一般的に、標的のみの存在下で、標的プロープハイブリダイゼーション複合体の形成を可能にするストリンジェンシー条件下で実施される。ストリンジェンシーは、熱力学的変数である工程パラメーター（温度、ホルムアミドの濃度、塩濃度、カオトロピック塩の濃度、pH、有機溶媒の濃度など）を変更することによって、制御され得る。これらのパラメーターはまた、米国特許第5,681,697号に一般的に概説されるように、非特異的結合を制御するために使用され得る。従って、特定の工程を、より高いストリンジェンシー条件で実施して、非特異的結合を減少することが所望され得る。

20

【0329】

本明細書中で概説される反応は、種々の様式で達成され得る。これらの反応成分は、同時にまたは異なる順序で連続的に加えられ得、好ましい実施形態は、以下に概説される。さらに、この反応は、種々の他の試薬を含み得る。これとしては、塩、緩衝液、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、界面活性剤などが挙げられ、これらは、最適なハイブリダイゼーションおよび検出を容易にするため、そして/または非特異的相互作用もしくはバックグラウンド相互作用を減少するために使用され得る。他の場合にはアッセイの効率を改善する試薬（例えば、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤など）もまた、サンプル調製方法および標的の純度に依存して、必要に応じて使用され得る。アッセイデータが分析されて、個々の遺伝子の発現レベル、および状態間の発現レベルの変化が決定されて、遺伝子発現プロファイルが作製される。

30

【0330】

（生物学的活性に関連するアッセイ）

本発明は、本発明の癌関連遺伝子またはタンパク質の活性を調節する化合物を同定またはスクリーニングする方法を提供する。この方法は、上記のような試験化合物を、本発明の癌タンパク質を含む細胞に添加する工程を包含する。これらの細胞は、本発明の癌タンパク質をコードする組換え核酸を含む。別の実施形態において、候補薬剤のライブラリーが、複数の細胞について試験される。

40

【0331】

1つの局面において、このアッセイは、生理学的シグナル（例えば、ホルモン、抗体、ペプチド、抗原、サイトカイン、増殖因子、活動電位、化学療法薬を含む薬理学的薬剤、放射線、発癌性または他の細胞（すなわち、細胞-細胞接触））の以前のまたは後の曝露の存在あるいは非存在下で評価される。別の例において、この決定は、細胞周期プロセスの異なる段階で行われる。この様式において、本発明の遺伝子またはタンパク質を調節する化合物が、同定される。薬理学的活性を有する化合物は、本発明の癌タンパク質の活性を増大し得るか、本発明の癌タンパク質の活性を干渉し得る。一旦同定されると、類似の構造が、この化合物の重要な構造特性を同定するために評価される。

50

【0332】

一実施形態において、癌細胞の分裂を調節（例えば、阻害）する方法が、提供され；この方法は、癌調節因子の投与を包含する。別の実施形態において、癌を調節（例えば、阻害）する方法が提供され；この方法は、癌調節因子の投与を包含する。さらなる実施形態において、癌を有する細胞または個体を処置する方法が提供され；この方法は、癌調節因子の投与を包含する。

【0333】

一実施形態において、本発明の遺伝子を発現する細胞の状態を調節するための方法が提供される。本明細書中で使用される場合、状態は、細胞の、成長、増幅、生存、機能、アポトーシス、老化、位置、酵素的活性、シグナル伝達などのような当該分野で受け入れられたパラメーターを含む。一実施形態において、癌インヒビターは、上で考察されたような抗体である。別の実施形態において、癌インヒビターは、アンチセンス分枝である。種々の細胞成長、増殖、および転移アッセイが、本明細書中に記載されるように、当業者に公知である。

【0334】

（調節因子を同定するためのハイスループットスクリーニング）

適切な調節因子を同定するためのアッセイは、ハイスループットスクリーニングに受け入れられる。従って、好ましいアッセイは、癌遺伝子の転写の増大または阻害、ポリペプチド発現の阻害または増大、およびポリペプチド活性の阻害または増大を検出する。

【0335】

一実施形態において、ハイスループットスクリーニング法において評価される調節因子は、タンパク質であり、しばしば、天然に存在するタンパク質、または天然に存在するタンパク質のフラグメントである。従って、例えば、タンパク質を含む細胞抽出物、またはタンパク質性の細胞抽出物のランダム消化物もしくは指向された消化物が、使用される。この様式において、タンパク質のライブラリーが、本発明の方法におけるスクリーニングのために作製される。細菌タンパク質、真菌タンパク質、ウイルスタンパク質および哺乳動物タンパク質のライブラリーが、この実施形態において特に好ましく、後者が、好ましく、そしてヒトタンパク質が、特に好ましい。特に有用な試験化合物は、標的が属するクラスのタンパク質（例えば、酵素に対する基質、またはリガンドおよびレセプター）に指向される。

【0336】

（調節因子を同定および特徴付けするための軟寒天およびコロニー形成の使用）

正常な細胞は、結合および増殖するために固体支持体を必要とする。細胞が形質転換される場合、これらは、その表現型を失い、そして成長して、この支持体から脱離する。例えば、形質転換細胞は、攪拌懸濁培養液中で増殖し得るか、または半固体培地（例えば、半固体寒天または軟寒天）中に懸濁され得る。この形質転換細胞は、腫瘍抑制遺伝子でトランスフェクトされた場合、正常な表現型を再生し、そして再び、結合して増殖するために、固体支持体を必要とする。アッセイにおける軟寒天増殖またはコロニー形成は、宿主細胞において発現した場合、異常な細胞増殖および形質転換を阻害する癌配列の調節因子を同定するために使用される。調節因子は、固体または半固体の培地（例えば、寒天）に懸濁された宿主細胞が増殖する能力を軽減または排除する。

【0337】

懸濁アッセイにおける軟寒天増殖またはコロニー形成のための技術は、Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (第3版、1994)に記載される。Garkavtsevら(1996)(前出)の方法の節もまた参照のこと。

【0338】

（調節因子を同定および特徴付けするための接触阻害および増殖密度制限の評価）

正常な細胞は、代表的に、細胞培養物の平らな組織化されたパターンで、この細胞が他の細胞と接触するまで増殖する。この細胞が、別の細胞と接触した場合、これらは、接触

10

20

30

40

50

阻害され、そして増殖を停止する。しかし、形質転換細胞は、接触阻害されず、そして、組織化されていない病巣において高密度まで増殖し続ける。従って、形質転換細胞は、対応する正常な細胞よりも高い飽和密度まで増殖する。これは、病巣における細胞の方向付けされていない単層の形成によって、形態学的に検出される。あるいは、飽和密度における (^3H) - チミジンでの標識指数が、増殖の密度制限を測定するために使用され、同様に、MTTアッセイまたはAlamarブルーアッセイが、細胞の増殖能および調節因子がこの細胞の増殖能に影響する能力を証明する。Freshney (1994) (前出) を参照のこと。形質転換細胞は、腫瘍抑制因子でトランスフェクトされた場合、正常な表現型を再生し、そして接触阻害されて、低密度まで増殖する。

【0339】

このアッセイにおいて、飽和密度における (^3H) - チミジンでの標識指数は、増殖の密度制限を測定する好ましい方法である。形質転換宿主脂肪は、癌関連配列でトランスフェクトされ、そして非制限培地条件で、飽和密度で24時間増殖される。(^3H) - チミジンでの細胞標識の割合は、組み込まれたcpmによって決定される。

【0340】

接触非依存性増殖は、異常な細胞増殖および形質転換を生じた癌配列の調節因子を同定するために使用される。調節因子は、接触非依存性増殖を減少または排除し、そして細胞を正常な表現型に戻す。

【0341】

(調節因子を同定および特徴付けするための増殖因子または血清依存性の評価)

形質転換細胞は、その正常な対応物よりも低い血清依存性を有する(例えば、Temin, Natl. J. Cancer Inst. 37: 167 - 175 (1966); Eagleら, J. Exp. Med. 131: 836 - 879 (1970); Freshney, (前出) を参照のこと)。このことは、形質転換細胞による種々の増殖因子の放出に起因する。形質転換宿主細胞の増殖因子または血清依存性の程度は、制御下にあるものと比較され得る。例えば、細胞の増殖因子または血清依存性は、本発明の癌関連配列を調節する化合物を同定および特徴付けするための方法においてモニタリングされる。

【0342】

(調節因子を同定しそして特徴付けるための、腫瘍特異的マーカーレベルの使用)

腫瘍細胞は、それらの正常な対応物より増加した量の特定の因子(本明細書中以下において「腫瘍特異的マーカー」)を放出する。例えば、プラスミノゲンアクチベーター(PA)は、正常な脳細胞からより高レベルで、ヒト神経膠腫から放出される(例えば、Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential interference with Tumor Growth, in Biological Responses in Cancer, 178 - 184頁(Mihich(編)1985)を参照のこと)。同様に、腫瘍脈管形成因子(TAF)は、正常な対応物より高レベルで、腫瘍細胞において放出される。例えば、Folkman, Angiogenesis and Cancer, Sem Cancer Biol. (1992) を参照のこと。一方で、bFGFは、内皮細胞腫瘍から放出される(Ensoli, Bら)。

【0343】

これらの因子の放出を測定する、種々の技術が、Freshney (1994) (前出) に記載されている。Unklessら, J. Biol. Chem. 249: 4295 - 4305 (1974); Strickland & Beers, J. Biol. Chem. 251: 5694 - 5702 (1976); Whurら, Br. J. Cancer 42: 305 - 312 (1980); Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, Biological Responses in Cancer, 178 - 184頁(Mihich(編)1985); Freshney, Anticancer Res. 5: 111 - 130 (1985)

10

20

30

40

50

もまた参照のこと。例えば、腫瘍特異的マーカーレベルは、本発明の癌関連配列を調節する化合物を同定および特徴付けるための方法でモニターされる。

【0344】

(調節因子を同定しそして特徴付けるための、マトリゲル(m a t r i g e l)への侵襲性)

マトリゲルまたは細胞外マトリックス成分への侵襲性の程度は、癌関連配列を調節する化合物を同定および特徴付けるためのアッセイとして使用され得る。腫瘍細胞は、悪性と、マトリゲル内または何らかの他の細胞外マトリックス成分内への細胞の侵襲性との間のポジティブな相関を示す。このアッセイにおいて、腫瘍形成性の細胞が、代表的に、宿主細胞として使用される。これらの宿主細胞中での腫瘍抑制因子の発現は、宿主細胞の侵襲性を減少させる。Cancer Res. 1999; 59: 6010; Freshney (1994) (前出)に記載される技術が使用され得る。簡単にいえば、宿主細胞の侵襲のレベルは、マトリゲルまたは何らかの他の細胞外マトリックス成分でコーティングされたフィルターを使用することによって、測定される。ゲル内への浸透、またはフィルターの遠位側を通しての浸透は、侵襲性と定格され、そして細胞の数および移動した距離によってか、または細胞を¹²⁵Iで予め標識し、そしてフィルターの遠位側またはディッシュの底部の放射能を計数することによって、組織学的に定格される。例えば、Freshney (1984) (前出)を参照のこと。

10

【0345】

(調節因子を同定しそして特徴付けるための、インビボでの腫瘍増殖の評価)

細胞増殖に対する癌関連配列の影響は、トランスジェニック生物または免疫抑制された生物において試験される。トランスジェニック生物は、当該分野で認容された種々の様式で調製される。例えば、癌遺伝子が破壊されたかまたは癌遺伝子が挿入された、ノックアウトトランスジェニック生物(例えば、マウスのような哺乳動物)が作製される。ノックアウトトランスジェニックマウスは、マーカー遺伝子または他の異種遺伝子を、相同組換えを介して、マウスゲノムにおける内因性癌遺伝子部位に挿入することによって、作製される。このようなマウスはまた、内因性癌遺伝子を変異バージョンの癌遺伝子で置き換えることによって、または内因性癌遺伝子を、例えば発癌物質に曝露することによって変異させることによって、作製され得る。

20

【0346】

トランスジェニックキメラ動物(例えば、マウス)を調製するためには、DNA構築物が、胚幹細胞の核に導入される。新たに操作された遺伝的損傷を含む細胞が、宿主マウス胚に注入され、これが、レシピエントの雌性に再移植される。これらの胚のいくつかは、いくつかの生殖細胞が変異体細胞株由来であるキメラマウスに発育する。従って、このキメラマウスを繁殖させることによって、導入された遺伝的損傷を含む新たな株のマウスを得ることが可能である(例えば、Capecchiら, Science 244: 1288 (1989)を参照のこと)。キメラマウスは、2002年4月2日に発行された米国特許第6,365,797号; 2000年8月22日に発行された米国特許第6,107,540号; Hoganら, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)およびTeratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, 編, IRL Press, Washington, D.C., (1987)に従って、誘導され得る。

30

40

【0347】

あるいは、種々の免疫抑制宿主動物または免疫不全宿主動物が、使用され得る。例えば、遺伝的に無胸腺の「ヌード」マウス(例えば、Giovanel্লাら, J. Natl. Cancer Inst. 52: 921 (1974)を参照のこと)、SCIDマウス、胸腺切除されたマウス、または照射されたマウス(例えば、Bradleyら, Br. J. Cancer 38: 263 (1978); Selbyら, Br. J. Cancer

50

41:52(1980)を参照のこと)が、宿主として使用され得る。同系の宿主に注入された、移植可能な腫瘍細胞(代表的に、約 10^6 個の細胞)は、高い割合の場合において、侵襲性の腫瘍を産生し、一方で、類似の起源の正常細胞は、侵襲性の腫瘍を産生しない。侵襲性の腫瘍を発達させた宿主において、癌関連配列を発現する細胞が、皮下注射または正常位で注射される。次いで、マウスが、コントロール群および処理実験群(例えば、調節因子で処理された)を含む群に分離される。適切な長さの時間(好ましくは、4~8週間)の後に、腫瘍増殖が測定され(例えば、体積またはその2つの最大寸法、もしくは重量によって)、そしてコントロールと比較される。統計学的に有意な減少を有する腫瘍(例えば、Studentのt検定を使用する)は、阻害された増殖を有するといわれる。

10

【0348】

(調節因子を同定しそして特徴付けるためのインビトロアッセイ)

調節活性を有する化合物を同定するためのアッセイは、インビトロで実施され得る。例えば、癌ポリペプチドがまず潜在的な調節因子と接触され、そして適切な量の時間(例えば、0.5~48時間)にわたってインキュベートされる。1つの実施形態において、癌ポリペプチドのレベルは、タンパク質またはmRNAのレベルを測定することによって、インビトロで決定される。タンパク質のレベルは、癌ポリペプチドまたはそのフラグメントに選択的に結合する抗体を用いる、免疫アッセイ(例えば、ウェスタンブロットティング、ELISAなど)を使用して測定される。mRNAの測定のためには、増幅(例えば、PCR、LCR、またはハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RNAse保護、ドットブロットティング))が好ましい。タンパク質またはmRNAのレベルは、直接的にかまたは間接的に標識された検出試薬(例えば、本明細書中に記載されるような、蛍光標識または放射活性標識された核酸、放射活性にまたは酵素的に標識した抗体など)を使用して、検出される。

20

【0349】

あるいは、レポーター遺伝子系が、レポーター遺伝子(例えば、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、CAT、またはP-gal)に作動可能に連結された癌タンパク質プロモーターを使用して発現(divise)され得る。レポーター構築物は、代表的に、細胞内にトランスフェクトされる。潜在的な調節因子での処理後、レポーター遺伝子の転写、翻訳、または活性の量が、当業者に公知である標準的な技術に従って測定される(Davis GF, 前出; Gonzalez, J. & Negulescu, P. Curr. Opin. Biotechnol. 1998: 9: 624)。

30

【0350】

上で概説されたように、インビトロスクリーニングは、個々の遺伝子および遺伝子産物に対してなされる。すなわち、特定の差次的に発現される遺伝子が特定の状態において重要であると同定されると、この遺伝子または遺伝子産物自体の発現の調節因子のスクリーニングが実施される。

【0351】

1つの実施形態において、特定の遺伝子の発現の調節因子についてのスクリーニングが実施される。代表的に、ほんの1つまたは少数の遺伝子の発現が、評価される。別の実施形態において、スクリーニングは、差次的に発現されるタンパク質に結合する化合物をまず発見するように、設計される。次いで、これらの化合物が、差次的に発現される活性を調節する能力について評価される。さらに、一旦、最初の候補化合物が同定されると、構造と活性の関係をよりよく評価するために、改変体が、さらにスクリーニングされ得る。

40

【0352】

(調節因子を同定しそして特徴付けるための、結合アッセイ)

本発明に従う結合アッセイにおいて、精製されたかまたは単離された本発明の遺伝子産物が、一般に使用される。例えば、抗体が、本発明のタンパク質に対して生成され、そして免疫アッセイが実施されて、タンパク質の量および/または位置を決定する。あるいは、癌タンパク質を含む細胞が、アッセイにおいて使用される。

50

【0353】

従って、これらの方法は、本発明の癌タンパク質を、リガンドのような候補化合物と混合する工程、および本発明の癌タンパク質に対する、この化合物の結合を決定する工程を包含する。好ましい実施形態は、ヒト癌タンパク質を利用する；ヒト疾患の動物モデルもまた、開発および使用され得る。また、他の類似の哺乳動物タンパク質もまた、当業者によって理解されるように、使用され得る。さらに、いくつかの実施形態において、改変体または誘導癌タンパク質が、使用される。

【0354】

一般に、本発明の癌タンパク質またはリガンドは、不溶性支持体に拡散不可能に結合される。この支持体は、例えば、単離されたサンプルを受容する領域を有するもの（マイクロタイタープレート、アレイなど）であり得る。不溶性の支持体は、組成物が結合され得る任意の組成物から作製され得、可溶性材料から容易に分離され、そしてスクリーニングの方法全体とその他の点で適合性である。このような支持体の表面は、中実または多孔性であり得、そして任意の好都合な形状であり得る。

10

【0355】

適切な不溶性の支持体の例としては、マイクロタイタープレート、アレイ、膜およびビーズが挙げられる。これらは代表的に、ガラス、プラスチック（例えば、ポリスチレン）、多糖、ナイロン、ニトロセルロース、またはTeflon（登録商標）TMなどで作製される。マイクロタイタープレートおよびアレイは、特に好都合である。なぜなら、少量の試薬およびサンプルを使用して、多数のアッセイが同時に実施され得るからである。組成物を支持体に結合させる特定の様式は、試薬および本発明の方法全体と適合性であり、組成物の活性を維持し、そして拡散不可能である限り、重要ではない。結合の好ましい方法としては、タンパク質を支持体に付着させる場合に（「粘着」支持体またはイオン性支持体への直接結合、化学架橋、表面上でのタンパク質または薬剤の合成など）、リガンド結合部位も活性化配列もいずれも立体的にブロックしない抗体の使用が挙げられる。タンパク質またはリガンド/結合剤の、支持体への結合に続いて、過剰の未結合物質が、洗浄によって除去される。次いで、サンプル受容領域は、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインまたは他の無害なタンパク質もしくは他の部分と共にインキュベーションすることによって、ブロックされ得る。

20

【0356】

一旦、本発明の癌タンパク質が支持体に結合すると、試験化合物がアッセイに添加される。あるいは、候補結合剤が支持体に結合され、次いで、本発明の癌タンパク質が添加される。結合剤としては、特異的抗体、化学ライブラリーのスクリーニングによって同定された非天然結合剤、ペプチドアナログなどが挙げられる。

30

【0357】

ヒト細胞に対して低い毒性を有する薬剤を同定するためのアッセイが、特に興味深い。広範な種々のアッセイが、この目的で使用され得、このアッセイとしては、増殖アッセイ、cAMPアッセイ、標識されたインビトロでのタンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合についての免疫アッセイ、機能的アッセイ（リン酸化アッセイなど）などが挙げられる。

40

【0358】

試験化合物（リガンド、結合剤、調節因子など）の、本発明の癌タンパク質への結合の決定は、多数の様式でなされ得る。試験化合物が標識され得、そして結合が、例えば、本発明の癌タンパク質のすべてまたは一部を固体支持体に付着させ、標識された候補化合物（例えば、蛍光標識）を添加し、過剰の試薬を洗浄除去し、そして標識が固体支持体上に存在するか否かを決定することによって、直接決定され得る。種々のブロック工程および洗浄工程が、適切のように利用され得る。

【0359】

特定の実施形態において、成分の1つのみが標識される。例えば、本発明のタンパク質またはリガンドが標識される。あるいは、1つより多い成分が、異なる標識で標識される

50

(例えば、タンパク質に対して I^{125} 、および化合物に対して発蛍光団)。近接試薬(例えば、クエンチング剤またはエネルギー移動剤)もまた、有用である。

【0360】

(調節因子を同定しそして特徴付けるための、競合結合)

1つの実施形態において、「試験化合物」の結合は、「競合物質」を用いる競合結合アッセイによって決定される。競合物質とは、標的分子(例えば、本発明の癌タンパク質)に結合する結合部分である。競合物質としては、抗体、ペプチド、結合パートナー、リガンドなどのような化合物が挙げられる。特定の状況下では、試験化合物と競合物質との間の競合結合は、試験化合物に取って代わる。1つの実施形態において、試験化合物が標識される。試験化合物、競合物質のいずれか、または両方が、結合を可能にするために十分な時間にわたって、タンパク質に添加される。インキュベーションが、最適な活性を容易にする温度(代表的に、4 と40 との間)で実施される。インキュベーション時間は、代表的に、例えば、スクリーニングの迅速なハイスループットを容易にするように、最適化される;代表的に、0時間と1時間との間で十分である。過剰の試薬が、一般に、除去または洗浄除去される。次いで、第二の成分が添加され、そして標識された成分の存在または非存在が、結合を示すために追跡される。

10

【0361】

1つの実施形態において、競合物質がまず添加され、次いで試験化合物が添加される。競合物質の置き換えは、試験化合物が癌タンパク質に結合することの指標であり、従って、癌タンパク質に結合し得、そして癌タンパク質の活性を潜在的に調節し得る。この実施形態において、いずれかの成分が標識され得る。従って、例えば、競合物質が標識される場合、試験後化合物洗浄溶液中の標識の存在が、試験化合物による置き換えを示す。あるいは、試験化合物が標識される場合、支持体上の標識の存在が、置き換えの指標である。

20

【0362】

代替の実施形態において、試験化合物がまず添加され、インキュベーションおよび洗浄され、次いで、競合物質が添加される。競合物質による結合の非存在は、試験化合物が、競合物質より高い親和性で、癌タンパク質に結合することを示す。従って、試験化合物が標識される場合、支持体上の標識の存在(競合物質の結合の欠如と組み合わせられる)が、試験化合物が本発明の癌タンパク質に結合し、従って潜在的に調節することの指標である。

30

【0363】

従って、競合結合方法は、本発明の癌タンパク質の活性を調節し得る薬剤を同定するための、差次的スクリーニングを包含する。この実施形態において、この方法は、癌タンパク質および競合物質を、第一のサンプル中で混合する工程を包含する。第二のサンプルは、試験化合物、癌タンパク質、および競合物質を含有する。競合物質の結合が、両方のサンプルについて決定され、そしてこれら2つのサンプル間での結合の変化、または差異が、癌タンパク質に結合し得、そしてその活性を潜在的に調節し得る薬剤の存在を示す。すなわち、競合物質の結合が、第一のサンプルに対して第二のサンプルにおいて異なる場合、この薬剤は、癌タンパク質に結合し得る。

【0364】

あるいは、示差的スクリーニングが、ネイティブの癌タンパク質に結合するが改変癌タンパク質に結合し得ない薬物候補を同定するために用いられる。例えば、癌タンパク質の構造はモデル化されて、合理的薬物設計において、その部位と相互作用する因子、すなわち部位改変タンパク質(site-modified protein)に一般的に結合しない因子を合成するために用いられる。さらに、ネイティブの癌タンパク質の活性に影響するような薬物候補はまた、そのようなタンパク質の活性の増強または減少のいずれかをやる能力について薬物をスクリーニングすることによって同定される。

40

【0365】

陽性コントロールおよび陰性コントロールが、このアッセイにおいて用いられ得る。好ましくは、コントロールおよび試験サンプルは、統計的に有意な結果を得るために少なく

50

とも三連で実施される。全てのサンプルのインキュベーションは、タンパク質へのこの因子の結合を可能にするのに十分な時間、行われる。インキュベーションに続いて、サンプルを洗浄して非特異的結合物質を含まないようにし、そして結合した、遺伝的に標識した因子の量を決定する。例えば、放射標識を用いる場合、これらのサンプルをシンチレーションカウンターを用いて計数して、結合した化合物の量を決定し得る。

【 0 3 6 6 】

種々の他の試薬がこのスクリーニングアッセイに関与し得る。これらの試薬としては、最適なタンパク質 - タンパク質結合を容易にし、そして / または非特異的相互作用もしくはバックグラウンド相互作用を減少するために用いられる塩、中性タンパク質（例えば、アルブミン）界面活性剤などのような試薬が挙げられる。このアッセイの効率を他の方法で改善する試薬（例えば、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤など）もまた用いられ得る。成分の混合物が、必須の結合を提供する順番で添加される。

10

【 0 3 6 7 】

（本発明のタンパク質をダウンレギュレートまたは阻害するためのポリヌクレオチドの使用）

癌のポリヌクレオチド調節因子が、WO 91 / 04753に記載されるように、リガンド結合分子との結合体の形成によって、標的ヌクレオチド配列を含む細胞へと導入され得る。適切なリガンド結合分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：細胞表面レセプター、増殖因子、他のサイトカイン、または細胞表面レセプターに結合する他のリガンド。好ましくは、リガンド結合分子の結合体は、リガンド結合分子がその対応する分子またはレセプターに結合する能力を十分には干渉せず、細胞へのセンスオリゴヌクレオチドもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその結合体バージョンの進入を十分にはブロックしない。あるいは、癌のポリヌクレオチド調節因子が、例えば、WO 90 / 10448に記載されるように、ポリヌクレオチド - 脂質複合体の形成によって標的核酸配列を含む細胞内に導入され得る。アンチセンス分子またはノックアウトモデルおよびノックインモデルの使用もまた、処理方法に加えて、上で議論されるようなスクリーニングアッセイにおいて用いられ得ることが理解される。

20

【 0 3 6 8 】

（阻害およびアンチセンスヌクレオチド）

特定の実施形態において、癌関連タンパク質の活性が、アンチセンスポリヌクレオチドまたは阻害性小核RNA (snRNA) (すなわちコードmRNA核酸配列 (例えば、本発明の癌タンパク質、mRNA、またはそれらの部分配列) に相補的であり、そして好ましくは、これらに特異的にハイブリダイズし得る核酸) の使用により、ダウンレギュレートされるか、または完全に阻害される。mRNAへのアンチセンスポリヌクレオチドの結合は、mRNAの翻訳および / または安定性を減少させる。

30

【 0 3 6 9 】

本発明の文脈において、アンチセンスポリヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチド、または天然に存在するサブユニットもしくはこれらの近縁のホモログから形成される合成種を含み得る。アンチセンスポリヌクレオチドはまた、変化した糖部分または糖間の連結を有し得る。当該分野において使用されることが公知のホスホロチオエートおよび他の硫黄含有種が、例示的にこれらの中に含まれる。アナログは、これらが本発明のヌクレオチドとハイブリダイズするように有効に機能する限り本発明に含まれる。例えば、Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA; Sequitor, Inc., Natick, MAを参照のこと。

40

【 0 3 7 0 】

そのようなアンチセンスポリヌクレオチドは、組換え手段を用いて容易に合成され得るか、またはインビトロで合成され得る。そのような合成についての装置は、種々の販売者 (Applied Biosystemsが挙げられる) から販売されている。他のオリゴヌクレオチド (例えば、ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体) の調製もまた、

50

当業者に周知である。

【0371】

本明細書中で使用される場合、アンチセンス分子は、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドを含む。センスオリゴヌクレオチドは、例えば、アンチセンス鎖への結合により転写をブロックするために用いられ得る。このアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびセンスオリゴヌクレオチドは、癌分子についての標的mRNA（センス）配列または標的DNA（アンチセンス）配列に結合し得る一本鎖核酸配列（RNAまたはDNAのいずれか）を含む。本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドは、一般的に、少なくとも約12ヌクレオチド、好ましくは、約12ヌクレオチド～約30ヌクレオチドのフラグメントを含む。所定のタンパク質をコードするcDNA配列に基づくアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えば、Stein & Cohen (Cancer Res. 48:2659 (1988)) および van der Kroft, (BioTechniques 6:958 (1988)) に記載されている。

10

【0372】

(リボザイム)

アンチセンスポリヌクレオチドに加えて、リボザイムが、癌関連ヌクレオチド配列の転写を標的化または阻害するために用いられ得る。リボザイムは、他のRNA分子を触媒的に切断するRNA分子である。種々の種類のリボザイムが記載されている。これらのリボザイムとしては、グループIリボザイム、ハンマーヘッドリボザイム、ヘアピンリボザイム、RNase P、およびアックスヘッドリボザイムが挙げられる（例えば、種々のリボザイムの特性の一般的な概説についてはCastanottoら、Adv. in Pharmacology 25:289～317 (1994)を参照のこと）。

20

【0373】

ヘアピンリボザイムの遺伝的特徴は、例えば、Hampelら、Nucl. Acid Res. 18:299～304 (1990)；欧州特許出願番号0360257；米国特許第5,254,678号に記載されている。調製方法は、当業者に周知である（例えば、WO 94/26877；Ojwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6340～6344 (1993)；Yamadaら、Human Gene Therapy 1:39～45 (1994)；Leavittら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:699～703 (1995)；Leavittら、Human Gene Therapy 5:1151～120 (1994)；およびYamadaら、Virology 205:121～126 (1994)を参照のこと）。

30

【0374】

(表現型スクリーニングにおける調節因子の使用)

1つの実施形態において、試験化合物が、関連する癌発現プロファイルを有する癌細胞の集団に投与される。本明細書において「投与する」または「接触させる」とは、調節因子を、取り込み作用および細胞内作用によってか、または細胞表面での作用によって、細胞に対して作用させるような様式で、この調節因子をその細胞に添加することを意味する。いくつかの実施形態において、タンパク質様因子（すなわち、ペプチド）をコードする核酸がウイルス構築物（例えば、アデノウイルス構築物またはレトロウイルス構築物）へと付加され、そして細胞へと添加されてこのペプチド因子の発現が達成される（例えば、PCT US97/01019）。調節可能な遺伝子治療系もまた、用いられ得る。一旦、調節因子を細胞に投与した後、これらの細胞を、所望の場合洗浄し、そして好ましい生理学的条件下で、いくらかの期間インキュベートする。次いで、これらの細胞を、収集し、そして新しい遺伝子発現プロファイルを作製する。従って、例えば、癌組織を、癌の表現型を調節（例えば、誘導または抑制）する因子についてスクリーニングする。発現プロファイルの少なくとも1つの遺伝子、好ましくは多くの遺伝子における変化は、この因子が、癌の活性に対して効果を有することを示す。同様に、生物学的機能またはシグナル伝

40

50

達経路を変化させることは、調節因子の活性を示す。癌の表現型についてのそのようなシグネチャーを規定することにより、表現型を変化させる新規の薬物についてのスクリーニングが考案される。このアプローチにおいて、薬物標的は既知である必要はなく、元の遺伝子/タンパク質発現スクリーニングプラットフォームにおいて表されている必要もなく、標的タンパク質に対する転写物のレベルが変化する必要もない。機能を阻害する調節因子は、代理マーカーとしての役割を果たす。

【0375】

上で概説したとおり、遺伝子または遺伝子産物を評価するために、スクリーニングを実施する。すなわち、特定の示差的に発現された遺伝子を、特定の状態において重要であると同定する工程、遺伝子または遺伝子産物自体の発現のいずれかの調節因子をスクリーニングする工程を実施する。

10

【0376】

(本発明のペプチドに影響する調節因子の使用)

癌ポリペプチドの活性、または癌表現型の測定を、種々のアッセイを用いて実施する。例えば、癌ポリペプチドの機能に対する調節因子の効果を、上記のパラメーターを試験することにより測定する。活性に影響する生理学的変化が、本発明のポリペプチドに対する試験化合物の影響を評価するために用いられる。インタクトな細胞または動物を用いて機能的結果が決定される場合、種々の効果が、(例えば、固形腫瘍、腫瘍増殖、腫瘍転移、新生血管形成、ホルモン放出、(例えば、ノーザンブロットによる)既知の遺伝マーカーおよび特徴付けられていない遺伝マーカーの両方に対する転写の変化に関連する癌の場合、細胞代謝における変化(例えば、細胞増殖またはpH変化)および細胞内二次的メッセンジャー(例えば、cGMP)の変化の場合に)評価され得る。

20

【0377】

(癌関連配列を同定、特徴付けする方法)

種々の遺伝子配列の発現が、癌に関連する。従って、変異体癌遺伝子または改変体癌遺伝子に基づく障害を決定する。1つの実施形態において、本発明は、改変体癌遺伝子を含む細胞を同定する(例えば、細胞内の少なくとも1つの内因性癌遺伝子の配列の全てまたは一部の存在を決定する)ための方法を提供する。これは、多数の配列決定技術を用いて達成される。本発明は、個体の癌の遺伝子型を同定する(例えば、個体における少なくとも1つの本発明の遺伝子の配列の全てまたは一部を決定する)方法を包含する。これは、一般的に、個体の少なくとも1つの組織(例えば、表1に示される組織)において行われ、そして多数の組織または同じ組織の異なるサンプルの評価を含み得る。この方法は、配列決定した遺伝子の配列を、既知の癌遺伝子(すなわち、野生型遺伝子)の配列と比較して、ファミリーメンバー、ホモログ、変異体、または改変体の存在を決定する工程を包含し得る。次いで、この遺伝子の全てまたは一部の配列を、既知の癌遺伝子の配列と比較して、任意の差異が存在するか否かを決定し得る。これは、多数の既知の相同性プログラム(例えば、BLAST、Bestfitなど)を用いて行われる。本発明の癌遺伝子と既知の癌遺伝子との間の配列の差異の存在は、本明細書中で概説されるように、疾患状態または疾患状態についての傾向に関連する。

30

【0378】

好ましい実施形態において、これらの癌遺伝子は、ゲノム中の癌遺伝子のコピー数を決定するためのプローブとして用いられる。これらの癌遺伝子は、癌遺伝子の染色体位置を決定するためのプローブとして用いられる。染色体位置のような情報は、特に、染色体異常(例えば、転座など)が癌遺伝子座において同定された場合、診断または予後診断における使用を見出す。

40

【0379】

(XIV.)キット/製造の物品)

本明細書中に記載される診断適用および治療適用における使用のために、キットもまた、本発明の範囲内である。そのようなキットは、キャリア、パッケージまたは1つ以上の容器(例えば、バイアル、チューブなど)を受容するように区画に分けられた容器を備え

50

得、これらの容器の各々は、この方法において用いられる1つの別個の元素を含む。例えば、容器は、検出可能に標識されているかまたは標識され得るプローブを含み得る。そのようなプローブは、それぞれ、図2に関連するタンパク質または図2の遺伝子またはメッセージに特異的な抗体またはポリヌクレオチドであり得る。この方法が、標的核酸を検出するための核酸ハイブリダイゼーションを使用する場合、このキットはまた、標的核酸配列を増幅するためのヌクレオチドを含む容器および/またはレポーター手段（例えば、レポーター分子（例えば、酵素標識、蛍光標識、または放射標識）に結合したビオチン結合タンパク質（例えば、アビジンまたはストレプトアビジン））を含む容器も有し得る。このキットは、図2または図3におけるアミノ酸配列の全てもしくは一部またはこれらのアナログ、あるいはそのようなアミノ酸配列をコードする核酸分子を含み得る。

10

【0380】

本発明のキットは、代表的に、上記の容器および商業的立場およびの使用者の立場から所望される物質（緩衝液、希釈液、ろ紙、針、シリンジ；キャリア、パッケージ、容器、バイアルおよび/またはチューブ、内容物を列挙したラベル、および/または使用のための指示書、ならびに使用のための指示書を有するパッケージ挿入物）を含む1つ以上の他の容器を含む。

【0381】

ラベルは、容器上に存在して、この組成物が特定の治療または非治療適用（例えば、診断適用または研究適用）に用いられることを示し得、そしてインビボまたはインビトロでの使用（例えば、本明細書中に記載される使用）のための指示を示し得る。指示および/または他の情報はまた、このキットと共にまたはこのキット上に備えられた挿入物またはラベル上に含まれ得る。

20

【0382】

用語「キット」および「製造の物品」は、類義語として用いられ得る。

【0383】

本発明の別の実施形態において、組成物（例えば、アミノ酸配列、低分子、核酸配列、および/または抗体（例えば、表1に示されるような組織の新形成の診断、予後診断、予防および/または処置のために有用な物質））を備える製造の物品が提供される。製造の物品は、代表的に、少なくとも1つの容器および少なくとも1つのラベルを備える。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管が挙げられる。これらの容器は、種々の材料（例えば、ガラスまたはプラスチック）から形成され得る。この容器は、アミノ酸配列、低分子、核酸配列、および/または抗体を保持し得、1つの実施形態において、この容器は、細胞のmRNA発現プロファイルの試験において用いるためのポリヌクレオチドを、この目的のために用いられる試薬とともに保持し得る。

30

【0384】

この容器は、代替的に、特定の状態を処置、診断、予後診断または予防するために有効な組成物を含み得、そして滅菌アクセスポートを備え得る（例えば、この容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により貫通可能なストッパーを有するバイアルであり得る）。この組成物中の活性因子は、161P2F10Bを特異的に結合し得、かつ161P2F10Bの機能を調節し得る抗体であり得る。

40

【0385】

このラベルは、容器上にあるか、または容器に添えられ得る。このラベルを形成する文字、番号または他の特徴が容器自体に形成されているかまたはエッチングされている場合、ラベルは、容器上にあり得；それがこの容器をまた保持する容器（*receptacle*）またはキャリアの中に存在する場合（例えば、パッケージ挿入物）、ラベルは、容器に添えられ得る。このラベルは、この組成物が、ある状態（例えば、表1に示す組織の新形成）を診断、処置、予防または予後診断するために用いられることを示し得る。製造の物品は、さらに、第二の容器を備え得、この第二の容器は、薬学的に受容可能な緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、および/またはデキストロース溶液）を含む。その容器は、商業的立場および使用者の立場から所望される他の物質（他の緩衝

50

液、希釈液、ろ紙、攪拌子、針、シリンジ、ならびに／または指示を有するパッケージ挿入物および／もしくは使用のための指示書)さらに備える。

【実施例】

【0386】

本発明の種々の局面が、以下の複数の実施例により記載および例示される。これらの実施例が、本発明の範囲を限定することは意図されない。

【0387】

(実施例1: STEAP 遺伝子の cDNA フラグメントの SSH 生成単離)

腎臓癌において過剰発現される遺伝子を単離するために、本発明者らは、腎臓癌患者組織由来の cDNA を使用する抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション (Suppression Subtractive Hybridization) (SSH) 手順を使用した。

10

【0388】

この 161P2F10B SSH cDNA 配列を、腎臓癌から正常な腎臓および9種の正常組織(胃、骨格筋、肺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、小腸および心臓)の混合物を除いたものからなるサブトラクションから誘導した。RT-PCRによって、161P2F10B cDNA を、腎臓癌プールにおいて高度に発現されると同定し、前立腺癌異種移植片プール、前立腺癌プール、結腸癌プール、肺癌プール、卵巣癌プール、乳癌プール、転移性癌プール、膵臓癌プール、2つの異なる前立腺癌リンパ節転移(VP1およびVP2)において、発現は低かった(図14)。

20

【0389】

182bpの161P2F10B SSH cDNA 配列は、ホスホジエステラーゼI /ヌクレオチドピロホスファターゼ3(PDNP3)のcDNAとマッチする。全長161P2F10B cDNA およびORFを、図2に記載し、そしてそのタンパク質配列を、図3に列挙する。

【0390】

(材料および方法)

(RNAの単離)

腫瘍組織を、Trizol 試薬(Life Technologies, Gibco BRL)中で、10ml/gの組織または10ml/10⁸の細胞を用いてホモジナイズして、総RNAを単離した。ポリA RNAを、QiagenのOligotex mRNA MiniおよびMidikitを使用して、総RNAから精製した。総RNAおよびmRNAを、分光光度分析(O.D. 260/280nm)によって定量し、そしてゲル電気泳動によって分析した。

30

【0391】

(オリゴヌクレオチド)

以下のHPLCで精製したオリゴヌクレオチドを使用した。

【0392】

【数 2】

DPNCDN (cDNA 合成プライマー):

5'TTTTGATCAAGCTT₃₀3' (配列番号 29)

Adaptor 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAG3' (配列番号 30)

3'GGCCCGTCCTAG5' (配列番号 31)

Adaptor 2:

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAG3' (配列番号 32)

3'CGGCTCCTAG5' (配列番号 33)

10

PCRプライマー1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (配列番号 34)

ネスト化プライマー(NP)1:

5'TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGA3' (配列番号 35)

20

ネスト化プライマー(NP)2:

5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3' (配列番号 36)

(抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション)

抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション (SSH) を使用して、前立腺癌において差次的に発現し得る遺伝子に対応する cDNA を同定した。この SSH 反応は、腎臓癌患者標本由来の cDNA を使用した。遺伝子 161P2F10B は、正常な腎臓および 9 種の正常な組織 (胃、骨格筋、肺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、小腸および心臓) を除いた腎臓癌患者組織に由来した。SSH DNA 配列 (図 1) を同定した。

【0393】

30

腎臓癌患者組織由来の cDNA を、「ドライバー」cDNA の供給源として使用し、一方、正常組織由来の cDNA を、「テスター」cDNA の供給源として使用した。テスター cDNA およびドライバー cDNA に対応する二重鎖 cDNA を、上記のようにして、CLONTECH の PCR - Select cDNA Subtraction Kit、およびプライマーとして 1 ng のオリゴヌクレオチド DPNCDN を使用して、関連組織から単離されたポリ (A) ⁺ RNA (2 μg) から合成した。第 1 および第 2 の鎖合成を、キットの使用者マニュアルプロトコル (CLONTECH プロトコル番号 PT1117-1、カタログ番号 K1804-1) に記載されるようにして行った。得られた cDNA を、37 °C で 3 時間、Dpn II で消化した。消化された cDNA を、フェノール/クロロホルム (1 : 1) で抽出し、そしてエタノールで沈殿させた。

40

【0394】

関連の組織供給源 (上記を参照のこと) (400 ng) 由来の、Dpn II で消化した cDNA (1 μl) を、5 μl の水中に希釈することによって、テスター cDNA を作製した。次いで、この希釈した cDNA (2 μl、160 ng) を、400 u の T4 DNA リガーゼ (CLONTECH) を使用して、別個のライゲーション反応で、10 μl の全容量で、16 °C で一晩、2 μl の Adaptor 1 および Adaptor 2 (10 μM) へとライゲーションした。1 μl の 0.2 M EDTA を用いて、72 °C で 5 分間加熱して、ライゲーションを終了させた。

【0395】

第 1 のハイブリダイゼーションを、ドライバー cDNA (1.5 μl、600 ng) を

50

、1.5 μ l (20 ng) の Adaptor 1 連結テスター cDNA および Adaptor 2 連結テスター cDNA を含む 2 つのチューブのそれぞれに添加することによって実施した。4 μ l の最終容量で、これらのサンプルを鉱油で覆い、MJ Research サーマルサイクラーで、98 で 1.5 分間変性し、次いで 68 で 8 時間ハイブリダイズさせた。次いで、2 つのハイブリダイゼーション産物を、追加の新たな変性ドライバー cDNA (1 μ l) と混合し、そして 68 で一晩ハイブリダイズさせた。次いで、この第 2 のハイブリダイゼーション産物を、20 mM Hepes (pH 8.3)、50 mM NaCl、0.2 mM EDTA (200 μ l) 中で希釈し、70 で 7 分間加熱し、そして -20 で貯蔵した。

【0396】

(SSH により作製した遺伝子フラグメントの PCR 増幅、クローニングおよび配列決定)

SSH 反応から得られた遺伝子フラグメントを増幅するために、2 回の PCR 増幅を行った。第 1 の PCR 反応において、希釈した最終ハイブリダイゼーション混合物 (1 μ l) を、1 μ l の PCR プライマー 1 (10 μ M)、0.5 μ l の dNTP 混合物 (10 μ M)、2.5 μ l の 10 \times 反応緩衝液 (CLONTECH) および 0.5 μ l の 50 \times Advantage cDNA ポリメラーゼ混合物 (CLONTECH) に、最終容量 25 μ l で添加した。PCR 1 を、以下の条件を使用して実施した。75 で 5 分間、94 で 25 秒、次いで、94 で 10 秒、66 で 30 秒、75 で 1.5 分を 27 サイクル。5 つの別個の第 1 の PCR 反応を、各実験について実施した。その生成物をプールし、そして水で 1:10 に希釈した。第 2 の PCR 反応について、このプールして希釈した第 1 の PCR 反応からの 1 μ l を、PCR プライマー 1 の代わりにプライマー NP1 および NP2 (10 μ M) を使用した以外は、PCR 1 について使用したのと同じ反応混合物に添加した。PCR 2 を、94 で 10 秒、68 で 30 秒および 72 で 1.5 分の 10~12 サイクルを使用して実施した。この PCR 生成物を、2% アガロースゲル電気泳動を使用して分析した。

【0397】

この PCR 生成物を、T/A ベクタークローニングキット (Invitrogen) を使用して、pCR2.1 に挿入した。形質転換した E. coli を、青/白選別およびアンピシリン選別に供した。白色コロニーを、選択して採取し、そして 96 ウェルプレートに配置し、そして液体培養液中で一晩増殖させた。挿入物を同定するために、PCR 増幅を、PCR 1 の条件を使用し、NP1 および NP2 をプライマーとして使用して、細菌培養液 1 ml について実施した。PCR 生成物を、2% アガロースゲル電気泳動を使用して分析した。

【0398】

細菌クローンを、96 ウェル様式で、20% グリセロール中で貯蔵した。プラスミド DNA を調製し、配列決定し、そして GenBank、dBest および NCBI-CGAP データベースの核酸相同性検索にかけた。

【0399】

(RT-PCR 発現分析)

Gibco-BRL Superscript Preamplification システムを使用するオリゴ (dT) 12-18 のプライミングを用いて、第 1 の鎖 cDNA を、1 μ g の mRNA から作製し得る。逆転写酵素と共に 42 で 50 分間インキュベートし、次いで、37 で 20 分間、RNAse H 処理を行うことを含む製造者のプロトコルを使用した。この反応が完了した後、その容量を、正規化の前に、水で 200 μ l まで増やし得た。16 の異なる正常なヒト組織由来の第 1 の鎖 cDNA を、Clontech から入手し得る。

【0400】

複数の組織由来の第 1 の鎖 cDNA の正規化を、以下のプライマー: 5' atatcgccgctcgtcgtcgaaca3' (配列番号 37) および 5' agccac

10

20

30

40

50

a c g c a g c t c a t t g t a g a a g g 3' (配列番号38)を使用して、 α -アクチンを増幅することにより実施した。第1の鎖cDNA(5 μ l)を、50 μ lの総容量(0.4 μ Mのプライマー、各々0.2 μ MのdNTP、1 \times PCR緩衝液(Clontech, 10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、pH8.3)および1 \times Klentag DNAポリメラーゼ(Clontech)を含む)で増幅した。5 μ lのPCR反応物を、18サイクル、20サイクルおよび22サイクルで取り出し、そしてアガロースゲル電気泳動に使用し得る。PCRを、MJ Researchサーマルサイクラーを使用して、以下の条件下で実施した：最初の変性工程が、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、続いて、94 $^{\circ}$ Cで15分間、65 $^{\circ}$ Cで2分間、72 $^{\circ}$ Cで5秒間を18サイクル、20サイクルおよび22サイクルであり得る。72 $^{\circ}$ Cでの最後の伸長工程を、2分間行った。アガロースゲル電気泳動の後、複数の組織由来の283bpの α -アクチンのバンドのバンド強度を、目視検査により比較した。第1の鎖cDNAの希釈因数を、計算して、22サイクルのPCR後の全ての組織において等しい α -アクチンバンド強度を得た。22サイクルのPCR後の全ての組織において、等しいバンド強度を達成するために、3ラウンドの正規化が必要であり得る。

10

【0401】

161P2F10B遺伝子の発現レベルを決定するために、5 μ lの正規化した第1の鎖cDNAを、26サイクルおよび30サイクルの増幅を使用するPCRによって分析した。半定量的発現分析を、軽いバンド強度を与えるサイクル数において、PCR産物を比較することによって達成し得る。

20

【0402】

代表的なRT-PCR発現分析を、図14に示す。RT-PCR発現分析を、複数のサンプル由来の組織のプールを使用して作製した第1の鎖cDNAについて実施した。このcDNAを、 α -アクチンPCRを使用して正規化して示した。161P2F10Bの強い発現を、腎臓癌プールにおいて観察した。VP1、前立腺癌異種移植片プール、前立腺癌プール、および結腸癌プールにおいてもまた、発現を検出した。VP2、肺癌プール、卵巣癌プール、乳癌プール、転移プール、膵臓癌プール、および異なる2つの前立腺癌リンパ節転移において、低い発現を観察した。

【0403】

(実施例2：全長161P2F10BコードcDNAの単離)

30

腎臓癌に關与する遺伝子を単離するために、腎臓癌患者標本を使用して実験を行った。遺伝子161P2F10Bを、正常な腎臓と9の正常な組織(胃、骨格筋、肺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、小腸および心臓)のカクテルの混合から差し引いた腎臓癌標本からなるサブトラクションから誘導した。SSH DNA配列(図1)を、161P2F10Bと呼ぶ。cDNAクローン161P2F10Bを、腎臓癌標本からクローニングした(図2および3)。161P2F10Bは、遺伝子ENPP3に対して相同性を示した。161P2F10BとENPP3とのアミノ酸整列を、図4に示す(例えば、Buhringら、Blood 97:3303-3305(2001)もまた参照のこと)。

【0404】

(実施例3：161P2F10Bの染色体マッピング)

40

染色体の位置決定は、疾患の病因における遺伝子と関連し得る。いくつかの染色体マッピングアプローチが利用可能であり、これには、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)、ヒト/ハムスター放射線ハイブリッド(RH)パネル(Walterら、1994; Nature Genetics 7:22; Research Genetics, Huntsville A1)、ヒト-げっ歯類体細胞ハイブリッドパネル(例えば、Coriell Institute (Camden, New Jersey)から入手可能なようなもの)、および配列決定されそしてマッピングされたゲノムクローンに対するBLAST相同性を使用するゲノムビューアー(NCBI, Bethesda, Maryland)が挙げられる。

【0405】

50

161P2F10Bは、161P2F10B配列およびNCBI BLASTツール(ワールドワイドウェブ(.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs)にある)を使用して、染色体6q22にマッピングする。

【0406】

(実施例4:161P2F10Bの発現分析)

正常組織 対 患者癌組織における161P2F10Bの発現を比較するために、RT-PCR実験を、正常組織および患者癌組織を使用して実施した(図14)。第1の鎖cDNAを、正常胃、正常脳、正常心臓、正常肝臓、正常骨格筋、正常精巣、正常前立腺、正常膀胱、正常腎臓、正常結腸、正常肺、正常膵臓、および前立腺癌患者、膀胱癌患者、腎臓癌患者、結腸癌患者、肺癌患者、膵臓癌患者由来の癌標本のプール、前立腺癌異種移植片(LAPC-4AD、LAPC-4AI、LAPC-9ADおよびLAPC-9AI)のプール、ならびに2人の患者のリンパ節に対する前立腺転移のプールから作製した。正規化をアクチンに対するプライマーを使用してPCRによって実施した。161P2F10Bに対するプライマーを使用する半定量的PCRを、26サイクルおよび30サイクルの増幅で行った。サンプルをアガロースゲル上で電気泳動し、そしてPCR産物を、AlphaImagerソフトウェアを使用して定量化した。結果は、試験された全ての正常組織と比較して、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、結腸癌、肺癌、膵臓癌、骨癌、リンパ腫癌、子宮癌、において強い発現を示す。強い発現は、異種移植片プールおよびリンパ節標本に対する前立腺転移においても検出された。

【0407】

図15および表LIXは、腎臓癌明細胞癌腫(A)、腎臓癌乳頭状癌(B)、および子宮癌患者標本(C)において、161P2F10Bの発現を示す。患者標本から第1鎖cDNAを調製した。正規化を、アクチンに対するプライマーを使用するPCR産物によって実施した。161P2F10Bに対するプライマーを使用する半定量的PCRを、26サイクルおよび30サイクルの増幅で行った。サンプルをアガロースゲル上で電気泳動し、そしてPCR産物を、AlphaImagerソフトウェアを使用して定量化した。発現を、非存在、低、中程度、または強いとして記録した。結果は、94.7%の明細胞腎臓癌、62.5%の乳頭状腎臓細胞癌、および61.5%の子宮癌において、161P2F10Bの発現を示す。

【0408】

正常組織における161P2F10Bの制限された発現、ならびに、腎臓癌、腎臓癌転移、および前立腺、膀胱、結腸、肺、膵臓、骨、リンパ腫、子宮、乳房および卵巣の癌において検出されるアップレギュレーションは、161P2F10Bが、ヒト癌に対する潜在的な治療標的および診断マーカーであることを示唆する。

【0409】

(実施例5:161P2F10Bの転写改変体)

転写物改変体は、選択的転写または選択的スプライシングによる同一遺伝子からの成熟mRNAの改変体である。選択的転写産物は、同一遺伝子からの転写産物であるが、異なる点で転写を開始する。スプライシング改変体は、同一転写産物から差示的にスプライシングされたmRNA改変体である。真核生物において、複数のエキソンを有する遺伝子(multi-exon gene)が、ゲノムDNAから転写される場合、最初のRNAがスプライシングされて、エキソンのみを有しかつアミノ酸配列への翻訳に使用される機能的mRNAを産生する。従って、所定の遺伝子は、0から多くの選択的転写産物を有し得、そして各転写産物は、0から多くのスプライシング改変体を有し得る。各転写産物改変体は、独特のエキソン構成(makeup)を有し、そしてオリジナルの転写産物由来の異なるコード部分および/または非コード部分(5'末端または3'末端)を有し得る。転写産物改変体は、同一または同様の機能を有する同様または異なるタンパク質をコードしても、異なる機能を有するタンパク質をコードしてもよく、そして同一の時点で同一組織に発現しても、同一の時点で異なる組織に発現しても、異なる時点で同一の組織に発

現しても、異なる時点で異なる組織に発現してもよい。転写産物改変体によりコードされるタンパク質は、同様または異なる細胞内局在または細胞外局在（例えば、分泌型対細胞内）を有し得る。

【0410】

転写産物改変体は、当該分野において受容された種々の方法によって同定される。例えば、選択的な転写産物およびスプライシング改変体は、全長クローニング実験によって、または全長転写産物およびEST配列の使用によって、同定される。第1に、全てのヒトESTを、互いに直接的または間接的に同一性を示すクラスターにグループ化した。第2に、同一クラスター中のESTをさらに、サブクラスターにグループ化し、そしてコンセンサス配列に集合させた。オリジナルの遺伝子配列を、コンセンサス配列または他の全長配列と比較する。各コンセンサス配列は、その遺伝子についての潜在的なスプライシング改変体である。全長クローニングではない改変体が同定された場合でさえ、その改変体のその部分は、当該分野において公知の技術を使用する抗原生成および全長スプライシング改変体のさらなるクローニングに非常に有用である。

10

【0411】

さらに、ゲノム配列に基づいて転写産物改変体を同定するコンピュータープログラムが当該分野において利用可能である。ゲノムベースの転写産物改変体同定プログラムとしては、FgenesH(A. SalamovおよびV. Solovyev, "Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA," Genome Research, 2000 April; 10(4): 516-22); Grail(URL compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm)およびGenScan(URL genes.mit.edu/GENSCAN.html)が挙げられる。スプライシング改変体同定プロトコルの一般的議論については、例えば、以下を参照のこと: Southan, C., A genomic perspective on human proteases, FEBS Lett. 2001 Jun 8; 498(2-3): 214-8; de Souza, S. J.ら, Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags, Proc. Natl Acad Sci USA. 2000 Nov 7; 97(23): 12690-3。

20

30

【0412】

転写産物改変体のパラメーターをさらに確認するために、種々の技術（例えば、全長クローニング、タンパク質確認(proteomic validation)、PCRベースの確認、および5' RACE確認など）が当該分野において利用可能である（例えば、タンパク質確認: Brennan, S. O.ら, Albumin banks peninsula: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry, Biochem Biophys Acta. 1999 Aug 17; 1433(1-2): 321-6; Ferranti Pら, Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, Eur J Biochem. 1997 Oct 1; 249(1): 1~7を、PCRベースの確認については: Wellmann Sら, Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor(VEGF) splice variants by LightCycler technology, Clin Chem. 2001 Apr; 47(4): 654-60; Jia, H. P.ら, Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach, Gene. 2001 Jan 24; 263(1-2): 211~8を、PCRベースの確認お

40

50

よび5' RACE確認については: Bringle, K. E.ら, Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms, Biochem Biophys Acta. 1997 Aug 7; 1353(2): 191-8を参照のこと)。

【0413】

ゲノム領域が癌において調節されることは、当該分野において公知である。遺伝子マップに対するゲノム領域が特定の癌において調節される場合、その遺伝子の選択的な転写産物またはスプライシング改変体もまた調節される。161P2F10Bは癌に関連する特定の発現プロフィールを有するということが、本明細書中に開示される。161P2F10Bの選択的な転写産物およびスプライシング改変体はまた、同一または異なる組織における癌に関与し得、従って腫瘍関連マーカー/抗原として働く。

10

【0414】

全長遺伝子およびEST配列を使用して、2つの転写改変体が、同定され、161P2F10B v. 6および161P2F10B v. 7として指定された。161P2F10B v. 1と比較して、転写改変体161P2F10B v. 6は、改変体161P2F10B v. 1転写物の5'開始部位に対して余分な40塩基を有し、そして異なる3'末端部分を有し、これは、ヒトゲノムの現在のバージョンにおける他のエキソンと同じ染色体上にある。改変体161P2F10B v. 7は、改変体161P2F10B v. 1の位置121と122との間に130塩基を挿入した。理論的には、空間的順序において、エキソンの各々の異なる組合せ(例えば、エキソン2およびエキソン3)は、潜在的なスプライシング改変体である。ヒトゲノムの現在のバージョンにおける染色体領域の不正確な構築に起因して、転写構造は、計算により導出され得ない。

20

【0415】

表LI~LVIIIは、種々の塩基による改変体について記載される。表LIおよびLVは、転写改変体のヌクレオチド配列を示す。表LIIおよびLVIは、転写改変体と161P2F10B v. 1の核酸配列とのアライメントを示す。表LIIIおよびLVIIは、同定されたリーディングフレーム方向について転写改変体のアミノ酸翻訳を説明する。表LIVおよびLVIIIは、スプライシング改変体によってコードされるアミノ酸配列と161P2F10B v. 1のアミノ酸配列とのアライメントを示す。

30

【0416】

(実施例6: 161P2F10Bの単一ヌクレオチド多型)

単一ヌクレオチド多型(SNP)は、ヌクレオチド配列中の特定の位置での単一塩基対改変である。ゲノムの特定の点で、可能性のある4つのヌクレオチド塩基対(A/T、C/G、G/CおよびT/A)が存在する。遺伝子型とは、個々のゲノム中の1つ以上の位置の塩基対配列をいう。ハプロタイプとは、しばしば、1つの遺伝子の文脈でまたはいくつかの密接に連結する遺伝子の文脈で、同一のDNA分子(高等生物における染色体)上の1つより多い変更された位置の塩基対構成をいう。cDNA上に生じるSNPは、cSNPと呼ばれる。これらのcSNPは、その遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸を変化し得、従ってそのタンパク質の機能を変化し得る。いくつかのSNPは、遺伝的疾患を生じ、そして他は、個体間の表現型および環境因子(食餌および薬物を含む)に対する応答における定量的バリエーションに寄与する。従って、SNPおよび/または対立遺伝子の組み合わせ(ハプロタイプと呼ばれる)は、多くの適用(遺伝的疾患の診断、薬物反応および投薬量の決定、疾患に応答性の遺伝子の同定、および個体間での遺伝的関係を含む)を有する(P. Nowotny, J. M. KwonおよびA. M. Goate, 「SNP analysis to dissect human traits」Curr. Opin. Neurobiol. 2001 Oct; 11(5): 637-641; M. PirmohamedおよびB. K. Park, 「Genetic susceptibility to adverse drug reactions」Trends Pharmacol. Sci. 2001 Jun; 22(6): 298-305;

40

50

J. H. Riley, C. J. Allan, E. Lai および A. Roses, 「The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes」 *Pharmacogenomics*. 2000 Feb; 1(1): 39-47; R. Judson, J. C. Stephens および A. Windemuth, 「The predictive power of haplotypes in clinical response」 *Pharmacogenomics*. 2000 feb; 1(1): 15-26)。

【0417】

SNPは、当該分野において受容された種々の方法によって同定される (P. Bean, 「The promising voyage of SNP target discovery」 *Am. Clin. Lab.* 2001 Oct-Nov; 20(9): 18-20; K. M. Weiss, 「In search of human variation」 *Genome Res.* 1998 Jul; 8(7): 691-697; M. M. She, 「Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies」 *Clin. Chem.* 2001 Feb; 47(2): 164-172)。例えば、SNPは、ゲルベースの方法 (例えば、制限フラグメント長多型 (RFLP) および変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE)) によって多型を示すDNAフラグメントを配列決定することによって同定される。これらはまた、異なる個体からプールされたDNAサンプルの直接配列決定によってか、または異なるDNAサンプルからの配列を比較することによって、見出され得る。公的データベースおよび私的データベースにおける配列データの迅速な蓄積を用いて、コンピュータープログラム (Z. Gu, L. Hillier および P. Y. Kwok, 「Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace」 *Hum. Mutat.* 1998; 12(4): 221-225) を使用して配列を比較することによってSNPが見出され得る。SNPが確認され得、そして個々の遺伝型またはハプロタイプは、直接配列決定およびハイスループットマイクロアレイを含む種々の方法によって決定され得る (P. Y. Kwok, 「Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms」 *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001; 2: 235-258; M. Kokoris, K. Dix, K. Moynihan, J. Mathis, B. Erwin, P. Grass, B. Hines および A. Duesterhoeft, 「High-throughput SNP genotyping with the Masscode system」 *Mol. Diagn.* 2000 Dec; 5(4): 329-340)。上記の方法を使用して、4つのSNPは、元の転写物 161P2F10B v. 1において、位置408 (A/G)、2502 (A/G)、2663 (A/G) および3233 (A/C) において同定した。代替的対立遺伝子を有する転写物またはタンパク質は、それぞれ、161P2F10B v. 2、161P2F10B v. 3、161P2F10B v. 4、および161P2F10B v. 5として指定される。図10は、SNP 2663 (A/G) 変体の概略的アライメントを示す。図11は、ヌクレオチド変体に対応する、タンパク質変体の概略的アライメントを示す。変体1と同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列変体は、図11に示されない。ここでは、別に示されているが、SNPのこれらの対立遺伝子は、異なる組合せ (ハプロタイプ) で、そして転写変体のいずれか1つ (例えば、161P2F10B v. 7) (SNPの配列の内容を含む) で、存在し得る。

【0418】

(実施例7: 原核生物系における組換え161P2F10Bの産生)

原核生物細胞において組換え161P2F10Bを発現させるために、全長または部分長の161P2F10B cDNA配列を、当該分野において公知の種々の発現ベクター

10

20

30

40

50

のいずれか1つ中にクローニングし得る。161P2F10Bの以下の領域の1つ以上を、これらの構築物中に発現させる：アミノ酸1～875；あるいは、161P2F10B、その改変体もしくはアナログ由来の任意の8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、またはそれより多く連続するアミノ酸。

【0419】

(A. インビトロでの転写構築物および翻訳構築物)

pCRII：RNAインサイチュ研究のための161P2F10BのセンスおよびアンチセンスのRNAプローブを作製するために、pCRII構築物(Invitrogen, Carlsbad, CA)を作製する(これは、161P2F10B cDNAの全体またはフラグメントのいずれかをコードする)。pCRIIベクターは、挿入物に隣接するSp6プロモーターおよびT7プロモーターを有し、RNAインサイチュハイブリダイゼーション実験におけるプローブとして使用するための161P2F10B RNAの転写を駆動する。これらのプローブは、RNAレベルでの161P2F10Bの細胞発現および組織発現を分析するために用いられる。161P2F10B遺伝子のcDNAアミノ酸コード領域を表す、転写された161P2F10B RNAを、161P2F10Bタンパク質を合成するためのTnTTM Coupled Reticulolysate System (Promega, Corp., Madison, WI)のようなインビトロでの翻訳系において用いる。

【0420】

(B. 細菌構築物)

pGEX構築物：細菌において組換え161P2F10Bタンパク質(これは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)タンパク質に融合される)を産生するために、161P2F10B cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一部を、pGEX-6P-1またはpGEXファミリーの任意の他のGST-融合ベクター(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)中にクローニングすることによって、GST遺伝子に融合させる。これらの構築物は、アミノ末端で融合したGSTおよびカルボキシル末端の6つのヒスチジンエピトープ(6×His)を有する組換え161P2F10Bタンパク質配列の制御された発現を可能にする。このGSTおよび6×Hisタグは、適切なアフィニティマトリクスを用いて誘導された細菌からの組換え融合タンパク質の精製を可能にし、そして抗GST抗体および抗His抗体を用いる融合タンパク質の認識を可能にする。6×Hisタグは、例えば、オープンリーディングフレーム(ORF)の3'末端のクローニングプライマーへの6つのヒスチジンコドンの付加により作製される。タンパク質切断部位(例えば、pGEX-6P-1中のPreScissionTM認識部位)を用いて、161P2F10B関連タンパク質からGSTタグの切断を可能にし得る。アンピシリン耐性遺伝子およびpBR322起点は、E.coli中でのpGEXプラスミドの選択および維持を可能にする。

【0421】

pMAL構築物：細菌において、マルトース結合タンパク質(MBP)に融合される組換え161P2F10Bタンパク質を産生するために、161P2F10B cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一部は、pMAL-c2XベクターおよびpMAL-p2Xベクター(New England Biolabs, Beverly, MA)へとクローニングすることによりMBP遺伝子に融合される。これらの構築物は、アミノ末端で融合したMBPおよびカルボキシル末端の6×Hisエピトープタグを有する組換え161P2F10Bタンパク質配列の制御された発現を可能にする。このMBPおよび6×Hisタグは、適切なアフィニティマトリクスを用いて誘導された細菌からの組換え融合タンパク質の精製を可能にし、そして抗MBP抗体および抗His抗体を用いる融合タンパク質の認識を可能にする。6×Hisエピトープタグは、3'クローニングプライマーへの6つのヒスチジンコドンの付加により作製される。Xa因子認識部位は、161

10

20

30

40

50

P 2 F 1 0 Bからのp M A Lタグの切断を可能にする。p M A L - c 2 Xベクターおよびp M A L - p 2 Xベクターは、それぞれ、細胞質または周辺質において組換えタンパク質を発現するように最適化される。周辺質発現は、ジスルフィド結合を有するタンパク質の折畳みを増大させる。

【 0 4 2 2 】

p E T構築物：細菌細胞において、1 6 1 P 2 F 1 0 Bを発現させるために、1 6 1 P 2 F 1 0 B c D N Aタンパク質コード配列の全てまたは一部は、p E Tファミリーのベクター（N o v a g e n , M a d i s o n , W I）へとクローニングされる。これらのベクターは、可溶性を増大させるタンパク質（例えば、N u s Aおよびチオレドキシン（T r x））、および組換えタンパク質の精製および検出を補助するエピトープタグ（例えば、6 x H i sおよびS - T a g ^{T M}）への融合を用いておよび用いずに、細菌における組換え1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質の緊密に制御された発現を可能にする。例えば、構築物を、p E T N u s A融合系4 3 . 1を利用して作製して、その結果、1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質の領域が、N u s Aへのアミノ末端融合物として発現される。

10

【 0 4 2 3 】

（ C . 酵母構築物 ）

p E S C構築物：組換えタンパク質の作製および機能の研究のために、酵母種S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a eにおいて1 6 1 P 2 F 1 0 Bを発現させるために、1 6 1 P 2 F 1 0 B c D N Aタンパク質コード配列の全てまたは一部を、p E S Cファミリーのベクター（これらの各々は、H I S 3、T R P 1、L E U 2、およびU R A 3という4つの選択マーカーの内1つを含む）（S t r a t a g e n e , L a J o l l a , C A）中にクローニングする。これらのベクターは、同じ酵母細胞中にF l a g ^{T M}またはM y cエピトープタグのいずれかを含む、2つまでの異なる遺伝子またはクローニングされた配列の同じプラスミドからの、制御された発現を可能にする。この系は、1 6 1 P 2 F 1 0 Bのタンパク質 - タンパク質相互作用を確認するために有用である。さらに、酵母における発現は、真核生物細胞において発現される場合に見出される翻訳後修飾に類似の翻訳後修飾（例えば、グリコシル化およびリン酸化）を生じる。

20

【 0 4 2 4 】

p E S P構築物：酵母種S a c c h a r o m y c e s p o m b eにおいて1 6 1 P 2 F 1 0 Bを発現させるために、1 6 1 P 2 F 1 0 B c D N Aタンパク質コード配列の全てまたは一部を、p E S Pファミリーのベクターにクローニングする。これらのベクターは、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、組換えタンパク質の精製を補助するG S Tへ融合される、1 6 1 P 2 F 1 0 Bタンパク質配列の制御された高レベル発現を可能にする。F l a g ^{T M}エピトープタグは、抗F l a g ^{T M}抗体を用いる組換えタンパク質の検出を可能にする。

30

【 0 4 2 5 】

（ 実施例 8 : 高等真核生物系における組換え 1 6 1 P 2 F 1 0 B の 産 生 ）

（ A . 哺乳動物構築物 ）

真核生物細胞において組換え1 6 1 P 2 F 1 0 Bを発現させるために、1 6 1 P 2 F 1 0 B c D N A配列の全長または部分長を、当該分野で公知の種々の発現ベクターのいずれか1つの中にクローニングし得る。1 6 1 P 2 F 1 0 Bの以下の領域の1つ以上が、これらの構築物において発現される：アミノ酸1 ~ 8 7 5 ; または1 6 1 P 2 F 1 0 B、これらの改変体もしくはアナログ由来の任意の8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30以上の連続するアミノ酸。

40

【 0 4 2 6 】

これらの構築物を、2 9 3 T細胞のような広範な種々の哺乳動物細胞のいずれか1つの中にトランスフェクトした。トランスフェクトされた2 9 3 T細胞溶解物を、本明細書中に記載される抗1 6 1 P 2 F 1 0 Bポリクローナル血清およびモノクローナル抗体を用いてプローブした。

50

【0427】

p c D N A 3 . 1 / M y c H i s 構築物：哺乳動物細胞において161P2F10Bを発現させるために、コンセンサスKozak翻訳開始部位を有する161P2F10Bの、161P2F10B ORFまたはその一部を、p c D N A 3 . 1 / M y c H i s V e r s i o n A (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 中にクローニングした。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターから駆動される。この組換えタンパク質は、そのカルボキシル末端に融合されたmycエピトープおよび6xHisエピトープを有する。p c D N A 3 . 1 / M y c H i s ベクターはまた、ラージT抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および単純なベクターレスキューのためのSV40起源と共に、mRNA安定性を増大するための、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列を含む。ネオマイシン耐性遺伝子を用い得る。なぜならば、ネオマイシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起源は、E. coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にするからである。

10

【0428】

161P2F10Bをコードするp c D N A 3 . 1 / m y c H i s を、293T細胞中にトランスフェクトした。細胞を24時間後に収集し、そして分析したところ、p c D N A 3 . 1 / m y c H i s ベクター由来の161P2F10Bの細胞表面発現を示した(図29)。

【0429】

p T a g 5 : 161P2F10Bの161P2F10B ORF、またはその一部を、p T a g - 5 中にクローニングする。このベクターは、p A P t a g に類似するが、アルカリホスファターゼ融合物を含まない。この構築物は、アミノ末端I g G シグナル配列、ならびに検出およびアフィニティー精製を容易にするカルボキシル末端のmycおよび6xHisエピトープタグを有する、161P2F10Bタンパク質を産生する。得られた組換え161P2F10Bタンパク質を、トランスフェクトした哺乳動物細胞の培地への分泌のために最適化し、そして免疫原またはリガンドとして使用して、161P2F10Bタンパク質と相互作用するリガンドまたはレセプターのようなタンパク質を同定した。タンパク質発現は、CMVプロモーターから駆動される。ベクター中に存在するゼオシン(Zeocin)耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子は、E. coli中のプラスミドの選択を可能にする。図31および32は、161P2F10Bを発現する可溶性p T a g 5 の発現および酵素活性を示す。

20

30

【0430】

P s e c F c : 161P2F10Bの161P2F10B ORF、またはその一部をまた、p s e c F c 中にクローニングする。このp s e c F c ベクターをヒト免疫グロブリンG1(IgG)Fc(ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域)をp S e c T a g 2 (I n v i t r o g e n , C a l i f o r n i a) 中にクローニングすることにより、アセンブリした。この構築物は、161P2F10Bタンパク質のアミノ末端のI g G 1 F c 融合物を生成した。マウスI g G 1 F c 領域を利用する161P2F10B融合物もまた生成され、発現された。得られた組換え161P2F10Bタンパク質を、トランスフェクトした哺乳動物細胞の培地への分泌について最適化し、そして免疫原としてか、または161P2F10Bタンパク質と相互作用するリガンドまたはレセプターのようなタンパク質を同定するために用い得る。タンパク質発現は、CMVプロモーターから駆動される。ベクター中に存在するハイグロマイシン耐性遺伝子は、組換えタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子は、E. coli中のプラスミドの選択を可能にする。

40

【0431】

p S R 構築物：161P2F10Bを発現する哺乳動物細胞株を、構成的に作製するために、161P2F10Bの161P2F10B ORFまたはその一部を、p S R

50

構築物中にクローニングする。両栄養性のレトロウイルスおよび環境栄養性のレトロウイルスを、それぞれ、293T-10A1パッケージング株中へのpSR構築物のトランスフェクション、またはpSRおよびヘルパープラスミド(欠失したパッケージング配列を含む)の293細胞中への共トランスフェクションにより作製した。このレトロウイルスを用いて、種々の哺乳動物細胞株を感染させ、クローニングされた遺伝子である161P2F10Bの宿主細胞株への組みこみを生じさせる。タンパク質発現は、長い末端反復配列(LTR)から駆動される。ベクター中に存在するネオマイシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E.coli中のプラスミドの選択および維持を可能にする。その後、このレトロウイルスベクターを、例えば、NIH 3T3細胞、293 Rat-1細胞または、Cakiおよび769細胞のような腎臓癌細胞株を用いる、種々の細胞株の感染および産生のために用いた。図16および30は、それぞれ、CakiおよびNIH 3T3細胞中のpSRa構築物由来の161P2F10Bの細胞表面発現を示す。

10

【0432】

さらなるpSRa構築物を作製した。これらは、161P2F10Bの3つの異なる変異体をコードする。第1の変異体はD80Eであり、80位のRGDドメインのDアミノ酸残基がEに変換されている。他の変異体は、161P2F10Bの活性部位の変異体であり、205位のT205アミノ酸残基が、A(T205A)またはS(T205S)のいずれかに変換されている。この3つの変異pSRa構築物を、293T細胞およびCaki腎臓癌細胞のような種々の哺乳動物細胞株中にトランスフェクトした。抗161P2F10Bモノクローナル抗体を使用して発現を確認し、そしてホスホジエステラーゼ酵素活性を試験した(図30)。

20

【0433】

p cDNA 4 / HisMax構築物：哺乳動物細胞において161P2F10Bを発現させるために、161P2F10Bの、161P2F10B ORFまたはその一部を、p cDNA 4 / HisMax Version A (Invitrogen, Carlsbad, CA)中にクローニングした。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターおよびSP16翻訳エンハンサーから駆動される。この組換えタンパク質は、アミノ末端に融合されたXpressTMおよび6つのヒスチジン(6xHis)エピトープを有する。このp cDNA 4 / HisMaxベクターはまた、ラージT抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および単純なベクターレスキューのためのSV40起源と共に、mRNA安定性を増大するための、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列を含む。ゼオシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起源は、E.coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にする。

30

【0434】

p cDNA 3.1 / CT-GFP-TOPO構築物：哺乳動物細胞において161P2F10Bを発現し、そして蛍光を用いる組換えタンパク質の検出を可能にするために、コンセンサスKozak翻訳開始部位を有する161P2F10Bの、161P2F10B ORFまたはその一部を、p cDNA 3.1 / CT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA)中にクローニングする。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターから駆動される。組換えタンパク質は、非侵襲的にインピボでの検出および細胞生物学研究を容易にする、カルボキシル末端に融合された緑色蛍光タンパク質(GFP)を有する。p cDNA 3.1 / CT-GFP-TOPOベクターはまた、ラージT抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および単純なベクターレスキューのためのSV40起源と共に、mRNA安定性を増大するための、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列を含む。ネオマイシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起源は、E.coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にする。アミノ末端GFP融合物を有するさらなる構築物を、161P2F10Bタンパク質の全体

40

50

の長さにわたる p c D N A 3 . 1 / N T - G F P - T O P O 中に作製する。

【 0 4 3 5 】

P A P t a g : 1 6 1 P 2 F 1 0 B の、1 6 1 P 2 F 1 0 B O R F、またはその一部を、p A P t a g - 5 (G e n H u n t e r C o r p . N a s h v i l l e , T N) 中にクローニングする。この構築物は、1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質のカルボキシル末端のアルカリホスファターゼ融合物（これは、一方で、アミノ末端に I g G シグナル配列を融合している）を生成する。アミノ末端 I g G シグナル配列を有するアルカリホスファターゼが 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質のアミノ末端に融合されている構築物もまた作製する。得られた組換え 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質は、トランスフェクトされた哺乳動物細胞の培地への分泌について最適化され、そして 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質と相互作用するリガンドまたはレセプターのようなタンパク質を同定するために用いられ得る。タンパク質発現は、C M V プロモーターから駆動され、そして組換えタンパク質はまた、検出および精製を容易にするカルボキシル末端で融合された m y c および 6 x H i s エピトープを含む。ベクター中に存在するゼオシン耐性遺伝子は、組換えタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子は、E . c o l i 中のプラスミドの選択を可能にする。

10

【 0 4 3 6 】

さらなるウイルスベクター：さらなる構築物を、ウイルス媒介送達および 1 6 1 P 2 F 1 0 B の発現のために作製する。1 6 1 P 2 F 1 0 B の高レベル発現につながる高ウイルス力価は、アデノウイルスベクターおよびヘルペスアンプリコンベクターのようなウイルス送達系において達成される。1 6 1 P 2 F 1 0 B コード配列またはそのフラグメントは、P C R により増幅され、そして A d E a s y シャトルベクター (S t r a t a g e n e) へとサブクローニングされる。組換えおよびウイルスパッケージングを、アデノウイルスベクターを作製するための製造業者の指示書に従って実施する。あるいは、1 6 1 P 2 F 1 0 B コード配列またはそのフラグメントは、H S V - I ベクター (I m g e n e x) へとクローニングされて、ヘルペスウイルスベクターを作製する。その後、このウイルスベクターを、P C 3 細胞、N I H 3 T 3 細胞、2 9 3 細胞または r a t - 1 細胞のような種々の細胞株の感染のために用いる。

20

【 0 4 3 7 】

調節された発現系：哺乳動物細胞における 1 6 1 P 2 F 1 0 B の発現を制御するために、1 6 1 P 2 F 1 0 B のコード配列またはその一部を、T - R e x S y s t e m (I n v i t r o g e n)、G e n e S w i t c h S y s t e m (I n v i t r o g e n)、および t i g h t l y - r e g u l a t e d E c d y s o n e S y s t e m (S t r a t a g e n e) のような調節された哺乳動物発現系中にクローニングする。これらの系は、組換え 1 6 1 P 2 F 1 0 B の時間依存効果および濃度依存効果の研究を可能にする。その後、これらのベクターは、P C 3 細胞、N I H 3 T 3 細胞、2 9 3 細胞、または r a t - 1 細胞のような種々の細胞株における 1 6 1 P 2 F 1 0 B の発現を制御するために用いられる。

30

【 0 4 3 8 】

(B . バキュロウイルス発現系)

バキュロウイルス発現系において組換え 1 6 1 P 2 F 1 0 B タンパク質を産生するために、1 6 1 P 2 F 1 0 B O R F、またはその一部を、バキュロウイルス移入ベクターである p B l u e B a c 4 . 5 (I n v i t r o g e n) (これは、N 末端に H i s タグを提供する) 中にクローニングする。具体的には、p B l u e B a c - 1 6 1 P 2 F 1 0 B は、ヘルパープラスミド p B a c - N - B l u e (I n v i t r o g e n) を用いて、S F 9 (S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a) 昆虫細胞へと共トランスフェクトされて、組換えバキュロウイルスを作製する（詳細については、I n v i t r o g e n の指示マニュアルを参照のこと）。次いで、バキュロウイルスを、細胞上清から収集し、そしてブランクアッセイにより精製する。

40

【 0 4 3 9 】

50

次いで、組換え161P2F10Bタンパク質を、精製したバキュロウイルスを用いる HighFive 昆虫細胞 (Invitrogen) の感染により、作製する。組換え161P2F10Bタンパク質を、抗161P2F10Bまたは抗Hisタグ抗体を用いて検出し得る。161P2F10Bタンパク質を、精製し、そして種々の細胞ベースのアッセイにおいて、または161P2F10Bに特異的なポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製するための免疫原として用い得る。

【0440】

(実施例9 抗原性プロフィールおよび二次構造)

図5、図6、図7、図8および図9は、161P2F10Bアミノ酸配列の5つのアミノ酸プロフィール(各評価は、Expasy分子生物学サーバのProtScaleウェブサイト(.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)にアクセスすることにより利用可能である)を図示する。

【0441】

これらのプロフィール: 図5、親水性、(Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828); 図6、ヒドロパシー、(Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-132); 図7、接触可能残基の%、(Janin J., 1979 Nature 277: 491-492); 図8、平均可撓性、(Bhaskaran R., および Ponnuswamy P.K. 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255); 図9、ターン(Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1: 289-294); および、必要に応じて、例えば、ProtScaleウェブサイトにあるような、当該分野で利用可能な他のプロフィールを用いて、161P2F10Bタンパク質の抗原領域を同定した。161P2F10Bの上記のアミノ酸プロフィールの各々を、分析のために以下のProtScaleパラメーターを用いて作製した: 1) 9のウィンドウサイズ; 2) ウィンドウセンターと比較したウィンドウエッジの100%ウェイト; および3) 0と1との間にあるように正規化されたアミノ酸プロフィール値。

【0442】

疎水性プロフィール(図5)、ヒドロパシープロフィール(図6)および接触可能残基の%のプロフィール(図7)を使用して、疎水性アミノ酸(すなわち、ヒドロパシープロフィールおよび接触可能残基の%のプロフィールにて値が0.5より大きく、ヒドロパシープロフィールにて値が0.5より小さい)のストレッチを決定した。そのような領域は、水性環境に曝される可能性があり、タンパク質表面上に存在する可能性があり、したがって、(例えば、抗体による)免疫認識に利用可能である。

【0443】

平均可撓性プロフィール(図8)およびターンプロフィール(図9)は、二次構造(例えば、シートおよびヘリックス)に拘束されていないアミノ酸(すなわち、ターンプロフィールおよび平均可撓性プロフィールにて値が0.5より大きい)のストレッチを決定する。そのような領域はまた、タンパク質に対して露出した部分である可能性が高く、従って、(例えば、抗体による)免疫認識に利用可能である。

【0444】

例えば、図5、図6、図7、図8、および/または図9に示されるプロフィールにより示される、161P2F10Bタンパク質の抗原性配列を使用して、免疫原(ペプチド、またはペプチドをコードする核酸のいずれか)を調製して、治療用および診断用の抗161P2F10B抗体を生成する。その免疫原は、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、または50個より長く連続する、161P2F10Bタンパク質由来の任意のアミノ酸、またはそれをコードする対応核酸であり得る。特に、本発明のペプチド免疫原は、以下

10

20

30

40

50

を含み得る：図5の疎水性プロフィールにおいて0.5を超える値を有するアミノ酸位置を含む、図2の少なくとも5個から、任意の整数の増分にて875までのアミノ酸のペプチド領域；図6のヒドロパシープロフィールにおいて0.5未満の値を有するアミノ酸位置を含む、図2の少なくとも5個から、任意の整数の増分にて875までのアミノ酸のペプチド領域；図7の接触可能残基の%のプロフィールにおいて0.5を超える値を有するアミノ酸位置を含む、図2の少なくとも5個から、任意の整数の増分にて875までのアミノ酸のペプチド領域；図8の平均可撓性プロフィールにおいて0.5を超える値を有するアミノ酸位置を含む、図2の少なくとも5個から、任意の整数の増分にて875までのアミノ酸のペプチド領域；および図9の α -ターンプロフィールにおいて0.5を超える値を有するアミノ酸位置を含む、図2の少なくとも5個から、任意の整数の増分にて875までのアミノ酸のペプチド領域。本発明のペプチド免疫原はまた、上記のいずれかをコードする核酸を含み得る。

10

【0445】

本発明の免疫原、ペプチド、または核酸はすべて、ヒト単位用量形態で実施され得るか、またはヒトの生理に適合する薬学的賦形剤を含む組成物により含有され得る。

【0446】

161P2F10Bの二次構造（すなわち、推定される α ヘリックス、伸長鎖、およびランダムコイルの存在および位置）は、HNN-Hierarchical Neural Network法（Guermeur, 1997, http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa__automat.pl?page=npsa_nn.html）（ExPasy分子生物学サーバ（world wide web URL: expasy.ch/tools/）からアクセスされる）を使用して、一次アミノ酸配列から推定される。この分析は、161P2F10Bが、31.31%の α ヘリックス、11.31%の伸長鎖、および57.37%のランダムコイルから構成されることを示す（図19A）。

20

【0447】

161P2F10B中の膜貫通ドメインの潜在的な存在についての分析を、ExPasy分子生物学サーバ（<http://www.expasy.ch/tools/>）からアクセスされる種々の膜貫通推定アルゴリズムを使用して実行した。これらのプログラムは、161P2F10B中の1つの膜貫通ドメインの存在を推定し、II型細胞表面タンパク質と一致する。図19に図示されるのは、TMpred推定プログラムを使用した分析の結果（図19B）およびTMHMM推定プログラムを使用した分析の結果（図19C）であり、膜貫通ドメインの位置を示す。

30

【0448】

（実施例10：161P2F10Bポリクローナル抗体の生成）

ポリクローナル抗体を、例えば、免疫因子および（所望される場合は）アジュバントの1回以上の注射によって、哺乳動物において惹起し得る。代表的には、その免疫因子および/またはアジュバントを、複数回の皮下注射または腹腔内注射によって、その哺乳動物中に注射する。全長161P2F10Bタンパク質で免疫することに加えて、アミノ酸配列分析に基づいて、抗原性でありかつ免疫される宿主の免疫系による認識に利用可能である特性を備える免疫原の設計において、コンピューターアルゴリズムが使用される（「抗原性プロフィール」と題する実施例を参照のこと）。そのような領域は、疎水性であり、可撓性であり、 α -ターン立体構造であり、そしてそのタンパク質の表面上に露出されていると推定される（例えば、161P2F10Bのそのような領域を示すアミノ酸プロフィールについて、図5、図6、図7、図8、または図9を参照のこと）。

40

【0449】

例えば、161P2F10Bの疎水性、可撓性、 α -ターン領域（多くの領域がアミノ酸45～870によりコードされる推定細胞外ドメインにおいて見出される）を含む、161P2F10B細菌組換え融合タンパク質または161P2F10B細菌組換え融合ペプチドを、New Zealand白色ウサギにおいてポリクローナル抗体を生成するた

50

めの抗原として使用する。例えば、このような領域としては、アミノ酸43～93、100～134、211～246、467～492、500～517、およびアミノ酸810～870が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、細胞外ドメイン全体(アミノ酸45～870)、またはそのドメインの半分(例えば、アミノ酸45～450およびアミノ酸451～870)をコードする組み換えタンパク質が生成される。161P2F10Bのソマトメジン-B様ドメイン(アミノ酸53～133)、触媒性ドメイン(アミノ酸158～538)、およびヌクレアーゼ様ドメイン(アミノ酸609～875)をコードする抗原もまた、これらの領域に特異的な抗体を生成するために作製される(Bollenら, 2000. Crit. Rev. Biochem. Mol. 35: 393-432)。理想的な抗体は、これらのドメインの非保存領域に対して惹起され、その結果、それらは、他の相同なヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼと交差反応しない。免疫される哺乳動物において免疫原性であることが公知のタンパク質に、その免疫因子を結合体化することが有用である。そのような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、およびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、161P2F10Bのアミノ酸500～517をコードするペプチドを、KLHに結合体化し、ウサギを免疫するために使用する。あるいは、その免疫因子は、161P2F10Bタンパク質、そのアナログまたは融合タンパク質のすべてもしくは一部を含み得る。例えば、161P2F10Bアミノ酸配列を、当該分野で周知の種々の融合タンパク質パートナーのいずれか1つに、組換えDNA技術を使用して融合し得る。(例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ化融合タンパク質およびHISタグ化融合タンパク質)そのような融合タンパク質を、適切な親和性マトリックスを使用して誘導した細菌から精製する。

【0450】

1つの実施形態において、アミノ酸45～875をコードするGST-融合タンパク質を、生成し、精製し、そして免疫原として使用する。使用し得る他の組換え細菌融合タンパク質としては、マルトース結合タンパク質、LacZ、チオレドキシン、NusA、または免疫グロブリン定常領域が挙げられる(「原核生物系における161P2F10Bの生成」と題する節、ならびにCurrent Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubulら編、1995; Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N., およびLedbetter, L. (1991) J. Exp. Med. 174, 561～566を参照のこと)。

【0451】

細菌由来融合タンパク質に加えて、哺乳動物により発現されるタンパク質抗原もまた、使用する。これらの抗原を、哺乳動物発現ベクター(例えば、Tag5融合ベクターおよびFc融合ベクター)から発現させる(「真核生物系における組換え161P2F10Bの生成」と題する節を参照のこと)。これらの抗原は、ネイティブタンパク質で見出される翻訳後修飾(例えば、グリコシル化)を保持する。1つの実施形態において、アミノ酸45～875を、Tag5哺乳動物分泌ベクター中にクローニングする。その組換えタンパク質を、その組換えベクターを安定に発現する293T細胞の組織培養上清から、金属キレートクロマトグラフィーによって精製する。その後、精製Tag5 161P2F10Bタンパク質を、免疫原として使用する。

【0452】

この免疫プロトコルの間、宿主動物の免疫応答を増強するアジュバント中に抗原を混合または乳濁することが、有用である。アジュバントの例としては、完全フロイントアジュバント(CFA)およびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0453】

代表的プロトコルにおいて、ウサギに、完全フロイントアジュバント(CFA)中に混

10

20

30

40

50

合したKLHに結合体化した、200 µgまで(代表的には、100~200 µg)の融合タンパク質または融合ペプチドを、まず皮下免疫する。その後、ウサギに、不完全フロイントアジュバント(IFA)中の200 µgまで(代表的には、100~200 µg)の免疫原を、2週間ごとに皮下注射する。各免疫の約7~10日後に、試験採血を採取し、そしてELISAにより抗血清の力価をモニターするために使用する。

【0454】

免疫血清(例えば、アミノ酸58~538をコードするTag5 161P2F10Bによる免疫で誘導されたウサギ血清)の反応性および特異性を試験するために、全長161P2F10B cDNAを、pCDNA3.1 myc-his発現ベクター(Invitrogen)中にクローニングする(「真核生物系における組換え161P2F10Bの生成」と題する実施例を参照のこと)。293T細胞中にその構築物をトランスフェクションした後、細胞溶解物を、抗161P2F10B血清および抗His抗体(Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA)でプローブし、ウェスタンブロット技術を使用して変性161P2F10Bタンパク質に対する特異的反応性を決定する。293T細胞および他の組換え161P2F10B発現細胞の免疫沈降分析およびフローサイトメトリー分析により、その抗血清によるネイティブタンパク質の認識を測定する。さらに、161P2F10Bを内因的に発現する細胞を使用して、ウェスタンブロット、免疫沈降、蛍光顕微鏡、およびフローサイトメトリー技術を実行して、特異性を試験する。

【0455】

Tag5 161P2F10B免疫化ウサギ由来の抗血清を、Affigelマトリックス(BioRad, Hercules, Calif.)に共有結合したTag5抗原から構成されるカラムを通すことによって、親和性精製する。その後、その血清を、プロテインG親和性クロマトグラフィーによりさらに精製して、IgG画分を単離する。融合タンパク質(例えば、GST融合タンパク質およびMBP融合タンパク質)で免疫したウサギ由来の血清を、融合パートナーを単独でかまたは無関係の融合タンパク質の状況で含む親和性カラムを通すことにより、融合パートナー配列に対して反応性である抗体を除去することによって精製する。他のHisタグ化抗原およびペプチド免疫ウサギ由来の血清、ならびに融合パートナー除去血清を、もとのタンパク質免疫原または遊離ペプチドから構成されるカラムマトリックスを通すことによって親和性精製する。

【0456】

(実施例11: 161P2F10Bモノクローナル抗体(mAb)の生成)

生検標本片中の161P2F10Bの存在を同定するためまたは161P2F10Bの効果や中和するための試薬の使用は、診断、予後、予防および/または治療において有益な効果を有する。抗161P2F10B試薬の1つの特に有用なクラスは、抗体であり、特に161P2F10Bに対するモノクローナル抗体(MAb)である。161P2F10Bタンパク質のエピトープと反応し、その結果、その存在を示すか、その生物学的機能を破壊もしくは調節する(例えば、その生物学的活性を媒介するかまたはその活性に関与するリガンドまたはタンパク質との相互作用を破壊するもの)か、または161P2F10Bを発現する細胞に毒素を運び得る、抗161P2F10B Ab(例えばMAb)が、産生される。

【0457】

本明細書中で使用される場合、用語、抗161P2F10B抗体は、161P2F10B遺伝子産物の任意のエピトープに対する抗体を網羅すると理解されるべきである。診断的MAb(例えば、画像化または免疫細胞化学のために使用されるMAb)は、161P2F10Bタンパク質のエピトープに特異的に結合し、従って、その存在を証明する、MAbを含む。治療的MAbは、診断に有用であるMAbを含むが、細胞表面に曝露された161P2F10Bのエピトープに特異的に結合し、従って、161P2F10Bを発現する細胞の機能を破壊し、そして/または161P2F10Bを発現する細胞と161P2F10Bに対するリガンドとの相互作用を破壊することによって、161P2F10B

を発現する細胞の増殖および生存を調整するために有用である M a b もまた含む。

【 0 4 5 8 】

本発明の1つの局面を形成する好ましい抗体としては、2002年11月7日に American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に寄託され、そして受託番号____を割り当てられたハイブリドーマによって分泌される、X41(4)6、X41(3)17、X41(3)50、X41(3)15、X41(3)29、およびX41(3)37と命名された抗体；ならびにそれらの誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。これらの生成については、本明細書中に記載されている。

10

【 0 4 5 9 】

161P2F10B発現の存在によって特徴付けられる病理学的状態としては、限定されないが、表Iに列挙されるような組織の新生物が挙げられる。本発明の1つの局面は、161P2F10Bの存在を検出する方法を提供する。本発明のさらなる局面は、161P2F10Bの存在によって特徴付けられた状態を処置する方法を提供し、この方法は、有効量の抗161P2F10B抗体を投与する工程を包含する。抗161P2F10B抗体の投与は、161P2F10Bの存在によって特徴付けられた状態の処置において特に有利である。

【 0 4 6 0 】

本発明に従う使用のための161P2F10Bに対する抗体は、任意の種由来であり得、そして任意の免疫グロブリンクラスに属し得る。従って、例えば、本発明に従う使用のための抗161P2F10B抗体は、免疫グロブリンG(IgG)、免疫グロブリンM(IgM)、免疫グロブリンA(IgA)、免疫グロブリンE(IgE)、または免疫グロブリンD(IgD)であり得る。

20

【 0 4 6 1 】

抗161P2F10B抗体は、動物(例えば、哺乳動物起源または鳥類起源)由来であり得、そして例えば、マウス起源、ラット起源またはヒト起源であり得る。抗体は、免疫グロブリン全体またはそのフラグメント(例えば、全抗体のタンパク質分解切断によって誘導されたフラグメント(例えば、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメントまたはFabフラグメント)、あるいは組換えDNA技術によって得られたフラグメント(例えば、Fvフラグメント)であり得る。

30

【 0 4 6 2 】

本発明に従う使用のための特に有用な抗体は、ヒト化抗161P2F10B抗体または完全なヒト抗161P2F10B抗体およびそのフラグメントを含む。これらの抗体は、任意の適切な手順(限定されないが、哺乳動物細胞および細菌細胞発酵系を含むがこれらに限定されない)によって作製される。

【 0 4 6 3 】

抗161P2F10B Mabは、161P2F10B抗原を利用する免疫学的技術によって調製される。従って、例えば、任意の適切な宿主は、161P2F10Bを免疫原として利用可能にする適切な試薬を注射(試薬で免疫)され得る。161P2F10Bを免疫原として利用可能にする試薬の例は、精製タンパク質(例えば、全細胞外ドメイン(ecd)またはそのフラグメント)、テンプレートとして全長タンパク質を用いて設計されたペプチド(例えば、その触媒性ドメインを含むペプチド)、ecdの全てまたは短縮フラグメントをコードするDNAベクター、161P2F10Bを発現する組み換え細胞(例えば、Rat-1、Mouse 3T3、Mouse 300.19、およびマウスNSO)、内因的に161P2F10Bを発現する細胞株(例えば、ヒトUT-7)または異種移植片(すなわち、患者由来の純粋な細胞および乳頭異種移植片)である。

40

【 0 4 6 4 】

免疫細胞(例えば、脾細胞またはリンパ球)は、例えば、Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6, 511(1976)の方法を使用して、免疫化宿主から回収され

50

そして不死化されるか、またはそれらの免疫グロブリン遺伝子が、単離され、そして適切な細胞タイプでの発現に適切なDNAベクターに移入され得る。いずれかの技術によって生成された、得られた細胞を、選抜し、より通常にはモノクローナル抗体として知られる、単一の特異なタイプの抗体を生成する単一遺伝子系統を得る。抗体フラグメントは、全抗体の酵素的分解（例えば、ペプシン（Parham, J. Immunol 131: 2895 (1983)）またはパパイン（LamoyiおよびNisonoff, J. Immunol Meth. 56: 235 (1983)）を用いる）のような技術を用いるか、または組換えDNA技術によって、生成され得る。

【0465】

161P2F10Bに対するMabの生成のための適切な宿主は、マウス、ラット、ハムスターおよびウサギを含む。例えば、マウスは、抗原性材料（免疫原）の供給源として161P2F10Bを利用可能にする多数の異なる試薬で免疫化される。免疫化の経路およびタイミングは、免疫原の供給源および/または実施形態に依存する。161P2F10Bに対する免疫原の供給源としては、限定されないが、以下が挙げられる：上記のようなペプチド、タンパク質、融合タンパク質、DNA, RNA、細胞または細胞膜。これらは、161P2F10Bに対する特異的免疫反応を産生するために、免疫原として別々でか、また組み合わせて使用され得る。これらの様々な免疫原の使用および適用は、添付の実施例に十分に記載される。

【0466】

（実施例12：HLAクラスI結合アッセイおよびHLAクラスII結合アッセイ）

精製HLA分子を使用するHLAクラスI結合アッセイおよびHLAクラスII結合アッセイを、開示されたプロトコル（例えば、PCT公開WO94/20127およびWO94/03205；Sidneyら、Current Protocols in Immunology 18.3.1 (1998)；Sidneyら、J. Immunol. 154: 247 (1995)；Setteら、Mol. Immunol. 31: 813 (1994)）に従って、実施する。簡単に述べると、記載されるように、精製MHC分子（5~500nM）を、種々の非標識ペプチドインヒビターおよび1~10nMの¹²⁵I放射標識プローブペプチドとともにインキュベートする。インキュベーション後、MHC-ペプチド複合体を、ゲル濾過により遊離ペプチドから分離し、そして結合ペプチドの画分を、測定する。代表的には、予備実験において、各MHC調製物を、一定量の放射標識ペプチドの存在下で力価決定して、全放射能のうちの10~20%を結合するのに必要なHLA分子の濃度を決定する。その後のすべての阻害アッセイおよび直接結合アッセイを、これらのHLA濃度を使用して実施する。

【0467】

これらの条件下では[標識]<[HLA]かつIC₅₀ [HLA]であるので、測定したIC₅₀値は、真のK_D値の妥当な近似である。ペプチドインヒビターを、代表的には、120μg/ml~1.2ng/mlの範囲の濃度で試験し、そして完全に独立した2つ~4つの実験において試験する。種々の実験において得られたデータの比較を可能にするために、相対的結合数を、各ペプチドについて計算する。この計算は、阻害についてのポジティブコントロールのIC₅₀を、試験した各ペプチドについてのIC₅₀（代表的には、放射標識プローブペプチドの非標識バージョン）で除算することによる。データベース目的のため、そして実験間比較のために、相対的結合値を集計する。これらの値を、その後、IC₅₀nM値へと変換して戻し得る。この変換は、阻害についてのポジティブコントロールのIC₅₀nMを、目的のペプチドの相対的結合によって除算することによる。このデータ集計方法は、正確であり、そして異なる日に試験したペプチドまたは異なるロットの精製MHCを用いて試験したペプチドの比較について、一貫性がある。

【0468】

上記に概略したような結合アッセイを使用して、HLAスーパーモチーフ保有ペプチドおよび/またはHLAモチーフ保有ペプチドを分析し得る（表IVを参照のこと）。

【0469】

(実施例13:HLAスーパーモチーフ保有CTL候補エピトープおよびHLAモチーフ保有CTL候補エピトープの同定)

本発明のHLAワクチン組成物は、複数のエピトープを含み得る。その複数のエピトープは、広範な集団範囲を達成するために、複数のHLAスーパーモチーフまたはHLAモチーフを含み得る。本実施例は、そのようなワクチン組成物中に含めるための、スーパーモチーフ保有エピトープおよびモチーフ保有エピトープの同定および確認を示す。集団範囲の計算を、下記のストラテジーを使用して実施する。

【0470】

(スーパーモチーフ保有エピトープおよび/またはモチーフ保有エピトープの同定のためのコンピューター検索およびアルゴリズム)

「抗原性プロフィール」と題する実施例ならびに表VIII~XXIおよびXXII~XLIXにおいてモチーフ保有ペプチド配列を同定するために実施する検索は、図2および図3に示される161P2F10Bの遺伝子産物からのタンパク質配列データを使用し、表を作成するのに使用された特定の検索ペプチドを、表VIIに列挙する。

【0471】

HLAクラスIスーパーモチーフもしくはHLAクラスIモチーフまたはHLAクラスIIスーパーモチーフもしくはHLAクラスIIモチーフを保有するエピトープについてのコンピューター検索を、以下のように実施する。翻訳される全ての161P2F10Bタンパク質配列を、文字列検索ソフトウェアプログラムを使用して分析して、適切なHLA結合モチーフを含む可能性のあるペプチド配列を同定する；そのようなプログラムを、公知のモチーフ/スーパーモチーフの開示を考慮して、当該分野における情報に従って容易に作成する。さらに、そのような計算は、頭でなし得る。

【0472】

同定したA2スーパーモチーフ配列、A3スーパーモチーフ配列、およびDRスーパーモチーフ配列を、多項アルゴリズムを使用してスコア付けして、それらのモチーフが、特定のHLA-クラスI分子またはHLA-クラスII分子に結合する能力を推測する。これらの多項アルゴリズムは、異なる位置にある異なるアミノ酸の影響を考慮する。これらの多項アルゴリズムは、ペプチド-HLA分子相互作用の全親和性(すなわちG)が、

$$「G」= a_{1i} \times a_{2i} \times a_{3i} \cdot \cdot \cdot \times a_{ni}$$

の型の線形多項関数として近似し得るという前提に本質的に基づき、ここで、 a_{ji} は、 n アミノ酸のペプチド配列に沿って所定の位置(i)にある所定のアミノ酸(j)の存在の効果を示す係数である。この方法の重大な仮定は、各位置での効果が、互いに本質的に独立している(すなわち、個々の側鎖の独立した結合である)ということである。残基 j が、そのペプチド中の位置 i に存在する場合、そのペプチドの残りの配列とは関係なく、そのペプチドの結合の自由エネルギーに一定量 j_i を寄与すると仮定する。

【0473】

特定のアルゴリズム係数の誘導方法は、Gulukotara、J.Mol.Biol. 267:1258~126, 1997に記載されている(Sidneyら、Human Immunol. 45:79~93, 1996;およびSouthwoodら、J.Immunol. 160:3363~3373, 1998もまた参照のこと)。簡単に述べると、全ての i 位置について、アンカーおよび非アンカーも同様に、 j を保有する全てのペプチドの平均相対結合(ARB)の相乗平均を、その群の残りに対して計算し、そして j_i の推定値として使用する。クラスIIペプチドについて、多重アライメントが可能である場合、反復手順に従って、最高スコアリングアライメントのみを利用する。試験セット中の所定のペプチドのアルゴリズムスコアを計算するために、そのペプチドの配列に対応するARB値を乗算する。この積が、選択した閾値を超える場合、そのペプチドは結合すると推定される。適切な閾値を、望ましい推定のストリンジェンシーの程度の関数として選択する。

【0474】

(HLA-A2スーパータイプ交叉反応性ペプチドの選択)

161P2F10B由来のタンパク質配列を、モチーフ同定ソフトウェアを利用してスクランして、HLA-A2スーパーモチーフ主要アンカー特異性を含む、8マー配列、9マー配列、10マー配列、および11マー配列を同定する。代表的には、次いで、これらの配列を、上記のプロトコルを使用してスコア付けし、そして正のスコアを持つ配列に対応するペプチドを合成し、これらのインビトロでの精製HLA-A*0201分子を結合する能力について試験する(HLA-A*0201は、プロトタイプA2スーパータイプ分子とみなされる)。

【0475】

次いで、これらのペプチドを、さらなるA2スーパータイプ分子(A*0202、A*0203、A*0206、およびA*6802)に結合する能力について試験する。試験した5つのA2スーパータイプ対立遺伝子のうちの少なくとも3つに結合するペプチドを、代表的には、A2スーパータイプ交叉反応性結合体と見なす。好ましいペプチドは、3つ以上のHLA-A2スーパータイプ分子に500nM以下の親和性で結合する。

10

【0476】

(HLA-A3スーパーモチーフ保有エピトープの選択)

上記でスクランする161P2F10Bタンパク質配列を、HLA-A3スーパーモチーフ主要アンカーを有するペプチドの存在についても試験する。次いで、HLA-A3スーパーモチーフ保有配列に対応するペプチドを合成し、そしてHLA-A*0301分子およびHLA-A*1101分子(最も有力な2つのA3スーパータイプ対立遺伝子によりコードされる分子)への結合について試験する。次いで、500nM、しばしば200nMの結合親和性でその2つの対立遺伝子のうちの少なくとも1つに結合するペプチドを、他の一般的なA3スーパータイプ対立遺伝子(例えば、A*3101、A*3301およびA*6801)に対する結合交叉反応性について試験して、試験する5つのHLA-A-A3スーパータイプ分子のうちの少なくとも3つに結合し得る分子を同定する。

20

【0477】

(HLA-B7スーパーモチーフ保有エピトープの選択)

上でスクランした161P2F10Bタンパク質を、HLA-B7スーパーモチーフを含む、8マーペプチド、9マーペプチド、10マーペプチド、または11マーペプチドの存在についても分析する。対応するペプチドを合成し、そしてHLA-B*0702(最も一般的なB7スーパータイプ対立遺伝子(すなわち、プロトタイプB7スーパータイプ対立遺伝子)によりコードされる分子)への結合について試験する。IC₅₀ 500nMでB*0702を結合するペプチドを、標準的方法を使用して同定する。次いで、これらのペプチドを、他の一般的なB7スーパータイプ分子(例えば、B*3501、B*5101、B*5301およびB*5401)への結合について試験する。それによって、試験する5つのB7スーパータイプ対立遺伝子のうちの3つ以上に結合し得るペプチドを、同定する。

30

【0478】

(A1モチーフ保有エピトープおよびA24モチーフ保有エピトープの選択)

集団範囲をさらに増大するために、HLA-A1エピトープおよびHLA-A24エピトープもまた、ワクチン組成物中に組み込み得る。161P2F10Bタンパク質の分析もまた、HLA-A1モチーフ含有配列およびHLA-A24モチーフ含有配列を同定するために実施し得る。

40

【0479】

他のモチーフおよび/またはスーパーモチーフを保有する、高親和性結合エピトープおよび/または交叉反応性結合エピトープを、類似する方法論を使用して同定する。

【0480】

(実施例14:免疫原性の確認)

本明細書中に記載されるように同定される交叉反応性候補CTL A2スーパーモチーフ保有ペプチドを、インビトロでの免疫原性を確認するために選択する。以下の方法論を使用して確認を実施する。

50

【0481】

(細胞スクリーニングのための標的細胞株)

H L A - A 2 . 1 遺伝子を、H L A - A、H L A - B、H L A - Cヌル変異体ヒトBリンパ芽球細胞株である721.221に移入することによって生成した.221A2.1細胞株を、H L A - A 2 . 1 拘束C T Lの活性を測定するためのペプチド負荷標的として使用する。この細胞株を、抗生物質、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、および10% (v/v) 熱不活化FCSを補充したRPMI - 1640培地中で増殖させる。目的の抗原を発現する細胞、または目的の抗原をコードする遺伝子を含むトランスフェクタントを、ペプチド特異的C T Lが内因性抗原を認識する能力を確認するための標的細胞として使用し得る。

10

【0482】

(一次C T L誘導培養)

(樹状細胞(DC)の産生) P B M Cを、30 μ g/mlのDNAseを含むRPMI中で解凍し、完全培地(RPMI - 1640 + 5% ABヒト血清、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、L - グルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシン)で2回洗浄し、この完全培地中に再懸濁する。その単球を、6ウェルプレート中に10 \times 10⁶ P B M C / ウェルでプレートすることによって精製する。37 $^{\circ}$ Cにて2時間後、そのプレートを穏やかに振盪し、その上清を吸引することによって、非接着細胞を除去する。ウェルを、3mlのRPMIで合計3回洗浄して、非接着細胞および緩く接着する細胞のほとんどを除去する。その後、50 ng/mlのGM - CSFおよび1,000 U/mlのI L - 4を含む3mlの完全培地を、各ウェルに添加する。6日目に、75 ng/mlにてTNF α を、DCに添加し、7日目に、その細胞を、C T L誘導培養に使用する。

20

【0483】

(DCおよびペプチドを用いたC T Lの誘導) C D 8 + T細胞を、Dyna1免疫磁気ビーズ(Dynabeads (登録商標) M - 450)およびdetacha - bead (登録商標) 試薬を用いるポジティブ選択によって単離する。代表的には、約200 \times 10⁶ 個 ~ 250 \times 10⁶ 個のP B M Cを、24 \times 10⁶ 個のC D 8 + T細胞(48ウェルプレート培養のために十分である)を得るために処理する。簡単に述べると、P B M Cを、30 μ g/mlのDNAseを含むRPMI中で解凍し、そして1%ヒトAB血清を含むPBSで1回洗浄し、そしてPBS / 1% AB血清中に、濃度20 \times 10⁶ 細胞/mlで再懸濁する。磁気ビーズを、PBS / AB血清を用いて3回洗浄し、細胞(140 μ lビーズ / 20 \times 10⁶ 細胞)に添加し、そして継続して混合しながら4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする。そのビーズおよび細胞を、PBS / AB血清を用いて4回洗浄して、非接着細胞を除去し、そして100 μ l/ml detacha - bead (登録商標) 試薬および30 μ g/ml DNAseを含むPBS / AB血清中に、100 \times 10⁶ 細胞/ml (もとの細胞数に基づく)で再懸濁する。その混合物を、継続して混合しながら室温にて1時間インキュベートする。そのビーズを、PBS / AB / DNAseで再び洗浄し、C D 8 + T細胞を収集する。DCを収集し、そして1300 rpmにて5 ~ 7分間遠心分離し、1% BSAを含むPBSで1回洗浄し、計数し、そして3 μ g/mlの α - ミクログロブリンの存在下で、20 $^{\circ}$ Cで4時間、細胞濃度1 \times 10⁶ ~ 2 \times 10⁶ / mlで、40 μ g/mlのペプチドを用いてパルスする。その後、そのDCを照射(4,200 rad)し、培地で1回洗浄し、そして再び計数する。

30

40

【0484】

(誘導培養の設定) 0.25 mlのサイトカイン産生DC (1 \times 10⁵ 細胞/ml) を、10 ng/mlのI L - 7の存在下で、48ウェルプレートの各ウェル中で0.25 mlのC D 8 + T細胞(2 \times 10⁶ 細胞/ml)とともに共培養する。翌日、組換えヒトI L - 10を、最終濃度10 ng/mlで添加し、48時間後に、rヒトI L - 2を、10 IU/mlで添加する。

【0485】

(ペプチドでパルスした接着細胞を用いる、誘導培養物の再刺激) 一次誘導の7日後

50

および14日後に、その細胞を、ペプチドでパルスした接着細胞を用いて再刺激する。そのPBMCを解凍し、RPMIおよびDNAseで2回洗浄する。その細胞を、 5×10^6 細胞/mlで再懸濁し、そして約4200radで照射する。PBMCを、1ウェルあたり0.5ml完全培地中 2×10^6 にてプレートし、37で2時間インキュベートする。そのプレートを穏やかにタッピングすることによってRPMIで2回洗浄して非接着細胞を除去し、0.25mlのRPMI/5%AB/ウェル中 $3 \mu\text{g/ml}$ の γ_2 ミクログロブリンの存在下で $10 \mu\text{g/ml}$ のペプチドで接着細胞を、37で2時間パルスする。各ウェルからペプチド溶液を吸引し、そのウェルを、RPMIで1回洗浄する。その培地のほとんどを、誘導培養物(CD8+細胞)から吸引し、そして新鮮な培地で0.5mlにする。その後、その細胞を、ペプチドでパルスした接着細胞を含むウェルへと移す。24時間後に、組換えヒトIL-10を、最終濃度 10 ng/ml で添加し、そして翌日および2~3日後に再度、組換えヒトIL2を、 50 IU/ml で添加する(Tsaiら、Critical Reviews in Immunology 18(1~2):65~75, 1998)。7日後に、その培養物を、 ^{51}Cr 放出アッセイにおいてCTL活性についてアッセイする。いくつかの実験において、その培養物を、2回目の再刺激の際にインサイチュIFN ELISAにおいてペプチド特異的認識についてアッセイし、7日後に、内因的認識のアッセイを行う。増殖後、並列比較のために両方のアッセイにおいて活性を測定する。

10

【0486】

(^{51}Cr 放出によるCTL溶解活性の測定)

20

2回目の再刺激の7日後、単一のE:Tにて個々のウェルをアッセイすることによって、標準的(5時間) ^{51}Cr 放出アッセイにおいて細胞傷害性を決定する。細胞を $10 \mu\text{g/ml}$ ペプチドとともに37で一晩インキュベートすることによって、ペプチドでパルスした標的を調製する。

【0487】

接着標的細胞を、トリプシン-EDTAを用いて培養フラスコから除去する。標的細胞を、 $200 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr クロム酸ナトリウム(Dupont, Wilmington, DE)を用いて37で1時間標識する。標識した標的細胞を、1mlあたり 10^6 で再懸濁し、K562細胞(非特異的溶解を減少するために使用されるNK感受性赤芽球腫株)を用いて濃度 $3.3 \times 10^6/\text{ml}$ で1:10希釈する。標的細胞($100 \mu\text{l}$)およびエフェクター($100 \mu\text{l}$)を、96ウェル丸底プレート中にプレートし、そして37で5時間インキュベートする。その時、 $100 \mu\text{l}$ の上清を各ウェルから収集し、そして式:

30

$$\left[(\text{試験サンプルのcpm} - \text{自然発生}^{51}\text{Cr放出サンプルのcpm}) / (\text{最大}^{51}\text{Cr放出サンプルのcpm} - \text{自然発生}^{51}\text{Cr放出サンプルのcpm}) \right] \times 100$$

に従って、溶解パーセントを決定する。

【0488】

最大放出および自然発生放出を、それぞれ、標識標的を、1%Triton X-100および培地単独とともにインキュベートすることによって、決定する。特異的溶解(サンプル-バックグラウンド)が個々のウェルの場合に10%以上であり、増殖した培養物をアッセイする場合には最高の2つのE:T比にて15%以上である培養物として、ポジティブ培養物を規定する。

40

【0489】

(ペプチド特異的かつ内因性認識の指標としてのヒトIFN生成のインサイチュ測定)

Immulon2プレートを、マウス抗ヒトIFNモノクローナル抗体($4 \mu\text{g/ml}$ 0.1M NaHCO₃、pH8.2)を使用して、4にて一晩コーティングする。このプレートをCa²⁺、Mg²⁺非含有PBS/0.05% Tween20で洗浄し、PBS/10% FCSを使用して2時間ブロッキングし、その後、CTL($100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$)および標的($100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$)を各ウェルに添加し、標準物質および

50

ブランクのためのウェルは、(培地のみを入れ)空にしておく。標的細胞(ペプチドパルスまたは内因性標的いずれか)を 1×10^6 細胞/mlの濃度にて使用する。プレートを、5% CO_2 により37にて48時間インキュベートする。

【0490】

組換えヒトIFN- γ を、400 pg / 100 μ l / ウェルまたは1200 pg / 100 μ l / ウェルにて開始して標準ウェルに添加し、プレートを37にて2時間インキュベートする。プレートを洗浄し、100 μ lのビオチン化マウス抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体(PBS / 3% FCS / 0.05% Tween 20中に2 μ g / ml)を添加し、室温にて2時間インキュベートする。再び洗浄した後、100 μ lのHRP-ストレプトアビジン(1:4000)を添加し、プレートを室温にて1時間インキュベートする。次いで、このプレートを洗浄緩衝液で6回洗浄し、100 μ l / ウェルの発色溶液(TMB 1:1)を添加し、プレートを5~15分間、発色させる。50 μ l / ウェル1M H_3PO_4 を使用して反応を停止し、OD450にて読み取る。少なくとも50 pgのIFN- γ / ウェルが、バックグラウンドより上で測定されかつ発現のバックグラウンドレベルの2倍である場合、培養物をポジティブとみなす。

10

【0491】

(CTL増殖)

ペプチドパルスした標的および/または腫瘍標的に対する特異的溶解活性を示す培養物を、抗CD3とともに2週間にわたり増殖させる。簡潔には、 5×10^4 CD8⁺細胞を、以下を含むT25フラスコに添加する: RPMI-1640(10%(v/v)ヒトAB血清、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、25 μ M 2-メルカプトエタノール、L-グルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシンを含有する)1ml中、 1×10^6 照射(4,200 rad)PBMC(自己または同種異系)/ml、 2×10^5 照射(8,000 rad)EBV形質転換細胞/ml、および30 ng/mlのOKT3(抗CD3)。組換えヒトIL2を200 IU/mlの最終濃度にて24時間後に添加し、その後3日間毎に、50 IU/mlにて新たな培地を加える。細胞濃度が 1×10^6 /mlを超えたら細胞を分け、培養物を、 51Cr 放出アッセイにて30:1、10:1、3:1および1:1のE:T比で13~15日の間にアッセイするか、または増殖前と同じ標的を使用してインサイチュIFNアッセイにて 1×10^6 /mlでアッセイする。

20

【0492】

培養物を、以下の通り、抗CD3⁺の非存在下で増殖させる。ペプチドおよび内因性標的に対する特異的溶解活性を示す培養物を選択し、 5×10^4 CD8⁺細胞を、以下を含むT25フラスコに添加する: RPMI-1640(10%(v/v)ヒトAB血清、非必須AA、ピルビン酸ナトリウム、25 mM 2-ME、L-グルタミンおよびゲンタマイシンを含有する)1ml中、 1×10^6 自己PBMC/ml(10 μ g/mlペプチドを用いて37にて2時間ペプチドパルスし、そして照射(4,200 rad)した); 2×10^5 照射(8,000 rad)EBV形質転換細胞/ml。

30

【0493】

(A2スーパーモチーフ保有ペプチドの免疫原性)

A2スーパーモチーフ交叉反応性結合ペプチドを、正常個体におけるペプチド特異的CTLを誘導する能力について細胞アッセイにて試験する。この分析において、ペプチドは、代表的には、少なくとも個体においてペプチド特異的CTLを誘導し、好ましくは、内因的に発現されたペプチドもまた認識する場合、エピトープであると考えられる。

40

【0494】

161P2F10Bを発現する腫瘍を保有する患者から単離されたPBMCを使用して、免疫原性もまた確認し得る。簡潔には、PBMCを患者から単離し、ペプチドパルスした単球を用いて再刺激し、ペプチドパルスした標的細胞および抗原を内因的に発現するトランスフェクト細胞を認識する能力についてアッセイする。

【0495】

(A*03/A11免疫原性の評価)

50

H L A - A 3スーパーモチーフ保有交叉反応性結合ペプチドもまた、H L A - A 2スーパーモチーフペプチドの免疫原性を評価するために使用される方法と同様の方法を使用して、免疫原性について評価する。

【 0 4 9 6 】

(B 7免疫原性の評価)

本明細書中で示されるように同定された B 7スーパータイプ交叉反応性結合ペプチドの免疫原性スクリーニングを、 A 2スーパーモチーフおよび A 3スーパーモチーフを保有するペプチドの確認と類似する様式で確認する。

【 0 4 9 7 】

他のスーパーモチーフ / モチーフ (例えば、 H L A - A 1、 H L A - A 2 4 など) を保有するペプチドもまた、同様の方法論を使用して確認する。

10

【 0 4 9 8 】

(実施例 1 5 : アナログを作製することによるネイティブエピトープの結合能力を改善するための伸長したスーパーモチーフの実行)

H L Aモチーフおよびスーパーモチーフ (一次残基および / または二次残基を含む) は、本明細書中に実証されるように、高度に交叉反応性のネイティブペプチドの同定および調製において有用である。さらに、H L Aモチーフおよびスーパーモチーフの規定はまた、ネイティブペプチド配列内の残基を同定することにより高度に交叉反応性のエピトープを操作することを可能にする。このネイティブペプチド配列は、ペプチドに特定の特性 (例えば、スーパータイプを含む H L A分子の群内のより大きな交叉反応性および / またはそれらの H L A分子のいくつかまたは全てに対するより大きな結合親和性) を付与するためにアナログ化され得る (a n a l o g e d)。調節された結合親和性を示すアナログ化ペプチドの例は、本実施例に示される。

20

【 0 4 9 9 】

(一次アンカー残基でのアナログ化)

ペプチド操作ストラテジーを、エピトープの交叉反応性をさらに増大させるために実行する。例えば、 A 2スーパーモチーフ保有ペプチドの主要アンカーを、例えば、2位にて好ましい L、I、V または M を、および C 末端にて好ましい I または V を導入するために改変する。

【 0 5 0 0 】

アナログペプチドの交叉反応性を分析するために、各操作アナログを、最初に、プロトタイプ A 2スーパータイプ対立遺伝子 A * 0 2 0 1 に対する結合について、次いで、 A * 0 2 0 1 結合能力が維持されていれば、 A 2スーパータイプ交叉反応性について試験する。

30

【 0 5 0 1 】

あるいは、ペプチドを、1つまたは全てのスーパータイプメンバーを結合すると確認し、次いで、スーパータイプメンバーのいずれか1つ (または 1 以上) に対する結合親和性を調節するためにアナログ化して、集団範囲を付加する。

【 0 5 0 2 】

細胞スクリーニング分析における免疫原性についてのアナログ選択は、代表的には、親野生型 (W T) ペプチドが、3以上の A 2スーパータイプ対立遺伝子に少なくとも弱く結合する (すなわち、5 0 0 0 n M 以下の I C ₅₀ にて結合する) 能力によってさらに制限される。この要件についての原理は、W T ペプチドが生物学的に関連するに十分な量にて内因的に存在しなければならないということである。アナログ化ペプチドは、親エピトープに特異的な T 細胞による増大した免疫原性および交叉反応性を有することが示された (例えば、P a r k h u r s t ら、J . I m m u n o l . 1 5 7 : 2 5 3 9 , 1 9 9 6 ; および P o g u e ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 2 : 8 1 6 6 , 1 9 9 5 を参照のこと)。

40

【 0 5 0 3 】

これらのペプチドアナログの細胞スクリーニングにおいて、アナログ特異的 C T L もま

50

た、野生型ペプチド、および可能である場合は、このエピトープを内因的に発現する標的細胞を認識することが可能であることを確認することが重要である。

【0504】

(HLA-A3およびB7のスーパーモチーフを保有するペプチドのアナログ化)

HLA-A3スーパーモチーフ保有エピトープのアナログは、HLA-A2スーパーモチーフ保有ペプチドのアナログ化において使用されるストラテジーと同様のストラテジーを使用して生成される。例えば、A3スーパータイプ分子の3/5に結合するペプチドは、2位に好ましい残基(V、S、MまたはA)を保有するように一次アンカー残基にて操作される。

【0505】

次いで、このアナログペプチドは、A*03およびA*11(プロトタイプA3スーパータイプ対立遺伝子)を結合する能力について試験される。次いで、500nMの結合能を示すペプチドは、A3スーパータイプ交叉反応性を有すると確認される。

【0506】

A2モチーフ保有ペプチドおよびA3モチーフ保有ペプチドに類似して、3以上のB7スーパータイプ対立遺伝子を結合するペプチドを改善して、可能な場合、増大した交叉反応結合性またはより大きな結合親和性もしくは結合半減期を達成し得る。B7スーパーモチーフを保有するペプチドは、Sidneyら(J. Immunol. 157:3480-3490, 1996)に示されるように、例えば、C末端一次アンカー位置にて好ましい残基(V、I、LまたはF)を有するように操作される。

【0507】

他のモチーフ保有エピトープおよび/またはスーパーモチーフ保有エピトープの一次アンカー残基でのアナログ化は、同様の様式で実施される。

【0508】

次いで、アナログペプチドは、代表的には、細胞スクリーニングアッセイにおいて免疫原性について確認される。繰り返すと、アナログ特異的CTLもまた、野生型ペプチド、および可能な場合、このエピトープを内因的に発現する標的を認識することが可能であることを実証することが一般に重要である。

【0509】

(二次アンカー残基でのアナログ化)

さらに、HLAスーパーモチーフは、高度に交叉反応性のペプチドおよび/または増大した親和性でHLA分子を結合するペプチドを、このような特性と関連する二次アンカー位置での特定の残基を同定することにより、操作することにおいて価値がある。例えば、1位にF残基を有するB7スーパーモチーフ保有ペプチドの結合能力を分析する。次いで、このペプチドを、例えば、1位のFをLで置換するようにアナログ化する。このアナログ化ペプチドを、増大した結合親和性、結合半減期および/または増大した交叉反応性について評価する。このような手順は、増強した特性を有するアナログ化ペプチドを同定する。

【0510】

十分に改善された結合能力または交叉反応性を有する操作されたアナログを、例えば、IFA免疫またはリポペプチド免疫の後に、HLA-B7トランスジェニックマウスにおいて免疫原性についてもまた試験し得る。アナログ化ペプチドを、161P2F10B発現腫瘍を有する患者由来のPBMCを使用してリコール(recall)応答を刺激する能力についてさらに試験する。

【0511】

(他のアナログ化ストラテジー)

ペプチドアナログ化の別の形態は、アンカー位置とは無関係に、システインを、-アミノ酪酸で置換することを包含する。その化学的性質に起因して、システインは、ジスルフィド架橋を形成し、かつ結合能力を減少させるに十分、ペプチドを構造的に変化させる特性を有する。システインの代わりに -アミノ酪酸での置換は、この問題を軽減するだ

10

20

30

40

50

けでなく、いくつかの場合において、結合能力および交叉結合能力を改善することもまた示される（例えば、Setteら、Persistent Viral Infections, R. AhmedおよびI. Chen編, John Wiley & Sons, England, 1999による総説を参照のこと）。

【0512】

従って、単一アミノ酸置換の使用により、HLAスーパータイプ分子に対するペプチドリガンドの結合特性および/または交叉反応性が調節され得る。

【0513】

（実施例16：HLA-DR結合モチーフを有する161P2F10B由来配列の同定および確認）

HLAクラスIIスーパーモチーフまたはHLAクラスIIモチーフを有するペプチドエピトープは、HLAクラスIIペプチドについて記載された方法論と類似の方法論を使用して、以下に概説されるように同定および確認される。

【0514】

（HLA-DRスーパーモチーフ保有エピトープの選択）

161P2F10B由来のHLAクラスII HTLエピトープを同定するために、161P2F10B抗原を、HLA-DRモチーフまたはHLA-DRスーパーモチーフを保有する配列の存在について分析する。具体的には、DRスーパーモチーフを含む（9マーのコアおよび3残基のN末端および3残基のC末端隣接領域を含む（計15アミノ酸））15マーの配列を選択する。

【0515】

DR分子に結合するペプチドを推定するためのプロトコルが開発されている（Southwoodら, J. Immunol. 160:3363-3373, 1998）。個々のDR分子に対して特異的なこれらのプロトコルは、9マーコア領域のスコア付けおよび順位付けを可能にする。各プロトコルは、9マーコア内のDRスーパーモチーフ一次アンカー（すなわち、1位および6位）の存在についてペプチド配列をスコア付けするのみならず、二次アンカーの存在についての配列もさらに評価する。対立遺伝子特異的選択表（例えば、Southwoodら, 同書を参照のこと）を使用して、これらのプロトコルが、特定のDR分子を結合する確率が高いペプチド配列を効率的に選択することを見いだした。さらに、これらのプロトコルを連携して（in tandem）実施することは、具体的に、DR1、DR4w4、およびDR7に対する実施が、DR交叉反応性ペプチドを効率的に選択し得ることを見いだした。

【0516】

上記で同定された161P2F10B由来ペプチドは、種々の一般的なHLA-DR分子についてのそれら結合能力について試験される。全てのペプチドは、一次パネル：DR1、DR4w4およびDR7においてDR分子に対する結合について最初に試験される。次いで、これら3つのDR分子のうちの少なくとも2つを結合するペプチドを、二次アッセイにおいてDR2w2 1分子、DR2w2 2分子、DR6w19分子、およびDR9分子に対する結合について試験する。最後に、この4つの二次パネルDR分子のうちの少なくとも2つを結合するペプチド、従って、7つの異なるDR分子のうちの少なくとも4つを累積的に結合するペプチドは、DR4w15分子、DR5w11分子、およびDR8w2分子に対する結合について三次アッセイにおいてスクリーニングされる。一次スクリーニングアッセイ、二次スクリーニングアッセイおよび三次スクリーニングアッセイを含む、この10個のDR分子のうちの少なくとも7つを結合するペプチドは、交叉反応性DR結合因子（binder）と考えられる。一般的なHLA-DR対立遺伝子を結合することが見いだされた161P2F10B由来のペプチドは、特に興味深い。

【0517】

（DR3モチーフペプチドの選択）

HLA-DR3は白色人種集団、黒色人種集団およびラテンアメリカ系集団において優勢である対立遺伝子であるので、DR3結合能力は、HTLエピトープの選択において適

10

20

30

40

50

切な基準である。従って、候補であることが示されたペプチドはまた、それらのDR3結合能力についてアッセイされ得る。しかし、DR3モチーフの結合特異性を考慮すると、DR3に対してのみ結合するペプチドはまた、ワクチン処方物中に含めるための候補物と考えられ得る。

【0518】

DR3を結合するペプチドを効率的に同定するために、標的161P2F10B抗原を、Gelukら(J. Immunol. 152: 5742-5748, 1994)により報告された2つのDR3特異的結合モチーフのうちの1つを有する配列について分析する。次いで、対応するペプチドを合成し、1 μ Mまたはより良好な(すなわち、1 μ M未満)の親和性でDR3を結合する能力を有すると確認する。この結合基準を満たし、HLAクラスII高親和性結合因子として適格とされるペプチドが見いだされる。

10

【0519】

このようにして同定されるDR3結合エピトープは、DRスーパーモチーフ保有ペプチドエピトープとともにワクチン組成物中に含まれる。

【0520】

HLAクラスIIモチーフ保有ペプチドの場合と同様に、クラスIIモチーフ保有ペプチドは、親和性または交叉反応性を改善するようにアナログ化される。例えば、9マーコア配列の4位のアスパラギン酸は、DR3結合についての最適残基であり、その残基についての置換は、しばしば、DR3結合を改善する。

【0521】

(実施例17: 161P2F10B由来HTLエピトープの免疫原性)

この実施例は、本明細書中で記載された方法論を使用して同定されたものの中から、免疫原性のDRスーパーモチーフ保有エピトープおよびDR3モチーフ保有エピトープを決定する。

20

【0522】

HTLエピトープの免疫原性を、HTL応答を刺激する能力を評価することにより、そして/または適切なトランスジェニックマウスモデルを使用することにより、CTLエピトープの免疫原性の決定に類似の様式にて確認する。免疫原性を、以下についてスクリーニングすることにより決定する: 1.) 正常PBMCを使用するインビトロ初代誘導または2.) 161P2F10B発現腫瘍を有する患者からのリコール応答。

30

【0523】

(実施例18: 集団の範囲の幅を決定するための種々の人種バックグラウンドにおけるHLAスーパータイプの表現型頻度の算出)

この実施例は、複数のスーパーモチーフおよび/またはモチーフを含む複数のエピトープから構成されるワクチン組成物の集団範囲の幅の評価を示す。

【0524】

集団範囲を分析するために、HLA対立遺伝子の遺伝子頻度を決定する。各HLA対立遺伝子の遺伝子頻度を、二項分布式 $gf = 1 - (\text{SQRT}(1 - af))$ を利用し、抗原または対立遺伝子頻度から計算する(例えば、Sidneyら, Human Immunol. 45: 79-93, 1996を参照のこと)。全体の表現型頻度を得るために、累積的遺伝子頻度を計算し、累積的抗原頻度を、逆方程式(*inverse formula*) $[af = 1 - (1 - Cgf)^2]$ を使用することにより導出する。

40

【0525】

頻度データがDNA型決定のレベルにて利用可能でない場合、血清学的に規定された抗原頻度に対する対応が想定される。潜在的スーパータイプ集団範囲全体を得るために、連鎖不平衡は想定されず、スーパータイプの各々に属すると確認された対立遺伝子のみが含まれる(最小評価(*minimal estimate*))。遺伝子座間の組み合わせにより達成される潜在的な範囲全体の評価を、考慮されたB対立遺伝子により包含されると予測され得るAに含まれない集団の割合をA範囲に加えることにより行う(例えば、合計 $= A + B * (1 - A)$)。A3様スーパータイプの確認されたメンバーは、A3、A1

50

1、A31、A*3301、およびA*6801である。A3様スーパータイプは、A34、A66、およびA*7401もまた含み得るが、これらの対立遺伝子は、頻度計算全体には含められなかった。同様に、A2様スーパータイプファミリーの確認されたメンバーは、A*0201、A*0202、A*0203、A*0204、A*0205、A*0206、A*0207、A*6802、およびA*6901である。最後に、B7様スーパータイプの確認された対立遺伝子は、B7、B*3501-03、B51、B*5301、B*5401、B*5501-2、B*5601、B*6701、およびB*7801である（B*1401、B*3504-06、B*4201、およびB*5602も潜在的にはメンバーである）。

【0526】

A2スーパータイプ、A3スーパータイプおよびB7スーパータイプを組み合わせることにより達成される集団範囲は、5つの主要な人種群において約86%である。範囲は、A1モチーフおよびA24モチーフを保有するペプチドを含めることにより拡げられ得る。平均すると、A1は、5つの異なる主要人種群（白人、北アメリカの黒人、中国人、日本人、およびラテンアメリカ系人）にまたがる集団の12%に存在し、A24は、29%に存在する。まとめると、これらの対立遺伝子は、これらの同じ人種集団において39%の平均頻度に相当する。A1およびA24が、A2スーパータイプ対立遺伝子、A3スーパータイプ対立遺伝子およびB7スーパータイプ対立遺伝子の範囲と組み合わせられると、主要人種にまたがる合計範囲は、95%を超える（表IV(G)を参照のこと）。類似のアプローチが、クラスIIモチーフ保有エピトープの組み合わせにより達成される集団範囲を評価するために使用され得る。

【0527】

ヒトにおける免疫原性研究（例えば、Bertoniら、J. Clin. Invest. 100:503, 1997; Doolanら、Immunity 7:97, 1997; およびThrelkeldら、J. Immunol. 159:1648, 1997）は、高度に交叉反応性の結合ペプチドが、エピトープとしてほぼ常に認識されることを示した。高度に交叉反応性の結合ペプチドを使用することは、多様な集団において免疫原性であるワクチンに含めるための候補エピトープを同定することにおける重要な選択基準である。

【0528】

（本明細書中開示されるとおりであり、そして当該分野による）十分な数のエピトープを用いることにより、平均集団範囲は、5つの主要人種集団の各々において95%を超えると推定される。ゲーム理論であるモンテカルロシミュレーション分析（これは、当該分野で公知である（例えば、Osborne, M. J. およびRubinstein, A. 「A course in game theory」MIT Press, 1994を参照のこと））は、白人、北アメリカ黒人、日本人、中国人、およびラテンアメリカ人の人種群から構成される集団中のどの程度の百分率の個体が本明細書中に記載されるワクチンエピトープを認識するかを推定するために使用され得る。好ましい百分率は、90%である。より好ましい百分率は、95%である。

【0529】

（実施例19：プライミング後に内因的にプロセッシングされた抗原のCTL認識）
この実施例では、本明細書中で記載されるように同定および選択されたネイティブペプチドまたはアナログ化ペプチドのエピトープにより誘導されたCTLが、内因的に合成された抗原（すなわち、ネイティブ抗原）を認識することを確認する。

【0530】

ペプチドエピトープ（例えば、HLA-A2スーパーモチーフ保有エピトープ）で免疫したトランスジェニックマウスから単離したエフェクター細胞を、ペプチドでコーティングした刺激性因子細胞（stimulator cell）を用いてインビトロで再刺激する。6日後、エフェクター細胞を、細胞傷害性についてアッセイし、ペプチド特異的細胞傷害性活性を含む細胞株を、さらに再刺激する。さらに6日後、これらの細胞株を、ペ

10

20

30

40

50

ペプチドの存在下または非存在下で⁵¹Cr標識Jurkat-A2.1/K^b標的細胞に対する細胞傷害性活性について試験し、内因的に合成された抗原を有する⁵¹Cr標識標的細胞（すなわち、161P2F10B発現ベクターで安定にトランスフェクトされた細胞）に対しても試験する。

【0531】

結果は、ペプチドエピトープでプライムされた動物から得られたCTL株が、内因的に合成された161P2F10B抗原を認識することを実証する。このような分析のために使用されるトランスジェニックマウスモデルの選択は、評価されるエピトープに依存する。HLA-A*0201/K^bトランスジェニックマウスに加えて、ヒトA11（これはまた、A3エピトープを評価するために使用され得る）およびB7対立遺伝子を有するマウスを含むいくつかの他のトランスジェニックマウスモデルが特徴付けられ、他（例えば、HLA-A1およびHLA-A24についてのトランスジェニックマウス）が開発されている。HLA-DR1およびHLA-DR3のマウスモデルもまた開発され、これらは、HTLEピトープを評価するために使用され得る。

10

【0532】

（実施例20：トランスジェニックマウスにおけるCTL-HTL結合体化エピトープの活性）

この実施例は、161P2F10B由来のCTLおよびHTLのペプチドワクチン組成物の使用による、トランスジェニックマウスにおけるCTLおよびHTLの誘導を示す。本明細書中で使用されるワクチン組成物は、161P2F10B発現腫瘍を有する患者に投与されるべきペプチドを含む。このペプチド組成物は、複数のCLEピトープおよび/またはHTLEピトープを含み得る。これらのエピトープは、本明細書中に記載される方法論を用いて同定される。この実施例はまた、増強された免疫原性が、CTLワクチン組成物中に1以上のHTLEピトープを含めることにより達成され得ることを示す；このようなペプチド組成物は、CLEピトープに結合体化されたHTLEピトープを含み得る。このCLEピトープは、500nM以下の親和性にて、複数のHLAファミリーメンバーに結合するエピトープまたはそのエピトープのアナログであり得る。これらのペプチドは、所望であれば、脂質化(lipidated)され得る。

20

【0533】

免疫手順：トランスジェニックマウスの免疫を、記載(Alexanderら, J. Immunol. 159: 4753-4761, 1997)のように行う。例えば、A2/K^bマウス（これは、ヒトHLA-A2.1対立遺伝子についてトランスジェニックであり、かつHLA-A*0201モチーフまたはHLA-A2スーパーモチーフを保有するエピトープの免疫原性を確認するために使用される）を、フロイント不完全アジュバント中、あるいはこのペプチド組成物が脂質化CTL/HTL結合体である場合は、DMSO/生理食塩水中、またはこのペプチド組成物がポリペプチドである場合はPBSもしくはフロイント不完全アジュバント中で、0.1mlのペプチドを用いて皮下で（尾の基部）プライムする。プライムして7日後、これらの動物から得た脾細胞を、ペプチドでコーティングした同系の照射LPS活性化リンパ芽球で再刺激する。

30

【0534】

細胞株：ペプチド特異的細胞傷害性アッセイのための標的細胞は、HLA-A2.1/K^bキメラ遺伝子（例えば、Vitielloら, J. Exp. Med. 173: 1007, 1991）を使用してトランスフェクトしたJurkat細胞である。

40

【0535】

インビトロでのCTL活性化：プライムして1週間後、10mlの培養培地/T25フラスコ中にて脾臓細胞（30×10⁶細胞/フラスコ）を、37℃にて同系の照射（3000rad）ペプチドコーティングリンパ芽球（10×10⁶細胞/フラスコ）とともに共存培養する。6日後、エフェクター細胞を採取し、細胞傷害性活性についてアッセイする。

【0536】

50

細胞傷害性活性についてのアッセイ：標的細胞（ $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ ）を、 $200 \mu\text{l}$ の ^{51}Cr の存在下で、 37°C にてインキュベートする。60分後、細胞を3回洗浄し、R10培地中に再懸濁する。ペプチドを、必要であれば $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にて添加する。アッセイのために、 10^4 の ^{51}Cr 標識標的細胞を、U底96ウェルプレート中の異なる濃度のエフェクター細胞（最終容積は $200 \mu\text{l}$ ）に添加する。 37°C にて6時間インキュベートした後、上清の 0.1ml のアリコートを各ウェルから取り出し、放射能を、MicroMedic自動ガンマカウンタにて測定する。特異的溶解%を、以下の式により決定する： $\% \text{特異的放出} = 100 \times (\text{実験的放出} - \text{自発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的放出})$ 。同じ条件下で行った別個のCTLアッセイの間の比較を容易にするために、 $\% ^{51}\text{Cr}$ 放出データを、溶解単位/ 10^6 細胞として表す。1溶解単位は、6時間の ^{51}Cr 放出アッセイにおいて10,000個の標的細胞の30%溶解を達成するために要したエフェクター細胞の数として任意に規定される。特異的溶解単位/ 10^6 を得るために、ペプチドの非存在下で得た溶解単位/ 10^6 を、ペプチドの存在下で得た溶解単位/ 10^6 から差し引く。例えば、30%の ^{51}Cr 放出が、ペプチドの非存在下では、50:1のエフェクター（E）：標的（T）比（すなわち、10,000個の標的に対して 5×10^5 個のエフェクター細胞）にて得られ、そしてペプチドの存在下では5:1（すなわち、10,000個の標的に対して 5×10^4 個のエフェクター細胞）にて得られる場合、特異的溶解単位は、以下の通りである： $[(1/50,000) - (1/500,000)] \times 10^6 = 18 \text{LU}$ 。

10

【0537】

20

結果を分析して、免疫原性CTL/HTL結合体ワクチン調製物を注射した動物のCTL応答の大きさを評価し、実施例標題「免疫原性の確認」において上記で概説したように、例えば、CTLEピトープを使用して達成されたCTL応答の大きさと比較する。これと類似の分析を行って、複数のCTLEピトープおよび/または複数のHTLEピトープを含むペプチド結合体の免疫原性を確認し得る。これらの手順に従って、CTL応答が誘導され、同時に、HTL応答がこのような組成物の投与の際に誘導されることが見いだされる。

【0538】

（実施例21：161P2F10B特異的ワクチン中に含めるためのCTLEピトープおよびHTLEピトープの選択）

30

この実施例は、本発明のワクチン組成物のためのペプチドエピトープを選択するための手順を示す。この組成物中のペプチドは、ペプチドをコードする単一の配列または1以上の配列（すなわち、ミニ遺伝子）のいずれかの核酸配列の形態であり得るか、あるいは単一エピトープおよび/またはポリエピトープのペプチドであり得る。

【0539】

以下の原理を、ワクチン組成物中に含めるための複数のエピトープを選択する場合に利用する。以下の原理の各々を、選択を行うために釣り合わせる。

【0540】

投与の際に、161P2F10Bクリアランスと関連する免疫応答を模倣するエピトープを選択する。使用されるエピトープの数は、自発的に161P2F10Bを浄化する患者の観察に依存する。例えば、自発的に161P2F10B発現細胞を浄化する患者が、161P2F10B抗原由来の少なくとも3つのエピトープに対する免疫応答を生じることが観察された場合、HLAクラスIについて少なくとも3つのエピトープが含まれるべきである。同様の原理が、HLAクラスIIエピトープを決定するために使用される。

40

【0541】

しばしば、HLAクラスI分子については 500 nM 以下の IC_{50} 、もしくはクラスIIについては 1000 nM 以下の IC_{50} という結合親和性を有するエピトープ；またはBIMASウェブサイト（URL bimas.dcrt.nih.gov/）からの高い結合スコアを有するHLAクラスIペプチドが選択される。

【0542】

50

多様な集団全体を通じたワクチンの広い範囲を達成するために、十分なスーパーモチーフ保有ペプチド、または対立遺伝子特異的モチーフ保有ペプチドの十分なアレイを選択して、広い集団範囲が与えられる。1つの実施形態において、エピトープは、少なくとも80%の集団範囲を提供するように選択される。モンテカルロ分析(当該分野で公知の統計学的評価法)は、集団範囲の幅、すなわち冗長性を評価するために使用され得る。

【0543】

ポリエピトープ組成物、またはこれをコードするミニ遺伝子を作製する場合、目的のエピトープを含む、可能性のある最も小さなペプチドを生成することが代表的に所望される。使用される原理は、ネスト化された(nested)エピトープを含むペプチドを選択する場合に使用されるものと同じでないとしても、同様である。例えば、ワクチン組成物 10
についてのタンパク質配列は、この配列が、配列内に含まれるエピトープの最大数を有する(すなわち、高濃度のエピトープを有する)ので、選択される。エピトープは、ネスト化されてもよいし、重複(すなわち、互いにフレームシフトしている)していてもよい。例えば、重複するエピトープを使用する場合、2つの9マーエピトープおよび1つの10 20
マーエピトープが、10アミノ酸ペプチド中に存在し得る。各エピトープは露出され得、このようなペプチドの投与の際にHLA分子により結合される。マルチエピトープのペプチドは、合成により、組換えにより、またはネイティブの供給源からの切断により生成され得る。あるいは、このネイティブ配列からアナログが生成され得、それにより1以上の 20
エピトープは、このポリエピトープペプチドの交叉反応性特性および/または結合親和性特性を変化させる置換を含む。このようなワクチン組成物は、治療目的または予防目的の 20
ために投与される。この実施形態は、免疫系の未だ発見されていない局面として、プロセッシングをネイティブのネスト化された配列に適用し、それにより治療的または予防的免疫応答誘導ワクチン組成物の生成を容易にするという可能性を提供する。さらに、このような実施形態は、現在未知のHLA構造についてのモチーフ保有エピトープの可能性を提供する。さらに、この実施形態(アナログを作製しない)は、免疫応答を、161P2F1 30
0B中に実際存在する複数のペプチド配列に向け、従って、何らかの連結エピトープを評価する必要性が避けられる。最後に、この実施形態は、核酸ワクチン組成物を生成する際のスケールの経済性を提供する。この実施形態に関連して、コンピュータープログラムが当該分野の原理に従って導出され得、このプログラムは、標的配列において配列長さあたりのエピトープの最大数を同定する。 30

【0544】

選択されたペプチドから構成されるワクチン組成物は、投与される場合、安全で、有効であり、かつ161P2F10Bを有するか、またはこれを過剰発現する細胞を制御または消去する免疫応答と類似の大きさの免疫応答を惹起する。

【0545】

(実施例22:「ミニ遺伝子」マルチエピトープDNAプラスミドの構築)

本実施例は、ミニ遺伝子発現プラスミドの構築を議論する。ミニ遺伝子プラスミドは、当然、本明細書中に記載される種々の構成のB細胞エピトープ、CTLエピトープおよび/またはHTLエピトープまたはB細胞エピトープアナログ、CTLエピトープアナログ および/またはHTLエピトープアナログを含み得る。 40

【0546】

ミニ遺伝子発現プラスミドは、代表的に、複数のCTLペプチドエピトープおよびHTLペプチドエピトープを含む。本実施例において、HLA-A2スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープ、HLA-A3スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープ、HLA-B7スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープならびにHLA-A1モチーフ保有ペプチドエピトープおよびHLA-A24モチーフ保有ペプチドエピトープを、DRスーパーモチーフ保有エピトープおよび/またはDR3エピトープと組み合わせて使用する。161P2F10B由来のHLAクラスIスーパーモチーフまたはHLAクラスIモチーフを保有するペプチドエピトープを、複数のスーパーモチーフ/モチーフが提示されて広範な集団の範囲を確実にするように、選択する。同様に、HLAクラスIIエピトープを、広範な 50

集団の範囲を提供するように、161P2F10Bから選択する。すなわち、HLA DR-1-4-7スーパーモチーフ保有エピトープおよびHLA DR-3モチーフ保有エピトープの両方を、ミニ遺伝子構築物に含有させるために選択する。選択されたCTLエピトープおよびHTLEピトープを、次いで、発現ベクターにおける発現のためにミニ遺伝子へと組み込む。

【0547】

このような構築物は、HTLEピトープを小胞体に指向させる配列をさらに含み得る。例えば、Iiタンパク質(Ii protein)は、当該分野において記載されるように1つ以上のHTLEピトープに融合され得、ここでこのIiタンパク質のCLIP配列は、除去され、そしてHLAクラスIIエピトープ配列と置換され、その結果、HLAクラスIIエピトープが、小胞体に指向され、このエピトープは、HLAクラスII分子に結合する。

10

【0548】

本実施例は、ミニ遺伝子保有発現プラスミドの構築のために使用される方法を例示する。ミニ遺伝子組成物のために使用され得る他の発現ベクターは、当業者に利用可能であり、かつ公知である。

【0549】

本実施例のミニ遺伝子DNAプラスミドは、コンセンサスKozak配列およびコンセンサスマウスIg軽鎖シグナル配列と、それに続く本明細書中に開示される原理に従い選択されるCTLエピトープおよび/またはHTLEピトープを含む。この配列は、pcDNA3.1Myc-HisベクターによりコードされるMycおよびHisの抗体エピトープタグに融合されたオープンリーディングフレームをコードする。

20

【0550】

例えば、15ヌクレオチドがオーバーラップしている、平均約70ヌクレオチド長であり得るオーバーラップオリゴヌクレオチドを合成し、そしてHPLC精製する。これらのオリゴヌクレオチドは、選択されたペプチドエピトープならびに適切なリンカーヌクレオチド、Kozak配列、およびシグナル配列をコードする。最終的なマルチエピトープミニ遺伝子を、PCRを用いる3セットの反応においてオーバーラップオリゴヌクレオチドを伸長することによってアセンブリする。Perkin/Elmer 9600 PCR機を用い、そして合計30サイクルを、以下の条件を用いて実施する：95 で15秒、(各々のプライマー対の最も低い計算値Tmより5 低い)アニーリング温度で30秒、そして72 で1分間。

30

【0551】

例えば、ミニ遺伝子を以下のように調製する。第一のPCR反応において、各々5 μgの2つのオリゴヌクレオチドを、アニーリングし、そして伸長する。8つのオリゴヌクレオチド(すなわち、4対のプライマー)を使用する実施例において、オリゴヌクレオチド1とオリゴヌクレオチド2、オリゴヌクレオチド3とオリゴヌクレオチド4、オリゴヌクレオチド5とオリゴヌクレオチド6、およびオリゴヌクレオチド7とオリゴヌクレオチド8とを、Pfuポリメラーゼ緩衝液(1x = 10 mM KCL、10 mM (NH₄)₂SO₄、20 mM Tris-クロリド(pH 8.75)、2 mM MgSO₄、0.1% Triton X-100、100 μg/ml BSA)、各々の0.25 mMのdNTP、および2.5 UのPfuポリメラーゼを含む100 μlの反応物中で合わせる。全長二量体産物を、ゲル精製し、そして1と2および3と4との産物、ならびに5と6および7と8との産物を含む2つの反応物を混合し、アニーリングし、そして10サイクルにわたり伸長する。次いで、2つの反応物の半分を混合し、そして隣接するプライマーを添加して、全長の産物を増幅する前に5サイクルのアニーリングおよび伸長を実施する。この全長産物を、ゲル精製し、PCR-blunt(Invitrogen)中にクローニングし、そして個々のクローンを配列決定によりスクリーニングする。

40

【0552】

(実施例23：プラスミド構築物およびそのプラスミド構築物が免疫原性を誘導する程

50

度)

プラスミド構築物(例えば、前出の実施例に従い構築されたプラスミド)が免疫原性を誘導し得る程度を、エピトープ発現核酸構築物を用いてAPCを形質導入またはトランスフェクトした後、このAPCによるエピトープ提示を決定することによりインビトロで確認する。このような研究により「抗原性」を決定し、そしてヒトAPCの使用を可能とする。このアッセイによりこの細胞表面上のエピトープ-HLAクラスI複合体の密度を定量することによって、T細胞により認識される状態においてAPCにより提示されるエピトープの能力を決定する。定量を、APCから溶出されたペプチドの量を直接測定することにより実施し得る(例えば、Sijtsら、J. Immunol. 156: 683~692、1996; Demotzら、Nature 342: 682~684、1989を参照のこと)か; またはペプチド-HLAクラスI複合体の数を、罹患したかまたはトランスフェクトされた標的細胞により誘導された溶解またはリンホカインの放出の量を測定し、次いで等しいレベルの溶解またはリンホカインの放出を得るために必要なペプチドの濃度を決定することにより、評価し得る(例えば、Kageyamaら、J. Immunol. 154: 567~576、1995を参照のこと)。

10

【0553】

あるいは、免疫原性を、マウスへのインビボでの注射、引き続きCTL活性およびHTL活性(これらの活性を、細胞傷害性および細胞増殖性のアッセイ(それぞれ、例えば、Alexanderら、Immunity 1: 751~761、1994において詳述される)を用いて分析する)のインビトロでの評価を介して確認する。

20

【0554】

例えば、少なくとも1つのHLA-A2スーパーモチーフペプチドを有するDNAミニ遺伝子構築物がCTLをインビボで誘導する能力を確認するために、例えば、HLA-A2.1/K^bトランスジェニックマウスを、100μgの裸のcDNAを用いて筋肉内で免疫する。cDNA免疫により誘導されたCTLのレベルを比較する手段として、コントロール群の動物もまた、複数のエピトープがミニ遺伝子によりコードされるので、単一のポリペプチドとして合成された複数のエピトープを含む実際のペプチド組成物そのものを用いて免疫する。

【0555】

免疫した動物由来の脾臓細胞を、各々の組成物(ミニ遺伝子においてコードされるペプチドエピトープまたはポリエピトープペプチド)をそれぞれ用いて2回刺激し、次いで⁵¹Cr放出アッセイにおいてペプチド特異的な細胞傷害性活性についてアッセイする。これらの結果は、A2拘束エピトープに対するCTL応答の大きさを示し、従ってミニ遺伝子ワクチンおよびポリエピトープワクチンのインビボでの免疫原性を示す。

30

【0556】

従って、ミニ遺伝子が、ポリエピトープペプチドワクチンが誘発するような、HLA-A2スーパーモチーフペプチドエピトープに対する免疫応答を誘発することが見いだされる。HLA-A3およびHLA-B7のモチーフエピトープまたはスーパーモチーフエピトープによるCTL誘導を評価するために他のHLA-A3トランスジェニックマウスモデルおよびHLA-B7トランスジェニックマウスモデルを用いて同様の分析もまた実施され、それにより、このミニ遺伝子が、提供されたエピトープに対して指向される適切な免疫応答を誘発することもまた見出される。

40

【0557】

クラスIIエピトープをコードするミニ遺伝子がHTLをインビボで誘導する能力を確認するためには、DRトランスジェニックマウスにか、または適切なマウスMHC分子と交叉反応するエピトープについては、例えば、I-A^b拘束マウスに、100μgのプラスミドDNAを筋肉内免疫する。DNA免疫により誘導されたHTLのレベルを比較する手段として、コントロール動物の群も、フロイント完全アジュバンド中に乳化した実際のペプチド組成物で免疫する。CD4+T細胞(すなわちHTL)を、免疫した動物の脾臓細胞から精製し、そして各々の組成物(ミニ遺伝子中にコードされるペプチド)のそれぞ

50

れを用いて刺激する。HTL 応答を、³H - チミジン取り込み増殖アッセイを用いて測定する（例えば、Alexanderら、Immunity 1:751~761、1994を参照のこと）。この結果は、HTL 応答の大きさを示し、従って、このミニ遺伝子のインビボでの免疫原性を実証する。

【0558】

前出の実施例において記載されるように構築されたDNAミニ遺伝子をまた、プライムブーストプロトコル（prime boost protocol）を用いてブースト剤と組み合わせたワクチンとして確認し得る。このブースト剤は、組み換えタンパク質（例えば、Barnettら、Aids Res. and Human Retroviruses 14, Supplement 3: S299~S309、1998）または例えば、完全な目的のタンパク質をコードするミニ遺伝子もしくはDNAを発現する組み換えワクチン（例えば、Hankeら、Vaccine 16:439~445、1998；Sedegahら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7648~53、1998；HankeおよびMcMichael、Immunol. Letters 66:177~181、1999；ならびにRobinsonら、Nature Med. 5:526~34、1999を参照のこと）からなり得る。

【0559】

例えば、プライムブーストプロトコルにて用いられるDNAミニ遺伝子の有効性を、最初に、トランスジェニックマウスにおいて評価する。本実施例において、A2.1/K^b トランスジェニックマウスを、免疫原性ペプチド（少なくとも1つのHLA-A2スーパーモチーフ保有ペプチドを含む）をコードする100μgのDNAミニ遺伝子でIM免疫する。インキュベーション期間（3~9週間の範囲をとる）の後、このマウスを、DNAミニ遺伝子によりコードされるのと同じ配列を発現する10⁷ p f u / マウスの組み換えワクシニアウイルスを用いてIPでブーストする。コントロールマウスを、ミニ遺伝子配列を有さない100μgのDNAもしくは組み換えワクシニアをもちいるか、またはこのミニ遺伝子をコードするDNAを用いるが、ワクシニアブーストを伴わずに免疫する。2週間のさらなるインキュベーション期間の後、このマウス由来の脾臓細胞を、ELISPOTアッセイにおいてペプチド特異的な活性について直ちにアッセイする。さらに、脾臓細胞を、ミニ遺伝子中にコードされるA2拘束ペプチドエピトープおよび組み換えワクシニアを用いてインビトロで刺激し、次いでIFN ELISA、IFN ELISA、および/またはIFN ELISAにおいてペプチド特異的な活性についてアッセイする。

【0560】

プライムブーストプロトコルにおいて利用されるミニ遺伝子が、HLA-A2スーパーモチーフペプチドに対してDNA単独より高い免疫応答を誘発することが見出される。そのような分析をまた、HLA-A3またはHLA-B7のモチーフエピトープまたはスーパーモチーフエピトープによるCTL誘導を評価するために、HLA-A11トランスジェニックマウスモデルまたはHLA-B7トランスジェニックマウスモデルを用いて実施し得る。ヒトにおけるプライムブーストプロトコルの使用を、「プライムブーストプロトコルを用いるCTL 応答の誘導」と題した以下の実施例において記載する。

【0561】

（実施例24：予防使用のためのペプチド組成物）

本発明のワクチン組成物を使用して、この抗原を保有する腫瘍についての危険性を有するヒトにおける161P2F10B発現を予防し得る。例えば、上記実施例において選択されるエピトープのような複数のCTLエピトープおよびHTLEピトープを含むポリエピトープペプチドエピトープ組成物（またはポリエピトープペプチドエピトープを含む核酸）（これらはまた、集団の80%より多くを標的化するように選択される）を、161P2F10B関連腫瘍についての危険性がある個体に投与する。

【0562】

10

20

30

40

50

例えば、ペプチドベースの組成物を、複数のエピトープを含む単一のポリペプチドとして提供する。代表的には、アジュバント（例えば、フロイントの不完全アジュバンド）を含む生理学的溶液中でワクチンを投与する。最初の免疫のためのペプチド用量は、70 kgの患者について約1 μg ~ 約50,000 μgであり、一般的には100 μg ~ 5,000 μgである。ワクチンの最初の投与に引き続いて、4週間目にブースター投与をし、さらに引き続いてPBMCSAMPLE中のエピトープ特異的CTL集団の存在を決定する技術により患者における免疫応答の大きさの評価をする。さらなるブースター用量を、必要である場合に投与する。この組成物は、161P2F10B関連疾患に対する予防薬として安全かつ効果的であることが見出される。

【0563】

あるいは、代表的にトランスフェクト薬剤を含む組成物を、当該分野において公知の方法論および本明細書中で開示される方法論に従い、核酸ベースのワクチンの投与のために使用する。

【0564】

（実施例25：ネイティブの161P2F10B配列由来のポリエピトープワクチン組成物）

ネイティブの161P2F10Bポリタンパク質配列を、複数のエピトープを含むポリタンパク質の「比較的短い」領域を同定するために、好ましくは、各々のクラスIおよび/またはクラスIIのスーパーモチーフまたはモチーフについて規定されるコンピュータアルゴリズムを用いて分析する。好ましくは、この「比較的短い」領域は、全長のネイティブの抗原より長さが短い。複数の別個の、またはオーバーラップする「ネスト化された(nested)」エピトープを含むこの比較的短い領域を、ミニ遺伝子構築物を作製するために使用し得る。この構築物を、ネイティブのタンパク質配列に対応するペプチドを発現するように操作する。この「比較的短い」ペプチドは、一般的に250アミノ酸長未満であり、しばしば100アミノ酸長未満であり、好ましくは75アミノ酸長未満であり、より好ましくは50アミノ酸長未満である。このワクチン組成物のタンパク質配列は、この配列中に含有される最大数のエピトープを有する（すなわち、それは、高濃度のエピトープを有する）ので、このワクチン組成物のタンパク質配列を選択する。本明細書中に示されるように、エピトープモチーフは、ネスト化されていても、オーバーラップしてもよい（すなわち、互いに対してフレームシフトしてもよい）。例えば、オーバーラップエピトープを用いて、2つの9マーエピトープおよび1つの10マーエピトープが、10アミノ酸のペプチド中に存在し得る。そのようなワクチン組成物を、治療目的または予防目的のために投与する。

【0565】

このワクチン組成物としては、例えば、161P2F10B抗原由来の複数のCTLエピトープおよび少なくとも1つのHTLエピトープが挙げられる。このポリエピトープネイティブ配列を、ペプチドとしてかまたはこのペプチドをコードする核酸配列としてかいずれかで投与する。あるいは、アナログを、そのネイティブ配列から作製し得、それにより1つ以上のエピトープが、そのポリエピトープペプチドの交叉反応性特性および/または結合親和性特性を変化させる置換を含む。

【0566】

本実施例の実施形態は、免疫系プロセッシングの未だ発見されていない局面を、ネイティブのネスト化された配列に適用し、それにより治療的または予防的な免疫応答を誘導するワクチン組成物の産生を容易にする可能性を提供する。さらに、そのような実施形態は、現在未知のHLA構造についてのモチーフ保有エピトープの可能性を提供する。さらに、この実施形態（類似の実施形態を除く）は、免疫応答をネイティブの161P2F10B中に実際に存在する複数のペプチド配列に向け、従って、任意の連結するエピトープを評価する必要性を除外する。最後に、この実施形態は、ペプチドワクチン組成物または核酸ワクチン組成物を産生する場合の規模の経済を提供する。

【0567】

10

20

30

40

50

この実施形態に関して、標的配列において、配列長あたり最も多数のエピトープを同定するために使用され得るコンピュータプログラムが、当該分野において利用可能である。

【0568】

(実施例26：複数の抗原由来のポリエピトープワクチン組成物)

本発明の161P2F10Bペプチドエピトープを、他の標的腫瘍関連抗原由来のエピトープと組み合わせて使用して、161P2F10Bおよびそのような他の抗原を発現する癌の予防および処置に有用なワクチン組成物を作製する。例えば、ワクチン組成物を、161P2F10B由来の複数のエピトープおよび161P2F10B発現に関連する標的の癌でしばしば発現される腫瘍関連抗原を組み込む、単一のポリペプチドとして提供し得るか、または1つ以上の別個のエピトープのカクテルを含む組成物として投与し得る。あるいは、このワクチンを、ミニ遺伝子構築物として、またはインビトロでペプチドエピトープを充填した樹状細胞として投与し得る。

10

【0569】

(実施例27：免疫応答を評価するためのペプチドの使用)

本発明のペプチドを、161P2F10Bに対する特異的抗体、CTLまたはHTLの存在についての免疫応答を分析するために使用し得る。そのような分析を、Oggら、Science 279:2103~2106、1998に記載される様式で実施し得る。本実施例において、本発明に従うペプチドを、診断目的または予防目的のための試薬として(免疫原としてではなく)使用する。

20

【0570】

本実施例において、高度に感受性なヒト白血球抗原四量複合体(「四量体」)を、例えば、疾患の異なる病期またはA*0201モチーフを含む161P2F10Bペプチドを含む免疫後でのHLA A*0201陽性個体由来の161P2F10B HLA-A*0201特異的CTL頻度の横断解析のために使用する。四量体複合体を、記載される(Museyら、N. Engl. J. Med. 337:1267、1997)ように合成する。簡単には、精製したHLA重鎖(本実施例におけるA*0201)および2-ミクログロブリンを、原核生物発現系によって合成する。この重鎖を、膜貫通-細胞質ゾルテールの欠失およびBirA酵素ピオチン化部位を含む配列のCOOH末端付加により改変する。重鎖、2-ミクログロブリン、およびペプチドを、希釈により再折り畳みをする。この45kDの再折り畳み産物を、高速タンパク質液体クロマトグラフィーを用いて単離し、次いでピオチン(Sigma, St. Louis, Missouri)、アデノシン5'三リン酸およびマグネシウムの存在下でBirAによりピオチン化する。ストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体を、1:4のモル比で添加し、四量体産物を1mg/mlまで濃縮する。得られた産物を、四量体-フェコエリトリンという。

30

【0571】

患者の血液サンプルの分析のために、約100万個のPBMCを、300gで5分間遠心分離し、50μlの冷リン酸緩衝化生理食塩水に再懸濁する。三色分析を、抗CD8-トリカラー(Tricolor)、および抗CD38と共に四量体-フィコエリトリンを用いて実施する。PBMCを、氷上で四量体および抗体と共に30~60分間インキュベートし、次いでホルムアルデヒド固定の前に2回洗浄する。99.98%より多くのコントロールサンプルを含むようなゲートを適用する。四量体についてのコントロールは、A*0201陰性の個体およびA*0201陽性の罹患していないドナーの両方を含む。次いで、この四量体を用いて染色された細胞の百分率を、フローサイトメトリーを用いて決定する。この結果は、PBMCサンプル中のエピトープ拘束CTL含有細胞の数を示し、これにより161P2F10Bエピトープに対する免疫応答の程度、従って、161P2F10Bへの曝露の状態、または予防的応答もしくは治療的応答を誘発するワクチンへの曝露の状態を容易に示す。

40

【0572】

(実施例28：リコール(recall)応答を評価するためのペプチドエピトープの

50

使用)

本発明のペプチドエピトープを、患者におけるT細胞応答(例えば、急性またはリコール応答)を評価するための試薬として使用する。そのような分析を、161P2F10B関連疾患から回復した患者または161P2F10Bワクチンでワクチン接種した患者において実施し得る。

【0573】

例えば、ワクチン接種したヒトのクラスI拘束CTL応答を分析し得る。このワクチンは、任意の161P2F10Bワクチンでよい。PBMCを、ワクチン接種した個体から回収し、HLA型決定する。次いで、複合的HLAスーパータイプファミリーメンバーに交叉反応性を提供するためのスーパーモチーフを必要に応じて保有する本発明の適切なペプチドエピトープを、そのHLA型を保有する個体由来のサンプルの分析のために使用する。

10

【0574】

ワクチン接種した個体由来のPBMCを、Ficoll-Histopaque密度勾配(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)上で分離し、HBSS(GIBCO Laboratories)中で3回洗浄し、熱で不活性化した10%のヒトAB血清を含むL-グルタミン(2mM)、ペニシリン(50U/ml)、ストレプトマイシン(50µg/ml)およびHepes(10mM)を補充したRPMI-1640(GIBCO Laboratories)(完全RPMI)中に再懸濁し、マイクロ培養形式を用いてプレートする。本発明のエピトープを含む合成ペプチドを、各々のウェルに10µg/mlで添加し、そしてHBVコア128~140エピトープを、刺激の第一週目の間、T細胞ヘルプの供給源として各々のウェルに1µg/ml添加する。

20

【0575】

マイクロ培養形式において、 4×10^5 PBMCを、100µl/ウェルの完全RPMIの96ウェルの丸底プレート中で、8つの複製培養物中にてペプチドで刺激する。3日目および10日目に、100µlの完全RPMIおよび20U/mlの最終濃度のrIL-2を、各々のウェルに添加する。7日目に、この培養物を、96ウェルの平底プレートに移し、そしてペプチド、rIL-2および 10^5 の放射性(3,000rad)の自己フィーダー細胞を用いて再刺激する。この培養物を、14日目に細胞傷害性について試験する。陽性CTL応答は、以前に記載されるような(Rehermannら、Nature Med. 2: 1104、1108、1996; Rehermannら、J. Clin. Invest. 97: 1655~1665、1996; およびRehermannら、J. Clin. Invest. 98: 1432~1440、1996)罹患していないコントロール被験体との比較に基づいて、8つの複製培養物のうち2つ以上が10%より多い特異的 ^{51}Cr 放出を示すことを必要とする。

30

【0576】

標的細胞株は、自己由来かつ同種異系のEBV形質転換したB-LCLであり、これらは、両方American Society for Histocompatibility and Immunogenetics(ASHI, Boston, MA)から購入されたか、または記載されるように(Guilhotら、J. Virol. 66: 2670~2678、1992)患者のプールから樹立されるかのいずれかである。

40

【0577】

細胞傷害性アッセイを、以下の様式で実施する。標的細胞は、同種異系のHLA適合性Bリンパ芽球細胞株または自己由来のEBV形質転換Bリンパ芽球細胞株のいずれかからなり、これらを、10µMの本発明の合成ペプチドエピトープと共に一晚インキュベートし、そして100µCiの ^{51}Cr (Amersham Corp., Arlington Heights, IL)を用いて1時間にわたり標識し、その後これらを、HBSSを用いて4回洗浄する。

【0578】

50

細胞傷害活性を、3,000標的/ウェルを含むU底の96ウェルプレートを用いる標準的な4時間の、別々のウェルの ^{51}Cr 放出アッセイにおいて決定する。刺激されたPBMCを、20~50:1のエフェクター/標的(E/T)の比率で14日目に試験する。細胞傷害性を、式： $100 \times [(\text{実験的放出} - \text{自発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的放出})]$ から決定する。最大放出を、界面活性剤(2% Triton X-100; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)による標的の溶解により決定する。自発的放出は、全ての実験について最大放出の25%未満である。

【0579】

このような分析の結果は、HLA拘束CTL集団が、161P2F10Bまたは161P2F10Bワクチンへの以前の曝露により刺激された程度を示す。

10

【0580】

同様に、クラスII拘束HTL応答もまた分析し得る。精製されたPBMCを、 1.5×10^5 細胞/ウェルの密度の96ウェルの平底プレート中で培養し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の本発明の合成ペプチド、161P2F10B抗原全体、またはPHAを用いて刺激する。細胞を、各々の条件について4~6ウェルのレプリカとして慣用的にプレートする。7日間の培養の後、培地を除去し、そして $10 \text{U}/\text{ml}$ のIL-2を含む新しい培地と置換する。2日後、 $1 \mu\text{Ci}$ の ^3H チミジンを、各々のウェルに添加し、そしてさらに18時間にわたりインキュベーションを続ける。次いで、細胞DNAを、ガラスファイバーマット上に回収し、そして ^3H チミジン取り込みについて分析する。抗原特異的T細胞増殖を、抗原の存在下での ^3H チミジン取り込みを抗原の非存在下での ^3H チミジン取り込みで割った比として計算する。

20

【0581】

(実施例29: ヒトにおける特異的CTL応答の誘導)

本発明のCTLエピトープおよびHTLエピトープを含む免疫原性組成物についてのヒト臨床試験を、IND第I相、用量上昇研究として設定し、そして無作為化した二重盲検偽薬制御試験として実施する。そのような試験を、例えば、以下のように設計する:

全体で約27人の個体を登録し、そして3つのグループに分ける;

グループI: 3人の被験体に偽薬を注射し、そして6人の被験体に $5 \mu\text{g}$ のペプチド組成物を注射する;

グループII: 3人の被験体に偽薬を注射し、そして6人の被験体に $50 \mu\text{g}$ のペプチド組成物を注射する;

30

グループIII: 3人の被験体に偽薬を注射し、そして6人の被験体に $500 \mu\text{g}$ のペプチド組成物を注射する。

【0582】

最初の注射の4週間後に、全ての被験体に同じ投与量で追加免疫接種した。

【0583】

この研究において測定される終点は、このペプチド組成物の安全性および許容性、ならびにその免疫原性に関連する。このペプチド組成物に対する細胞性免疫応答は、このペプチド組成物の固有の活性の指標であり、従って生物学的有効性の尺度として見られ得る。以下は、安全性および有効性の終点に関する臨床データおよび研究室データを要約する。

40

【0584】

安全性: 有害な事象の発生率を、偽薬処置群および薬物処置群においてモニターし、そしてその程度および可逆性をもって評価する。

【0585】

ワクチン有効性の評価: ワクチン有効性の評価のために、注射前後に、被験体から採血する。末梢血液単核細胞を、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心分離により新しいヘパリン化血液から単離し、凍結媒体中にアリコート化し、そして凍結保存する。サンプルを、CTL活性およびHTL活性についてアッセイする。

【0586】

ワクチンが、安全でありかつ有効であることが見出される。

50

【0587】

(実施例30：161P2F10Bを発現する患者における第II相試験)

第II相試験を、161P2F10Bを発現する癌を有する患者へのCTL-HTLペプチド組成物の投与の効果の研究のために実施する。この試験の主要な目的は、161P2F10Bを発現する癌患者においてCTLを誘導するために有効な用量とレジメンを決定すること、これらの患者においてCTL応答およびHTL応答を誘導することの安全性を樹立すること、ならびに、どの程度のCTLの活性化が、(例えば、病巣の減少および/または萎縮により)明らかになるような、これらの患者の臨床像を改善するかをみることである。このような研究を、例えば、以下のように設計する。

【0588】

この研究を、複数の中枢において実施する。この試験の設計は、オープンラベルの未制御用量上昇プロトコルであり、ここで、このペプチド組成物を、単回容量として投与し、続いて、6週間後に同じ用量の単回の追加免疫注射を行う。この投与量は、注射一回あたり50 μ g、500 μ g、および5,000 μ gである。薬物関連の有害な効果(重篤度および可逆性)を記録する。

【0589】

3つの患者のグループが存在する。第一のグループに50 μ gのこのペプチド組成物を注射し、第二および第三のグループにそれぞれ、500 μ gおよび5,000 μ gのペプチド組成物を注射する。各々のグループ内の患者は、21歳~65歳の範囲であり、そして種々の人種集団バックグラウンドを示す。彼らの全ては、161P2F10Bを発現する腫瘍を有する。

【0590】

臨床的発現または抗原特異的T細胞応答を、このペプチド組成物を投与することの効果の評価するためにモニタリングする。このワクチン組成物が、161P2F10B関連疾患の処置において安全かつ有効であることが見出される。

【0591】

(実施例31：プライムブーストプロトコルを用いるCTL応答の誘導)

「プラスミド構築物およびそのプラスミド構築物が免疫原性を誘導する程度」と題された実施例において記載されるような、トランスジェニックマウスにおけるDNAワクチンの有効性を確認するために使用されるプロトコルと根底にある原理が類似するプライムブーストプロトコルをまた、ヒトにワクチンを投与するために使用し得る。そのようなワクチンレジメンは、例えば、裸のDNAの最初の投与と、そのワクチンをコードする組み換えウイルス、またはアジュバント中で投与される組み換えタンパク質/ポリペプチドもしくはペプチド混合物の投与を用いるその後のブーストを含み得る。

【0592】

例えば、最初の免疫を、発現ベクター(例えば、「ミニ遺伝子」マルチエピトープDNAプラスミドの構築」と題した実施例を、複数の部位で0.5mg~5mgの量でIM(またはSCまたはID)投与される裸の核酸の形態において構築されるような発現ベクター)用いて実施し得る。この核酸(0.1 μ g~1000 μ g)をまた、遺伝子ガンを用いて投与し得る。3~4週間のインキュベーション期間の後、次いで、ブースター用量を投与する。このブースターは、 5×10^7 pfu~ 5×10^9 pfuの用量で投与される組み換え鶏痘ウイルスであり得る。代替的な組み換えウイルス(例えば、MVAウイルス、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルス)をまた、ブースターのために使用し得るか、またはポリエピトープタンパク質もしくはこれらのペプチドの混合物を投与し得る。ワクチン有効性の評価のために、免疫前ならびに最初のワクチンおよびワクチンのブースター用量の投与後に、間隔を空けて患者の血液サンプルを得る。末梢血液単核細胞を、Ficol1-Hypaque密度勾配遠心分離により新しいヘパリン化血液から単離し、凍結培体中にアリコート化し、そして凍結保存する。サンプルを、CTL活性およびHTL活性についてアッセイする。

【0593】

これらの結果の分析は、161P2F10Bに対する治療的免疫または保護免疫を達成するのに十分な強度の応答が産生されることを示す。

【0594】

(実施例32：樹状細胞(DC)を用いるワクチン組成物の投与)

本発明のペプチドエピトープを含むワクチンを、APCまたは「プロフェッショナル」APC(例えば、DC)を用いて投与し得る。本実施例において、ペプチドパルスされたDCを、患者に投与して、インビボでCTL応答を刺激する。この方法において、樹状細胞を、単離し、拡張させ、そして本発明のペプチドCTLエピトープおよびペプチドHTLEピトープを含むワクチンでパルスする。これらの樹状細胞を患者に注入して戻し、インビボでCTL応答およびHTL応答を誘発させる。次いで、誘導されたCTLおよびHTLは、このワクチン中のエピトープが由来する161P2F10Bタンパク質を保有する標的細胞をそれぞれ破壊するか、または破壊を促進する。

10

【0595】

例えば、エピトープ含有ペプチドのカクテルを、PBMCにエキソビボで投与するか、またはそれから単離したDCを投与する。DCの回収を容易にするための医薬(例えば、ProgenipoinetinTM(Monsanto, St. Louis, MO)またはGM-CSF/IL-4)を用い得る。ペプチドを用いてDCをパルスした後、および患者への再注入の前に、このDCを洗浄して、結合していないペプチドを除去する。

【0596】

臨床的に理解され、そして臨床的結果に基づいて当業者により容易に決定されるように、患者に再注入されるDCの数は変化し得る(例えば、Nature Med. 4:328、1998; Nature Med. 2:52、1996およびProstate 32:272、1997を参照のこと)。患者1人あたり2~50×10⁶個のDCを代表的に投与するが、より多い数のDC(例えば、10⁷または10⁸)もまた、提供し得る。そのような細胞集団は、代表的に、50%~90%の間のDCを含む。

20

【0597】

いくつかの実施形態において、ペプチド負荷したPBMCを、DCを精製することなく患者に注射する。例えば、薬剤(例えば、ProgenipoinetinTM)での処理の後に産生されたPBMCを、DCを精製することなく患者に注射する。投与されるPBMCの総数は、しばしば、10⁸~10¹⁰の範囲をとる。一般的に、患者に注射される細胞用量は、例えば、特異的な抗DC抗体を用いる免疫蛍光分析により決定されるような、各々の患者の血液中のDCのパーセンテージに基づく。従って、例えば、ProgenipoinetinTMが所定の患者の末梢血液中の2%のDCを動員し、そしてその患者が5×10⁶DCを受容している場合、この患者に、合計2.5×10⁸ペプチド負荷したPBMCを注射する。薬剤(例えば、ProgenipoinetinTM)により動員されたDC%は、代表的に、2~10%の間であると評価されるが、当業者に理解されるように変化し得る。

30

【0598】

(エキソビボでのCTL/HTL応答の活性化)

あるいは、161P2F10B抗原に対するエキソビボでのCTL応答またはHTL応答は、DCのようなAPCの供給源および免疫原性ペプチドと共に、患者の、または遺伝的に適合性のCTL前駆体細胞またはHTL前駆体細胞を、組織培養中でインキュベーションすることによって誘導され得る。適切なインキュベーション時間(典型的には約7~28日間)後、その前駆細胞は活性化され、そしてエフェクター細胞中へと拡大される。このエフェクター細胞は患者中に注入され、特異的標的細胞(すなわち、腫瘍細胞)を破壊する(CTL)かまたは破壊を促進する(HTL)。

40

【0599】

(実施例33：モチーフ保有ペプチドの同定および確認の代替方法)

モチーフ保有ペプチドを同定および確認する別の方法は、規定されたMHC分子を保有する細胞からそのペプチドを溶出することである。例えば、組織型決定に使用されるEB

50

Vで形質転換されたB細胞株は、どのHLA分子をこれらが発現するかを決定するように広範に特徴付けられている。特定の場合において、これらの細胞は、HLA分子の単一のみを発現する。これらの細胞は、目的の抗原（例えば、161P2F10B）を発現する核酸でトランスフェクトされ得る。次いで、トランスフェクションの結果として産生されるペプチドの内因性抗原プロセッシングによって産生されるペプチドは、細胞内のHLA分子に結合し、そして輸送されて細胞表面に提示される。次いで、温和な酸条件にさらすことによって、ペプチドをHLA分子から溶出し、そしてこれらのアミノ酸配列を、例えば、質量分析（例えば、Kubora, J. Immunol. 152:3913, 1994）を使用して決定する。特定のHLA分子に結合するペプチドの大部分はモチーフを保有しているために、これは、細胞上で発現される特定のHLA分子と関連するモチーフ保有ペプチドを得るための代替の様式である。

10

【0600】

あるいは、内在性HLA分子を発現しない細胞株が、単一のHLA対立遺伝子をコードする発現構築物でトランスフェクトされ得る。次いで、これらの細胞は、記載されるように使用され得る（すなわち、これらの細胞は、細胞表面上に提示された161P2F10Bに対応するペプチドを単離するために、161P2F10Bをコードする核酸でトランスフェクトされ得る）。このような分析から得られたペプチドは、細胞中で発現される単一のHLA対立遺伝子への結合に対応するモチーフを保有する。

【0601】

当業者に理解されるように、1つより多いHLA対立遺伝子を保有する細胞における同様の分析、そしてそれに続く発現された各々のHLA対立遺伝子に対して特異的なペプチドの決定が実施され得る。さらに、当業者はまた、タンパク質抗原でのローディングのようなトランスフェクション以外の手段が、細胞に対する抗原供給源の提供のために使用され得ることを認識する。

20

【0602】

（実施例34：相補性ポリヌクレオチド）

161P2F10Bコード配列またはその任意の部分に相補的な配列を使用して、天然に存在する161P2F10Bの発現を検出するか、減少するか、または阻害する。約15～30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用が記載されるが、より小さい配列フラグメントまたはより大きい配列フラグメントを用いて実質的に同一の手段を使用する。適切なオリゴヌクレオチドが、例えば、OLIGO4.06ソフトウェア（National Biosciences）および161P2F10Bのコード配列を使用して設計される。転写を阻害するために、相補性オリゴヌクレオチドを、最も独特な5'側配列から設計し、そしてその相補オリゴヌクレオチドを使用して、コード配列へのプロモーターの結合を阻止する。翻訳を阻害するために、相補性オリゴヌクレオチドを設計して、161P2F10Bをコードする転写産物へのリボソーム結合を阻止する。

30

【0603】

（実施例35：161P2F10B特異的抗体を使用する、天然に存在する161P2F10Bまたは組換え161P2F10Bの精製）

天然に存在する161P2F10Bまたは組換え161P2F10Bを、161P2F10Bに特異的な抗体を使用して、免疫親和性クロマトグラフィーによって実質的に精製する。免疫親和性カラムを、活性化されたクロマトグラフィー樹脂（例えば、CNBr-活性化SEPHAROSE（Amersham Pharmacia Biotech））に抗161P2F10B抗体を共有結合させることによって構築する。この結合後、樹脂をブロックし、そして製造者の指示書に従って洗浄する。

40

【0604】

161P2F10Bを含む媒体を、免疫親和性カラムを通過させ、そしてそのカラムを161P2F10Bを優先的に吸着する条件下（例えば、界面活性剤の存在下における高イオン強度緩衝液）で洗浄する。このカラムを、抗体/161P2F10Bの結合を妨害する条件下（例えば、pH2～pH3の緩衝液、または高濃度のカオトロップ（例えば、

50

尿素またはチオシアネートイオン))で溶出し、そしてGCR・Pを回収する。

【0605】

(実施例36: 161P2F10Bと相互作用する分子の同定)

161P2F10Bまたは生物学的に活性なそのフラグメントを、121 1 Bolton-Hunter試薬で標識する。(例えば、Boltonら(1973) Biochem. J. 133: 529.を参照のこと。)マルチウエルプレートのウェル中に事前に並べられた候補分子を、標識した161P2F10Bとともにインキュベートし、洗浄し、そして標識された161P2F10B複合体を含む任意のウェルをアッセイする。異なる濃度の161P2F10Bを使用して得られたデータを使用して、161P2F10Bの数、親和性、および161P2F10Bと候補分子との会合の値を算出する。

10

【0606】

(実施例37: 161P2F10B腫瘍増殖促進についてのインビボアッセイ)

腫瘍細胞増殖に対する161P2F10Bタンパク質の効果、腫瘍保有マウスでの遺伝子の過剰発現によってインビボで評価する。例えば、SCIDマウスに、 1×10^6 個の、PC3細胞、TSUPR1細胞、またはDU145細胞のいずれか(tkNeo空ベクター(empty vector)または161P2F10Bを含む)を、各側腹部に皮下注射する。以下の少なくとも2つのストラテジーを使用し得る:(1)ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス(UK2, 211, 504(1989年7月5日公開))、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス2)、ウシバピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られる構築プロモーター、または異種哺乳動物プロモーター(例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター)(これらのプロモーターが宿主細胞系と適合性である限り)から得られる構築プロモーターのようなプロモーターの制御下での構成的161P2F10Bの発現、ならびに(2)誘導性ベクター系(例えば、エクジソン、tetなど)の制御下での調節された発現(これらのプロモーターが宿主細胞系と適合性である限り)。次いで、腫瘍体積を、明らかな腫瘍の出現においてモニターし、経時的に追跡する。その後、161P2F10B発現細胞がより早い速度で増殖し、161P2F10B発現細胞によって産生される腫瘍が変化した攻撃性(例えば、増強した転移、血管新生、化学療法薬物に対する減少した応答)の特徴を示すことを、確認する。

20

30

【0607】

さらに、マウスに 1×10^5 個の同じ細胞を同所移植して、161P2F10Bが、前立腺における局所増殖に対する効果、および/またはその細胞が、例えば、肺、リンパ節、および骨髄に特異的に転移する能力に対する効果を有するか否かを決定し得る。

【0608】

このアッセイはまた、候補治療組成物(例えば、低分子薬物、161P2F10B細胞内発現抗体(intrabody)、161P2F10Bアンチセンス分子およびリボザイム)の161P2F10B阻害効果を決定するために有用である。

【0609】

(実施例38: インビボにおける前立腺腫瘍の161P2F10Bモノクローナル抗体媒介性阻害)

40

癌組織における161P2F10Bの有意な発現は、細胞表面発現を伴う正常組織におけるその制限された発現とともに、161P2F10Bを、抗体治療の優れた標的にする。同様に161P2F10Bは、T細胞ベースの免疫治療のための標的である。従って、ヒト前立腺癌異種移植片マウスモデルにおける抗161P2F10B mAbの治療有効性を、アンドロゲン非依存性LAPC-4異種移植片およびLAPC-9異種移植片(Craft, N.ら、Cancer Res, 1999, 59(19)5030-6頁)、腎臓癌異種移植(AGS-K3、AGS-K6)、リンパ節への腎臓癌異種転移(AGS-K6 met)、および161P2F10Bでトランスフェクションした腎臓癌細胞株(例えば、769P-161P2F10B、A498-161P2F10B)を使用すること

50

により評価する。

【0610】

腫瘍増殖および転移形成に対する抗体効果は、例えば、マウスの同所前立腺癌異種移植モデルおよび腎臓異種移植モデルにおいて研究される。この抗体は、本実施例において考察されるように非結合型であっても、または当該分野に理解されるように、治療様式に組み合わされてもよい。抗161P2F10B mAbは、アンドロゲン依存性LAPC-9腫瘍異種移植片およびアンドロゲン依存性PC3-161P2F10B腫瘍異種移植片の両方の形成を阻害する。抗161P2F10B mAbはまた、樹立された同所性腫瘍の増殖を遅らせ、そして腫瘍保有マウスの生存を延長させる。これらの結果は、前立腺癌の局在的段階および進行した段階の処置における抗161P2F10B mAbの有用性を示す(例えば、Saffran, D.ら, PNAS 10:1073-1078またはworld wide web URL pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698を参照のこと)。同様に、抗161P2F10B mAbは、SCIDマウスにおけるAGS-K3腫瘍およびAGS-K6腫瘍の形成を阻害し得、そしてA498-161P2F10B腫瘍異種移植片の増殖を妨害または遅延し得る。

10

【0611】

抗161P2F10B mAbの投与は、樹立された同所性腫瘍増殖を遅らせ、そして離れた部位への転移を阻害し、腫瘍保有マウスの生存の有意な延長を生じる。これらの研究は、161P2F10Bが、免疫治療のための魅力的な標的であることを示し、そして局所性および転移性の前立腺癌の処置のための抗161P2F10B mAbの治療用途を示す。この実施例は、SCIDマウス中で増殖されるヒト前立腺腫瘍異種移植片およびヒト腎臓異種移植片の増殖を阻害するために、非結合体化161P2F10Bモノクローナル抗体が有効であることを示す。

20

【0612】

(複数の非結合体化161P2F10B mAbを使用する腫瘍阻害)

(材料および方法)

(161P2F10Bモノクローナル抗体):

表題「161P2F10Bモノクローナル抗体(mAb)の生成」の実施例に記載されるように、モノクローナル抗体が、161P2F10Bに対して惹起されるか、または商業的に入手される(例えば、97A6(Coulter Immunotech))。この抗体は、161P2F10Bに結合し得るそれらの能力について、ELISA、ウェスタンブロット、FACS、および免疫沈降によって特徴付けられる。ELISAおよびウェスタン分析によって測定されるような抗161P2F10B mAbについてのエピトープマッピングデータは、161P2F10Bタンパク質上のエピトープを認識する。この97A6抗体は、図2に示される、161P2F10Bタンパク質のアミノ酸393~405に結合する。癌組織および癌細胞の免疫組織化学分析を、これらの抗体を用いて実施する。

30

【0613】

モノクローナル抗体を、プロテインGセファロースクロマトグラフィー腹水またはハイブリドーマ組織培養上清から精製し、PBSに対して透析し、フィルター滅菌し、そして-20で貯蔵する。タンパク質測定をBradfordアッセイ(Bio-Rad, Hercules, CA)によって実施する。治療モノクローナル抗体または個々のモノクローナル抗体の混合物を含むカクテルを調製し、LAPC-9前立腺腫瘍異種移植片の皮下注射または同所注射を受けるマウスの処置のために使用する。

40

【0614】

(癌異種移植片および細胞株)

LAPC-9異種移植片(野生型アンドロゲンレセプターを発現し、そして前立腺特異的抗原(PSA)を産生する)を、皮下トロカール移植により、6~8週齢の雄性ICR重症複合免疫不全(SCID)マウス(Taconic Farms)において継代する

50

(Craft, N.ら、前出)。AGS-K3腎臓異種移植片およびAGS-K6腎臓異種移植片をまた、6~8週齢のSCIDマウスに皮下移植することによって継代した。腫瘍細胞の単一細胞懸濁液を、Craftらに記載されるように調製する。前立腺癌細胞株PC3(American Type Culture Collection)を、L-グルタミン酸および10%FBSを補充したRPMI中で維持する。腎臓癌細胞株A498(American Type Culture Collection)を、L-グルタミン酸および10%FBSを補充したDMEM中で維持する。

【0615】

PC3-161P2F10B細胞集団およびA498-161P2F10B細胞集団を、Hubert, R.S.ら, STEAP: A Prostate-specific Cell-surface Antigen Highly Expressed in Human Prostate Tumors (Proc Natl Acad Sci U S A, 1999.96(25):14523-8頁)に記載されるようにレトロウイルス遺伝子の移入によって作製する。抗161P2F10B染色を、FITC結合抗体ヤギ抗マウス抗体(Southern Biotechnology Associates)を使用し、次いでCoulter Epics-XLフローサイトメーターで分析することにより検出する。

10

【0616】

(異種移植片マウスモデル)

皮下(s.c.)腫瘍を、雄SCIDマウスの右脇腹に、Matrigel(Collaborative Research)と1:1の希釈で混合された 1×10^6 個のLAPC-9細胞、AGS-K3細胞、AGS-K6細胞、PC3細胞、PC3-161P2F10B細胞、A498細胞またはA498-161P2F10B細胞を注射することによって作製する。腫瘍形成に対する抗体効果を試験するために、i.p.抗体注射を、腫瘍細胞注射と同じ日に開始する。コントロールとして、マウスに、精製マウスIgG(ICN)もしくはPBS;またはヒト細胞中に発現されない無関係の抗原を認識する精製モノクローナル抗体のいずれかを注射する。予備研究において、腫瘍増殖におけるマウスIgGまたはPBSの間に差異は見られない。腫瘍サイズは、ノギス測定によって決定され、そして腫瘍体積は、長さ×幅×高さとして算出される。1.5cmよりも大きい直径のs.c.腫瘍を有するマウスを屠殺する。PSAレベルを、PSA ELISAキット(Anogen, Mississauga, Ontario)を使用することにより決定する。抗161P2F10B mAbの循環レベルを、捕捉ELISAキット(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)により決定する。(例えば、Saffran, D.ら, PNAS 10:1073-1078またはworld wide web URL pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698を参照のこと)。

20

30

【0617】

同所前立腺注射をケタミン/キシラジンを使用することによって、麻酔下で実施する。同所性研究のために、膀胱および精嚢を露出するために腹筋を切って切開し、次いで前立腺背部を露出するために切開を通す。Matrigelと混合されたLAPC-9細胞(5×10^5 個)を10 μ l容量で各後葉に注射する。腫瘍成長をモニターするために、PSAレベルを測定するために1週間おきにマウスを採血する。腎臓同所性モデルのために、腹筋から腎臓を露出するように切開を行った。Matrigelと混ぜたAGS-K3またはAGS-K6細胞は、腎臓膜下に注射した。そのマウスを、適切な処置のためにグループ分けし、抗161P2F10BまたはコントロールmAbを腹腔内に注射する。

40

【0618】

(抗161P2F10B mAbは、161P2F10B発現異種移植片癌腫瘍の増殖を阻害する)

腫瘍形成に対する抗161P2F10B mAbの効果を、LAPC-9同所性モデルおよび/またはAGS-K3同所性モデルを使用して試験する。s.c.腫瘍モデルと比

50

較して、同所性モデルは、マウスの前立腺または腎臓における腫瘍細胞の直接的な注射を必要とし、局所的腫瘍増殖、遠位部位への転移の発達、マウスの健康の悪化、およびそれに続く死を生じる (Saffran, D.ら, PNAS (前出); Fu, X.ら, Int J Cancer, 1992.52(6): p.987-90; Kubota, T., J Cell Biochem, 1994.56(1): 4-8頁)。この特徴は、同所性モデルをヒトの疾患進行にとってより代表的にし、そして臨床的に関連する終点におけるmAbの治療効果を追跡することを可能にする。

【0619】

従って、腫瘍細胞をマウスの前立腺、腎臓に注射し、そして2日後、このマウスを2つのグループに分けてa) 200~500 µg)の抗161P2F10B Ab、またはb) PBSのいずれかで、2~5週間の間、1週間に3度処置する。

10

【0620】

同所性前立腺癌モデルの主要な利点は、転移の発達を研究するための能力である。樹立された同所性腫瘍を保有するマウス中の転移の形成は、LAPC-9異種移植片において高レベルで発現される前立腺特異的細胞表面タンパク質STEAPに対する抗体を使用して肺切片におけるIHC分析によって研究される (Hurbert, R.S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999.96(25): 14523-8頁)。

【0621】

樹立された同所性LAPC-9腫瘍を保有するマウスは、4週間にわたって抗161P2F10B mAbまたはPBSのいずれかの1000 µg注射を投与される。両方のグループのマウスは、高い全身腫瘍負荷(300 ng/mlより高いPSAレベル)を樹立し得、マウスの肺における高頻度の転移形成を確実にさせる。次いで、マウスを殺傷し、それらの前立腺/腎臓および肺をIHC分析によって腫瘍細胞の存在について分析する。

20

【0622】

これらの研究は、異種移植片マウスモデル中の前立腺癌の発生および進行における、抗161P2F10B抗体の広範な抗腫瘍効果を示す。抗161P2F10B抗体は、アンドロゲン依存性前立腺腫瘍およびアンドロゲン非依存性前立腺腫瘍の両方の腫瘍形成を阻害し、既に樹立された腫瘍の増殖を遅らせ、処置されたマウスの生存を延長させる。さらに、抗161P2F10B mAbは、大きい全身腫瘍負荷の存在下でさえも局所的な前立腺腫瘍の、遠位部位への拡散に対して劇的な阻害効果を示す。同様の治療効果が、腎臓ガンモデルにおいて観察される。従って、抗161P2F10B mAbは、主要な臨床的に関連する終点(腫瘍増殖)、生存性の延長および健康に対して効果的である。

30

(実施例39: ヒトにおける抗161P2F10B抗体の治療的使用および診断的使用)

抗161P2F10Bモノクローナル抗体は安全であり、ヒトにおける診断、予防、予後および/または治療目的のために有効に使用される。抗161P2F10B mAbを使用した、癌組織および癌異種移植のウェスタンブロットおよび免疫組織化学的分析は、癌において強く広範囲の着色が示されるが、正常組織において有意に低いかまたは検出不可能なレベルである。癌および転移疾患における161P2F10Bの検出は、診断指標および/または予後指標としてのmAbの有用性を示す。抗161P2F10B抗体は、従って診断適用(例えば、疑わしい患者からの癌を検出するための腎臓生体標本の免疫組織学)において使用される。

40

【0623】

フローサイトメトリーで検出されるように、抗161P2F10B mAbは、特異的に癌細胞に結合する。従って、抗161P2F10B抗体は、161P2F10Bの発現を示す局所性癌および転移の検出のために診断的全身画像化適用(例えば、放射免疫シンチグラフィおよび放射免疫治療)において使用される(例えば、Potamianos Sら, Anticancer Res 20(2A): 925~948(2000)を参照のこと)。161P2F10Bの細胞外ドメインの細胞外環境への発散または放出(例えば、アルカリホスファターゼB10に見られる(Meerson, N, R, Hepat

50

ology 27:563~568(1998))は、疑わしい患者からの血清および/または尿サンプルにおいて、抗161P2F10B抗体による161P2F10Bの診断的検出を可能にする。

【0624】

161P2F10Bを特異的に結合する抗161P2F10B抗体は、161P2F10Bを発現する癌の処置のために、治療的な適用において使用される。抗161P2F10B抗体は、非結合モダリティーおよび、抗体が当該分野で周知の様々な治療的モダリティーまたは画像化モダリティーの1つと結合される、結合モダリティー(例えば、プロドラッグ、酵素または放射性同位体)として使用される。前臨床の研究において、非結合および結合抗体は、SCIDマウス癌異種移植モデル(例えば、腎臓癌モデルAGS-K3およびAGS-K6)における腫瘍予防および成長阻害の効能について試験される(例えば、「161P2F10B Monoclonal Antibody-Mediated Inhibition of Bladder and Lung Tumors In Vivo」と題される実施例を参照のこと)。結合抗161P2F10B抗体および非結合抗161P2F10B抗体のいずれかは、ヒト臨床試験における治療的モダリティーとして単独、または以下の実施例において記載されるような他の治療と組み合わせのいずれかで使用される。

(実施例40:インビボでのヒト抗161P2F10B抗体の使用を介した、ヒト癌腫の処置および診断のためのヒト臨床試験)

161P2F10B上のエピトープを認識する抗体を本発明に従って使用し、そしてこの抗体を、表1に列挙されるような特定の腫瘍の処置において使用する。多数の因子(161P2F10B発現レベルを含む)に基づいて、表1に列挙されるような腫瘍は、現在好ましい指標である。これらの指標の各々と関連して、3つの臨床的アプローチを、首尾よく実行する。

I.) 補助的治療: 補助的治療において、患者を、化学療法剤もしくは抗新生物剤および/または放射線療法と組み合わせて、抗161P2F10B抗体で処置する。表Iに列挙されるような原発性癌標的を、第一の系および第二の系の標準的な治療に、抗161P2F10B抗体を付加することによって、標準的なプロトコルの下で処置する。プロトコルの設計は、腫瘍塊の減少によって評価されるような有効性および通常量の標準的な化学療法を低減する能力を扱う。これらの投薬量の低減は、化学療法剤の用量関連毒性を低減することによって、さらなる治療および/または延長された治療を可能にする。抗161P2F10B抗体は、化学療法剤または抗新生物剤のアドリアマイシン(進行した前立腺癌腫)、シスプラチン(進行した頭部および頸部の癌腫、ならびに肺癌腫)、タキソール(乳癌)およびドキシソルピシン(臨床前)と組み合わせて、いくつかの補助的臨床試験において利用される。

II.) 単独療法(monotherapy): 腫瘍の単独療法における抗161P2F10B抗体の使用に関連して、これらの抗体は、化学療法剤も抗新生物剤も伴わずに、患者に投与される。1実施形態において単独療法は、広範な転移性疾患に罹患する、末期の癌患者において、臨床的に実施される。患者は、いくらかの疾患安定化を示す。試験は、癌性腫瘍を有する治療抵抗性患者において有効性を実証する。

III.) 造影剤: 放射性核種(例えば、ヨウ素またはイットリウム(I^{131} 、 Y^{90}))を抗161P2F10B抗体に結合させることによって、放射性標識した抗体を、診断剤および/または造影剤として利用する。このような役割において、標識された抗体は、固形腫瘍ならびに161P2F10B発現細胞の転移性病変の両方に局在する。造影剤としての抗161P2F10B抗体の使用に関連して、これらの抗体は、手術前スクリーニングならびにどの腫瘍が残存および/または復帰するかを決定するための術後追跡の両方として、固形腫瘍の外科的処置の補助として使用される。1実施形態において、(^{111}In)161P2F10B抗体を、161P2F10Bを発現する癌腫を有する患者における、第I相ヒト臨床試験において造影剤として使用する(類推として、例えば、Divgiら、J.Natl.Cancer Inst. 83:97-104(1991)を

10

20

30

40

50

参照のこと)。患者を、標準的な前方線カメラおよび後方線カメラで追跡する。これらの結果は、原発性病変および転移性病変が同定されることを示す。

【0625】

(投与用量および投与経路)

当業者によって理解されるように、投薬考慮は、診療所において存在する類似の製品と比較して決定され得る。従って、抗161P2F10B抗体は、5～400 mg/m²の範囲の投薬量で投与され得、例えば、安全性試験に関しては、より低い投薬量で使用される。その標的に対する既知の抗体の親和性と比較した抗161P2F10B抗体の親和性は、類似の投薬量レジメンを決定するために当業者によって使用される1つのパラメーターである。さらに、完全にヒト抗体である抗161P2F10B抗体は、キメラ抗体と比較する場合、よりゆっくりしたクリアランスを有する；従って、このような完全なヒト抗体である抗161P2F10B抗体を用いる、患者における投薬は、おそらく50～300 mg/kgの範囲において、より低くあり得、なお有効なままであり得る。mg/kgでの従来容量測定と反対に、mg/m²での投薬は、表面積に基づく測定であり、そして幼児から成人までの全てのサイズの患者を含むように設計された便利な投薬測定である。

10

【0626】

3つの別個の送達アプローチが、抗161P2F10B抗体の送達に有用である。従来の静脈内送達は、多くの腫瘍についての1つの標準的な送達技術である。しかし、腹腔内の腫瘍(例えば、卵巣、胆管、他の管などの腫瘍)に関して、腹腔内投与は、腫瘍において高い用量の抗体を得るために、そしてまた抗体クリアランスを最小にするために好都合であることを証明し得る。同様の様式で、特定の固形腫瘍は、局所的灌流に適切な脈管構造を有する。局所的灌流は、腫瘍部位における抗体の高い用量を可能にし、そして抗体の短期クリアランスを最小にする。

20

【0627】

(臨床的開発計画(CDP))

概論：CDPは、補助的治療、単独療法に関して、および造影剤として、抗161P2F10B抗体の処置を追跡および開発する。試験は、最初に安全性を実証し、その後反復投薬で効力を確認する。試験は、標準的な化学療法を、標準的治療+抗161P2F10B抗体と比較する、オープンラベルである。理解されるように、患者の登録に関して利用され得る1つの基準は、生検によって決定されるような、患者の腫瘍における161P2F10Bの発現レベルである。

30

【0628】

任意のタンパク質または抗体注入ベースの治療を用いるときのように、安全性の考慮は、主に以下に関連する：(i)サイトカイン放出症候群(すなわち、低血圧、発熱、振せん(shakings)、悪寒；(ii)物質に対する免疫応答の発生(すなわち、患者による、抗体療法に対するヒト抗体の惹起、またはHAAA応答)；および(iii)161P2F10Bを発現する正常細胞に対する毒性。標準的な試験および追跡を、これらの安全性の考慮の各々をモニタリングするために利用する。抗161P2F10B抗体は、ヒト投与の際に安全であることが見出される。

40

【0629】

(実施例41：ヒト抗161P2F10B抗体および化学療法剤を用いる、ヒト臨床試験補助治療)

第I期のヒト臨床試験を、固形腫瘍(例えば、表Iに列挙される組織の癌)の処置に関して、ヒト抗161P2F10B抗体の6つの静脈内用量の安全性を評価するために開始する。この研究において、本明細書中で規定される抗新生物剤または化学療法剤(例えば、シスプラチン、トポテカン、ドキシソルピシン、アドリアマイシン、タキソールなどであるが、これらに限定されない)に対する補助的治療として利用される場合、抗161P2F10B抗体の単回用量の安全性を、評価する。試験設計は、抗161P2F10B抗体の6つの単回用量の送達を含み、抗体の投薬量は、以下のスケジュールに従う処置過程に

50

わたって、ほぼ約 25 mg / m² から約 275 mg / m² まで増大する：

【0630】

【数3】

0日目 7日目 14日目 21日目 28日目 35日目

mAb 用量	25	75	125	175	225	275
	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²
化学治療剤 (標準用量)	+	+	+	+	+	+

10

抗体および化学治療剤のそれぞれの投与後、患者を1週間密接に追跡する。特に、上記の安全性の問題：(i) サイトカイン放出症候群(すなわち、低血圧、発熱、振せん(shaking)、悪寒)；(ii) その物質に対する免疫原性応答の発生(すなわち、ヒト抗体治療剤に対する、患者によるヒト抗体の発生、またはH A H A 応答)；ならびに(iii) 161P2F10Bを発現する正常細胞に対する毒性について、患者を評価する。標準的な試験および追跡試験を利用して、これらの安全性の問題のそれぞれをモニターする。患者はまた、臨床結果について、そして特に、MRIまたは他の画像化によって証明されるような腫瘍塊の低減について、評価される。

【0631】

20

この抗161P2F10B抗体は、安全かつ有効であることが実証され、臨床試験の第II期はこの有効性を確認し、そして最適な投薬を洗練する。

【0632】

(実施例42：ヒト臨床試験：ヒト抗161P2F10B抗体を用いる単独治療法(monotherapy))

抗161P2F10B抗体は、上で考察した補助試験に関して安全であり、第II期ヒト臨床試験は、単独治療法についての有効性および最適な投薬を確認する。このような試験が達成され、そして患者が抗161P2F10B抗体の複数の用量を受けると同時に化学療法を受けないこと以外は、上記の補助試験と同じ安全性および結果の分析を包含する。

30

【0633】

(実施例43：ヒト臨床試験：抗161P2F10B抗体を用いる診断的画像化)

繰り返すと、上で考察した補助治療法が上で考察した安全性の判定基準内で安全である場合、ヒト臨床試験は、診断的造影剤としての抗161P2F10B抗体の使用に関して行われる。このプロトコルは、当該分野で記載される様式と実質的に類似の様式で設計される(例えば、Divgiら、J. Natl. Cancer Inst. 83: 97-104 (1991))。この抗体は、診断モダリティとして使用される場合、安全かつ有効であることが見出される。

【0634】

(実施例44：既知配列との161P2F10Bの相同性の比較)

40

161P2F10B遺伝子は、以前にクローニングおよび配列決定された遺伝子、すなわち、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ3(gi 4826896)(Jin-Hua 氏、Genomics 1997, 45: 412)(ホスホジエステラーゼ-I ; gp130RB13-6 ; E-NPP3(ENPP3)、PDNP3およびCD203cとしてもまた公知である)と同一である。161P2F10Bタンパク質は、ヒトエクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ3(gi 4826896)と100%の同一性を示し、そしてラットアルカリホスホジエステラーゼ(gi 1699034)と81%の相同性および89%の同一性を示す。この161P2F10Bタンパク質は、875アミノ酸からなり、算出された分子量は、100.09kDaであり、pIは、6.12である。161P2F10Bは、好塩基性細

50

胞における免疫染色によって (Buhring HJら、Blood 2001, 97: 3303) および表題「Expression of 161P2F10B protein in kidney cancer xenograft tissues」の実施例において示されるような上皮腫瘍細胞における免疫染色によって示されるように、細胞表面タンパク質である。ゴルジ内質画分へのいくらかの局在化もまた、観察されている (Geoffroy Vら、Arch Biochem Biophys. 2001, 387: 154)。ホスホジエステラーゼ3の2つのアイソフォームが同定されており、一方のタンパク質は、そのアミノ末端にてさらなる145アミノ酸を含む (Choi YHら、Biochem J. 2001, 353: 41)。さらに、161P2F10Bの2つの改変体が同定されている。第一の改変体は、161P2F10Bタンパク質のアミノ酸122にて点変異を含み、この位置にて、リジンがアルギニンに変更されている。第二の改変体は、383位にて同定された一塩基多型を含み、その位置にて、トレオニンからプロリンへのアミノ酸の変化を生じる。(World Wide Web上で位置決めされたURL (ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1054222) を参照のこと (図4Aおよび4B)。さらに、本発明者らは、161P2F10Bの別の改変体、すなわち、161P2F10Bv.7を近年同定した。この改変体は、v.1に見出される最初の34アミノ酸を欠損しているため、そのN末端にてこのv.1とは異なる。このN末端の34アミノ酸の欠損は、161P2F10Bv.7の局在化に影響する。PSort分析は、161P2F10Bv.1は形質膜に主に局在化するが、161P2F10Bv.7は細胞膜に主に局在化し(52%)、いくらかは核に局在化する(17%)ことを示している。

10

20

【0635】

モチーフ分析は、いくつかの既知のモチーフ(161P2F10Bタンパク質のアミノ末端にて位置決めされた2-3ソマトスタチンBドメイン、ホスホジエステラーゼドメインおよびC末端におけるエンドヌクレアーゼドメインを含む)の存在を示した。161P2F10Bは、PDNP1、PDNP2およびPDNP3からなる、密接に関連したホスホジエステラーゼのファミリーに属する (Bollen Mら、Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2000, 35: 393)。このファミリーの3つ全てのメンバーは、II型タンパク質であり、短いN末端ドメインが細胞内に位置決めされている。これらは、1つの膜貫通ドメイン、触媒性ホスホジエステラーゼドメインおよびC末端ヌクレアーゼドメインを含む。

30

【0636】

ホスホジエステラーゼ3発現は、ヒト新生物細胞、神経膠腫細胞、および形質転換リンパ球において検出されている (Murata Tら、Anticancer Drugs 2001, 12: 79; Andoh Kら、Biochim Biophys Acta 1999, 1446: 213; Ekholm Dら、Biochem Pharmacol 1999, 58: 935)。

【0637】

ホスホジエステラーゼ3は、いくつかの生物学的プロセス(ヌクレオチドの放出、細胞分化、物質代謝、細胞増殖、生存、血管形成および細胞運動を含む)において重要な役割を果たす (Bollen Mら、Crit. Rev. Biochem Mol. Biol. 2000, 35: 393; Rawadi Gら、Endocrinol 2001, 142: 4673; DeFouw Lら、Microvasc Res 2001, 62: 263)。さらに、ホスホジエステラーゼ3は、内皮細胞における遺伝子発現(重要な接着分子(例えば、VCAM-1)の発現を含む)を調節する (Blease Kら、Br J Pharmacol. 1998, 124: 229)。

40

【0638】

この情報は、161P2F10Bが哺乳動物細胞の成長において役割を果たし、細胞生存および細胞運動を支持し、そして核における事象を調節することによって遺伝子転写を調節することを示す。従って、161P2F10Bが、細胞の形質転換、腫瘍形成のレギ

50

ユレーターとしてまたは炎症、腫瘍形成もしくは増殖に関連する遺伝子の活性化に關与する転写のモジュレーターとして機能する場合、161P2F10Bは、治療目的、診断目的、予後目的および/または予防目的のために使用される。さらに、分子(例えば、161P2F10Bの改変体、多型またはSNP)が、表Iに列挙される組織のような、癌組織で発現される場合、それらは、治療目的、診断目的、予後目的および/または予防目的のために使用される。

【0639】

(実施例45: 転写の調節)

161P2F10Bの細胞表面局在化およびVCAM発現を調節する能力は、161P2F10Bが、真核生遺伝子の転写調節の調節因子として有効に使用されることを示す。遺伝子発現の調節を、例えば、161P2F10Bを発現するかまたは欠損する細胞における遺伝子発現を研究することによって確認する。この目的のために、2つの型の実験を行う。

10

【0640】

第1のセットの実験において、親細胞および161P2F10B発現細胞由来のRNAを、抽出し、そして市販される遺伝子アレイ(Clontech)にハイブリダイズさせる(Smid-Koopman Eら、Br J Cancer. 2000. 83: 246)。休止細胞とFBSまたはアンドロゲンで処理した細胞とを比較する。差次的に発現した遺伝子を、当該分野で公知の手順に従って同定する。次いで、差次的に発現した遺伝子を、生物学的経路にマッピングする(Chen Kら、Thyroid. 2001. 11: 41.)。

20

【0641】

第2のセットの実験において、特定の転写経路活性化を、市販のルシフェラーゼレポーター構築物(NF- κ B-luc、SRE-luc、ELK1-luc、ARE-luc、p53-lucおよびCRE-lucを含む)(Stratagene)を使用して評価する。これらの転写レポーターは、十分に特徴付けられたシグナル伝達経路の下流に位置する公知の転写因子に対するコンセンサスな結合部位を含み、そして経路活性化を確かめるためならびに経路活性化のポジティブなモジュレーターおよびネガティブなモジュレーターについてスクリーニングするための良好なツールを表す。従って、161P2F10Bは、遺伝子調節における役割を果たし、そして診断目的、予後目的、予防目的および/または治療目的のための標的として使用される。

30

【0642】

(実施例46: 潜在的なシグナル伝達経路の同定および確認)

多くの哺乳動物のタンパク質は、シグナル伝達分子と相互作用し、そしてシグナル伝達経路の調節に關与することが報告されている(J Neurochem. 2001; 76: 217-223)。特に、GPCRは、MAKカスケードおよびGタンパク質を活性化させることが報告されており、かつ内皮細胞におけるEGFR経路に關連している(Nor, Zら、Trends Endocrinol Metab. 2000, 11: 91; Vacca Fら、Cancer Res. 2000, 60: 5310; Della Rocca GJら、J Biol Chem. 1999, 274: 13978)。免疫沈降技術およびウェスタンブロットティング技術を使用して、161P2F10Bと結合し、かつシグナル伝達事象を媒介するタンパク質を同定する。リン脂質経路(例えば、PI3K、AKTなど)、接着経路および移動経路(FAK、Rho、Rac-1などを含む)、ならびにERK、p38などのような有糸分裂/生存カスケードを含む、癌の生物学において役割を果たすことが知られるいくつかの経路が、161P2F10Bによって調節され得る(Cell Growth Differ. 2000, 11: 279; J Biol Chem. 1999, 274: 801; Oncogene. 2000, 19: 3003; J Cell Biol. 1997, 138: 913)。

40

【0643】

161P2F10Bが細胞内で、直接的または間接的に既知のシグナル伝達経路を活性

50

化することを確認するために、個々の遺伝子を発現する細胞において、ルシフェラーゼ (Luc) ベースの転写レポーターアッセイを行う。これらの転写レポーターは、十分に特徴付けられたシグナル伝達経路の下流に位置する、既知の転写因子に対するコンセンサス結合部位を含む。これらの関連転写因子、シグナル伝達経路および活性化刺激のレポーターおよび例を、以下に列挙する。

【0644】

1. NF- κ B-Luc、NF- κ B/Rel; I- κ B-キナーゼ/SAPK; 増殖/アポトーシス/ストレス

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

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

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

5. p53-Luc、p53; SAPK; 増殖/分化/アポトーシス

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

【0645】

遺伝子媒介性の影響を、mRNA発現を示す細胞においてアッセイし得る。ルシフェラーゼレポータープラスミドを、脂質媒介性トランスフェクション (TFX-50、Promega) によって導入し得る。細胞抽出物をルシフェリン基質と共にインキュベートすることによって、相対的な転写活性の指標であるルシフェラーゼ活性を測定し、そしてこの反応の発光をルミノメーターでモニタリングする。

【0646】

161P2F10Bによって活性化されるシグナル伝達経路をマッピングし、そして治療標的の同定および確認のために使用する。161P2F10Bが細胞シグナル伝達に関与する場合、これは、診断目的、予後目的、予防目的および/または治療目的のための標的として使用される。

【0647】

(実施例47: 腫瘍進行への関与)

161P2F10B遺伝子は、癌細胞の増殖に寄与し得る。腫瘍増殖における161P2F10Bの役割は、種々の初代細胞株およびトランスフェクトした細胞株 (161P2F10Bを安定に発現するよう操作された前立腺細胞株、結腸細胞株、膀胱細胞株および腎臓細胞株、ならびにNIH 3T3細胞が挙げられる) において確認される。161P2F10Bを欠損した親細胞および161P2F10Bを発現する細胞を、十分に記載された増殖アッセイ (Fraser SP, Grimes JA, Djamgoz MB, Prostate. 2000; 44: 61, Johnson DE, Ochieng J, Evans SL. Anticancer Drugs. 1996, 7: 288) を使用して細胞増殖について評価する。

【0648】

形質転換プロセスにおける161P2F10Bの役割を確認するために、コロニー形成アッセイにおいてその影響を調査する。ストリンジェントな条件下およびより許容的な条件下での軟寒天アッセイ (Song Z. Cancer Res. 2000; 60: 6730) を使用して、161P2F10Bを欠損した親NIH 3T3細胞を、161P2F10Bを発現するNIH 3T3細胞と比較する。

【0649】

癌細胞の侵襲および転移における161P2F10Bの役割を確認するために、十分に確立されたアッセイ (例えば、Transwell Insert Systemアッセイ (Becton Dickinson) (Cancer Res. 1999, 59: 6010)) を使用する。コントロール細胞 (161P2F10Bを欠損する前立腺細胞株、結腸細胞株、膀胱細胞株および腎細胞株を含む) を、161P2F10Bを発現する細

10

20

30

40

50

胞と比較する。細胞に、蛍光染料（カルセイン）をロードし、そして細胞を基底膜アナログでコートされた Transwell insert の上部ウェルにプレATINGする。侵襲を、細胞集団全体の蛍光に対する、下方チャンパー中の細胞の蛍光によって決定する。このアプローチを使用して、本発明者らは、161P2F10Bが、基底膜アナログマトリゲルを通る3T3細胞の侵襲を誘導することを実証した（図22）。図22に示されるように、161P2F10Bを発現しない3T3-neo細胞は、無視できるレベルのマトリゲルを通る侵襲を示す。3T3-neo細胞と比較して、豊富なレベルの161P2F10Bを発現する3T3-161P2F10B細胞（図16）は、マトリゲルを通過して侵襲し、そして強力なプロトオンコジーン12V-Rasを発現する細胞で観察されるのと類似の様式で、トランスウェル（transwell）システムの下方向チャンパーへと移動する。

10

【0650】

161P2F10Bはまた、細胞周期およびアポトーシスにおいて役割を果たし得る。親細胞および161P2F10Bを発現する細胞を、十分に確立されたBrdUアッセイ（Abdel-Malek Z.A. J Cell Physiol. 1988, 136: 247）を使用して、細胞周期調節における差異について比較する。簡単に言えば、細胞を、最適な条件下（十分な血清）および限定された条件下（低血清）の両方で増殖させ、BrdUで標識し、そして抗BrdU Abおよびヨウ化プロピジウムで染色する。細胞を、細胞周期のG1期、S期およびG2M期への進入について分析する。

【0651】

20

正常細胞とは対照的に、癌細胞は、ストレス、増殖因子剥奪およびアポトーシス促進性シグナルに耐え、それによって、増殖および生存の利点を有する腫瘍を提供することが示されている。アポトーシスに対するストレスの影響を、アネキシンV結合およびカスパーゼ活性化を含む標準的なアッセイ方法を用いて、コントロール親細胞および161P2F10Bを発現する細胞（正常および腫瘍性の前立腺細胞、結腸細胞および肺細胞を含む）において評価する（Moore Aら、Methods Cell Biol. 1998, 57: 265; Porter AG, Janicke RU, Cell Death Differ. 1999, 6: 99）。操作された細胞および親細胞を、様々な化学療法剤（例えば、エトポシド、ドキソルビシン）、キナーゼインヒビター（例えば、スタウロスポリン）、DNA損傷剤（例えば、UV）、低酸素およびタンパク質合成インヒビター（例えば、シクロヘキシミド）で処理する。細胞を、アネキシンV-FITCで染色し、そして細胞死をFACS分析によって測定した。図20は、161P2F10Bの発現が、スタウロスポリンまたはUV照射に曝露された3T3細胞のアポトーシスを阻止することを示す。それぞれ、3T3-neo細胞の64%および62%が、スタウロスポリンおよびUV照射に反応してアポトーシスを受けたが、同じ条件下で、161P2F10B発現3T3細胞の14%および30%のみが死亡した。3T3-neo細胞および3T3-161P2F10B細胞株のクローン性集団に対する、スタウロスポリンおよびUVの影響を比較する別の実験においても、類似の結果が得られた（図19）。3T3-161P2F10Bの集団と同様に、クローン3T3-161P2F10B-Cおよび3T3-161P2F10B-10Bは、スタウロスポリン誘導性の細胞死に対して耐性であった。カスパーゼ活性化は、アポトーシスの特徴であり、他の形態の細胞死からアポトーシスを識別するように作用するので、本発明者らは、カスパーゼ活性化をアッセイの読み取りとして使用して、腎臓癌細胞のアポトーシスに対する化学療法剤およびスタウロスポリンの影響を調査した（図21）。通常161P2F10Bを欠く769腎臓腫瘍細胞を、実施例8（上記の、高等真核生物系における組換え161P2F10Bの産生）に記載されるように、161P2F10Bタンパク質を発現するように操作した。これらの細胞を、化学療法剤またはスタウロスポリンで処理し、溶解し、そしてカスパーゼ活性について分析した。図21は、161P2F10Bの発現が、ドキソルビシンまたはスタウロスポリンで処理した161P2F10B発現腎臓癌細胞において、カスパーゼ活性化を阻止することを示す。これらの結果は、161P2F10Bが、腎臓癌細胞において、化学療法薬物

30

40

50

であるドキソルビシンおよびスタウロスポリン誘導性の細胞死に対する耐性を付与することを示す。

【0652】

正常細胞から癌細胞を識別する特徴は、それらが血清非依存的になり、低血清条件下で生存する能力である。161P2F10B発現細胞の生存に対する血清剥奪の影響を、読出しとしてカスパーゼ活性化を使用して研究した。線維芽細胞細胞株Rat-1は、血清が剥奪されると増殖停止し、それによって、正常な非形質転換細胞を模倣する(James L、Eisenman RN、Proc Natl Acad Sci USA、2002、99:10429)。c-Mycを発現するRat-1細胞(Rat-Myc)は、血清剥奪条件下でアポトーシスを受ける(James L、Eisenman RN、Proc Natl Acad Sci USA、2002、99:10429)。Rat-1細胞およびRat-Myc細胞を、161P2F10Bを安定に発現するように操作した。これらの細胞を、0.1%または10%のFBS中で増殖させ、そして顕微鏡およびカスパーゼ活性によって、アポトーシスについて試験した(図17および18)。161P2F10BがRat-Myc細胞中で安定に発現されると、161P2F10Bは、Myc誘導性のアポトーシスを阻害し、そしてカスパーゼ活性をバックグラウンドレベルにまで低減させる。161P2F10Bによる細胞死の阻害は、腫瘍進行および腫瘍負荷を調節する際に重要な役割を果たす。

10

【0653】

161P2F10Bが、細胞の増殖、形質転換、侵襲またはアポトーシスにおいて役割を果たす場合、診断目的、予後目的、予防目的および/または治療目的のための標的として使用される。

20

【0654】

(実施例48：新脈管形成への関与)

新脈管形成または新しい毛細血管形成は、腫瘍増殖に必要である(Hanahan, D.; Folkman, J.; Cell. 1996, 86:353; Folkman J. Endocrinology. 1998 139:441)。内皮細胞に対するホスホジエステラーゼインヒビターの影響、および他のENPPファミリーメンバーに対する161P2F10Bのホモログの影響に基づいて、161P2F10Bは、新脈管形成において役割を果たす(DeFouw Lら、Microvasc Res 2001、62:263)。いくつかのアッセイが、インビトロおよびインビボでの新脈管形成を測定するために開発された(例えば、内皮細胞管形成および内皮細胞増殖についての組織培養アッセイ)。これらのアッセイおよびインビトロでの新生血管新生を使用して、新脈管形成における161P2F10Bの役割(増強または阻害)を確認する。

30

【0655】

例えば、161P2F10Bを発現するように操作された内皮細胞を、管形成アッセイおよび増殖アッセイを使用して評価する。161P2F10Bの影響はまた、インビボの動物モデルにおいて確認する。例えば、161P2F10Bを発現するかまたは欠損するいずれかである細胞を、免疫無防備状態マウスの皮下に移植する。内皮細胞の移動および新脈管形成を、5~15日後、免疫組織化学的技術を使用して評価する。同様に、161P2F10Bの分泌された細胞外部分は、新脈管形成因子として機能し得、そして内皮細胞の増殖および管形成を増強し得る。新脈管形成に対する161P2F10Bの細胞外ドメインの影響は、生物学的に活性な分泌された細胞外ドメインを有する他のENPPとの類似性によって支持される。161P2F10Bが新脈管形成に影響する場合、これは、診断目的、予後目的、予防目的および/または治療目的のための標的として使用される。

40

【0656】

(実施例49：タンパク質-タンパク質相互作用への関与)

いくつかのホスホジエステラーゼは、他のタンパク質と相互作用し、それによって遺伝子の転写および細胞増殖を調節することが示されている(Butt Eら、Mol Ph

50

armacol. 1995, 47:340)。免疫沈降技術および酵母ツーハイブリッド系を使用して、161P2F10Bと会合するタンパク質を同定する。161P2F10Bを発現する細胞および161P2F10Bを欠く細胞からの免疫沈降を、特異的なタンパク質 - タンパク質会合について比較する。

【0657】

研究を、エフェクター分子（例えば、核タンパク質、増殖因子、キナーゼ、ホスフェートなど）と161P2F10Bとの会合の程度を確認するために行う。161P2F10Bポジティブ細胞および161P2F10Bネガティブ細胞を比較する研究、ならびに刺激されない細胞/休止細胞および上皮細胞アクチベーター（例えば、サイトカイン、増殖因子、アンドロゲンおよび抗インテグリンAb）で処理された細胞を比較する研究は、特有の相互作用を明らかにする。

10

【0658】

さらに、タンパク質 - タンパク質相互作用を、酵母ツーハイブリッド方法論を使用して確認する（Curr Opin Chem Biol. 1999, 3:64）。転写因子の活性化ドメインに融合したタンパク質のライブラリーを保有するベクターを、161P2F10B - DNA - 結合ドメイン融合タンパク質およびレポーター構築物を発現する酵母へと導入する。タンパク質 - タンパク質相互作用を、比色レポーター活性によって検出する。エフェクター分子と転写因子との特異的会合は、当業者を161P2F10Bの作用様式に導き、従って、癌についての治療的、予後的、予防的および/または診断的標的を同定する。このアッセイおよび類似のアッセイもまた使用して、161P2F10Bと相互作用する低分子を同定し、そしてこのような低分子についてスクリーニングする。従って、161P2F10Bが、タンパク質または低分子と会合することが見出される。従って、161P2F10Bならびにこれらのタンパク質および低分子は、診断的、予防的、予後的および/または治療的目的のために使用される。

20

【0659】

（実施例50：細胞接着への関与）

細胞接着は、組織のコロニー形成および転移に重大な役割を果たす。161P2F10Bは、細胞構築に関与し得、そしてその結果、細胞接着および細胞運動性に関与し得る。161P2F10Bが細胞接着を調節することを確認するために、161P2F10Bを欠損するコントロール細胞を、上記の技術を使用して、161P2F10Bを発現する細胞と比較する（例えば、Haierら、Br. J. Cancer. 1999, 80:1867; LehrおよびPienta, J. Natl. Cancer Inst. 1998, 90:118を参照のこと）。手短かに言えば、1つの実施形態において、蛍光指示薬（例えば、カルセイン）で標識された細胞を、培地単独でか、またはマトリックスタンパク質でコートされた組織培養ウェル上でインキュベートする。接着性細胞を、蛍光定量分析によって検出し、接着のパーセントを計算する。別の実施形態において、161P2F10Bを欠損するかまたは発現する細胞を、それらが上記と類似の実験技術を使用して、細胞 - 細胞接着を媒介する能力について分析する。これらの実験系の両方を使用して、細胞外マトリックスへの細胞接着および細胞 - 細胞相互作用を調節するタンパク質、抗体および/または低分子を同定する。細胞接着は、腫瘍増殖、腫瘍進行およびコロニー形成において重要な役割を果たし、そして161P2F10Bは、これらのプロセスに関与する。従って、これは、診断モダリティー、予後モダリティー、予防モダリティーおよび/または治療目モダリティーのための標的として役立つ。

30

40

【0660】

（実施例51：161P2F10B発現組換え細胞株のホスホジエステラーゼ活性）

161P2F10Bの機能を記述するために、161P2F10Bを欠くいくつかの細胞株を、実施例8（上記の、高等真核生物系における組換え161P2F10Bの産生）に記載されるように、161P2F10Bをコードするレトロウイルスで形質導入した。細胞株を、FACS分析によって、161P2F10Bの細胞表面発現について特徴付けた（図28、図29、図30および図16）。cDNAを、線維芽細胞NIH 3T3お

50

よびRat-1、骨髄腫NSO細胞、ならびに腎臓癌CaKi細胞に安定に導入した。これらの細胞を、抗CD203c mAbで免疫染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。図28、図29、図30および図16は、親細胞が、161P2F10Bを発現できないが、操作された株は、その細胞表面上での161P2F10Bの豊富な発現を実証することを示す。操作された細胞における161P2F10Bの発現を、161P2F10Bを内因的に発現する細胞株であるUT7における発現と比較した(図28)。本発明者らの結果は、操作されたRat-1細胞および3T3細胞が、UT7細胞に匹敵するレベルで161P2F10Bを発現することを示す。

【0661】

161P2F10Bは、細胞外酵素ENPP3ホスホジエステラーゼと同一であり、そしてENPPファミリーのメンバーは、ホスホジエステラーゼ活性を有するので、組換え細胞株をまた、ホスホジエステラーゼ活性について特徴付けた(図28、図29、図30および図16)。コントロール細胞および161P2F10B発現細胞を溶解したか、またはインタクトな細胞を、5mMのMgCl₂および1mMのp-ニトロフェニルチミジン-5'-L-モノホスフェートを含む20mM Tris/HCl(pH9.6)中で、37℃にてインキュベートした。この反応を、0.1NのNaOHの添加によって停止させ、そして反応生成物を、410nmでの吸収を読み取ることによって定量した。図28、図29、図30および図16は、161P2F10Bの発現が、ホスホジエステラーゼ活性と同様であることを示す。野生型または変異体の161P2F10Bのいずれかを発現するCaKi細胞を使用して、本発明者らは、T205の変異が、ホスホジエステラーゼ活性を阻害することを示した(図30)。161P2F10Bがホスホジエステラーゼ活性を示す場合、これは、診断目的、予後目的、予防目的および/または治療目的のための標的として使用される。

【0662】

ホスホジエステラーゼ活性に加えて、ENPPファミリーのメンバーは、リソホスホリパーゼD(LysoPLD)活性を示す(Umezue-Goto Mら、J Cell Biol. 2002、158:227)。特に、ENPP-2(aka自己毒素)は、リソホスファチジルコリン(LCP)に対して作用して、リソホスファチジン酸(LPA)を生じることが見出された(Umezue-Goto Mら、J Cell Biol. 2002、158:227; Tokumura Aら、J Biol. Chem 2002、277:39436)。LPAは、腫瘍の発達に関連する種々の生物学的機能(細胞の増殖および侵襲を含む)に参与する(Gschwind A、Prenzel N、Ulrich A、Cancer Res. 2002、62:6329)。他のENPPファミリーメンバーに対する161P1F10Bの相同性に基づいて、161P2F10Bは、LysoPLD活性を有する。161P2F10B発現細胞のLysoPLD活性を、標準的なコリン放出アッセイを使用して、161P2F10Bを欠く細胞と比較する。簡潔には、細胞溶解物を、LPCと共に37℃で1時間インキュベートする。遊離コリンを、コリンオキシダーゼの添加後に、蛍光光度法によって検出する。161P2F10BがLysoPLD活性を示す場合、これは、診断目的、予後目的、予防目的および/または治療目的のための標的として使用される。

【0663】

(実施例52:RNA干渉(RNAi))

特定の遺伝子の発現を減少させるかまたは無くしてしまういくつかの方法が、腫瘍の増殖および進行におけるその遺伝子の重要性を確認するために使用されている。これらの方法は、配列特異的様式で機能して遺伝子の転写または翻訳を妨げる、アンチセンスオリゴヌクレオチド、モルホリノ、リボザイムなどを包含する。より最近には、短いヌクレオチドRNAの二重鎖によるRNA干渉が、哺乳動物細胞において配列特異的様式で遺伝子発現を阻害することが示された(Elbashir Sら、Nature 2001、411:494)。RNA干渉(RNAi)は、小干渉RNA(siRNA)として公知である配列特異的二本鎖RNAを、遺伝子発現を妨げるために使用する。小干渉RNA(si

10

20

30

40

50

RNA)を、哺乳動物細胞中にトランスフェクトし、それによって配列特異的様式でmRNA分解を媒介する。(Elbashirら、Nature 2001; 411: 494)。同様に、siRNAは、哺乳動物細胞へとインビトロおよびインビボで送達され、それによりsiRNAに治療用途を提供し得る、安定なベクター系を生成するために使用されている(Lee Nら、Nature Biotechnol 2002, 19: 500)。いくつかのsiRNA(例えば、以下のsiRNAオリゴヌクレオチド配列:

161P2F10B(1) 標的: GAAUCUACGUUGACUUUAG(161P2F10B ORFのヌクレオチド4~23に対応する)(配列番号39)を含む)を、哺乳動物細胞における161P2F10Bの発現を調節するために使用し得る。

10

【0664】

161P2F10B(1)のセンス鎖を、検出を容易にするために、フルオレセイン、6-FAM(ABS 494nm、EMM 525nm、緑色)を用いて3'にて標識し得る。このsiRNAを、RNアーゼを含まない滅菌緩衝液(100mM KOAc、30mM HEPES KOH, 2mM MOAc、pH7.4)中に溶解して、20μMストック(200x)を生成する。このsiRNAを、種々の正常細胞および腫瘍細胞(UT7細胞、3T3-161P2F10B細胞、Caki-161P2F10B細胞およびRat-161P2F10B細胞を含む)中にトランスフェクトする。コントロールの非特異的オリゴヌクレオチドを、161P2F10B siRNAオリゴヌクレオチドのすべての非特異的効果を除外するためのコントロールとして使用する。

20

【0665】

タンパク質発現を、トランスフェクションの24時間~48時間後に、免疫染色およびその後のフローサイトメトリーによって測定する。さらに、遺伝子発現変化の確認を、ウェスタンブロッティングによって実施する。コントロールまたは161P2F10B特異的siRNAを用いてトランスフェクトした細胞を、上記の機能的アッセイ(浸潤、増殖、コロニー形成、およびアポトーシス性刺激に対する応答を包含する)を使用して比較する。従って、このRNAオリゴヌクレオチド配列を使用して、161P2F10B遺伝子の発現を調節することが、癌細胞および/または癌組織の機能にどのように影響するかを評価する。

30

【0666】

従って、このRNAオリゴヌクレオチド配列を、治療適用および予防適用において使用する。

【0667】

(実施例53: 161P2F10Bの触媒ドメインをコードするペプチドを免疫原として使用することによる、161P2F10Bに対する抗体の作製)

一実施形態において、161P2F10B触媒ドメイン(205位のスレオニン(T))を含む22アミノ酸のペプチド(CG I H S K Y M R A M Y P T K T F P N H Y T(配列番号40))を作製した。これらを合成し、そしてそのペプチドを、N末端システイン残基を介してKLHに結合した。

40

【0668】

Balb/cマウスを、10μgのペプチドを用いて2週間毎に4週間の間、腹腔内(i.p.)免疫した。初期免疫を、完全フロイントアジュバント(CFA)中にて腹腔内投与し、その後の2回の免疫を、不完全フロイントアジュバント(IFA)中にて腹腔内投与した。

【0669】

免疫後の応答の特異性を測定するために、最終免疫の10日後にマウスから採血した。反応性を、非KLH結合体化(遊離)ペプチドを標的として使用する酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)によって測定した。最高の力価を有するマウスに、PBS中10μgのペプチドを用いる最終ブーストを投与し、3日後に融合のために屠殺した。その免疫マウス由来の脾細胞を、標準的プロトコル(Kohlerら、Eur. J. Imm

50

u n o l 6 : 5 1 1 (1 9 7 6)) に従って P E G 1 5 0 0 を使用して、マウス S p 2 / 0 骨髄腫細胞と融合した。融合細胞を、10枚の96ウェルマイクロタイタープレート中にプレATINGした。そしてハイブリドーマを、H A T 培地補充物を使用して選択した。融合物ウェルからの上清を、10～17日間後に、161P2F10Bペプチドに対する E L I S A によってスクリーニングした。その後、クローンを、そのモノクローナル抗体が細胞膜161P2F10Bを認識する能力について、161P2F10発現 R a t - 1 細胞に対する F A C S によって検討した。

【0670】

(実施例54:161P2F10Bの細胞外ドメイン全体(アミノ酸1～975)をコードするタンパク質を免疫原として使用する、161P2F10Bに対する抗体の作製)
—実施形態において、精製のためにC末端に6個のヒスチジン(6-His)を融合した161P2F10Bの細胞外ドメイン全体を、免疫原として使用するために精製した。

10

【0671】

B a l b / c マウスを、10μgのタンパク質を用いて、2週間毎に4週間にわたり腹腔内(i.p.)免疫した。初期免疫を、完全フロイントアジュバント(CFA)中にて腹腔内投与し、その後の2回の免疫を、不完全フロイントアジュバント(IFA)中にて腹腔内投与した。

【0672】

免疫後の応答の特異性を測定するために、最終免疫の10日後にマウスから採血した。反応性を、精製タンパク質をスクリーニング因子として使用する酵素結合イムノソルベント検定法(E L I S A)によって測定した。

20

【0673】

最高の力価を有するマウスに、P B S 中10μgのタンパク質を用いる最終ブーストを投与し、3日後に融合のために屠殺した。その免疫マウス由来の脾細胞を、標準的プロトコル(Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:511(1976))に従ってP E G 1 5 0 0 を使用して、マウス S p 2 / 0 骨髄腫細胞と融合した。融合細胞を、10枚の96ウェルマイクロタイタープレート中にプレATINGした。そしてハイブリドーマを、H A T 培地補充物を使用して選択した。融合物ウェルからの上清を、10～17日間後に、161P2F10Bタンパク質に対する E L I S A によってスクリーニングした。その後、クローンを、そのモノクローナル抗体が細胞膜161P2F10Bを認識する能力について、161P2F10発現 R a t - 1 細胞に対する F A C S によって検討した。

30

【0674】

(実施例55:C末端にてヒトI g G F c と融合された161P2F10Bをコードするベクターを用いるDNA免疫を使用する、161P2F10Bに対するモノクローナル抗体の生成)

別の実施形態において、ヒト免疫グロブリンG1(IgG)Fc(ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域)に対してC末端にて融合された161P2F10B細胞外ドメインの975アミノ酸をコードするベクターを、構築した。この構築物を、DNAベースの免疫ストラテジーにおいて使用した。

40

【0675】

B a l b / c マウスに、その尾の基部にて皮内(ID)免疫した。P B S 中100μgのDNAによる3回の免疫を、各マウスに2週間にわたって投与した。免疫応答を増大させるために、組織培養培地中にある2μgの161P2F10B-Fcタンパク質による腹腔内(i.p.)ブーストを、各マウスに、最終DNA免疫の10日間後に投与した。最終免疫の10日間後に出血を収集し、161P2F10Bのミドルループ(middle loop)に対する血清中での反応性を、161P2F10B-Fc融合タンパク質を標的として使用する E L I S A によって試験した(試験1)。並行して、その血清を、無関係のヒトFc融合タンパク質に対しても試験した(試験2)。その融合タンパク質の161P2F10B部分に対する特異的反応性が、示された。すべてのマウスを屠殺し、

50

そして融合およびハイブリドーマ選択を、実施例54に記載されるように実行した。ハイブリドーマ上清を、161P2F10B-Fcタンパク質を標的として使用するELISAによって、10日間～17日間後にスクリーニングした。161P2F10B-Fcポジティブを、その後、161P2F10特異的クローンを同定するために、無関係のFcタンパク質に対してクロススクリーニングした。モノクローナル抗体を、組換えRat1細胞を使用して、細胞表面161P2F10Bに対する特異性および反応性について試験した。いくつかの抗体(X41(4)6、X41(3)15、X41(3)17、X41(3)29、X41(3)37、およびX41(3)50を含む)をこのようにして同定した。X41(3)15/29/37、X41(4)6、X41(3)37、X41(3)17およびX41(3)50と名付けたハイブリドーマにより分泌されるこれらの抗体またはその結合領域を、American Type Culture Collection(ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)に2002年11月7日に寄託し、受託番号__を割り当てられた。そしてこれらのモノクローナル抗体についてのFACSデータを、図40に示す。

10

【0676】

(実施例56: C末端にてmyc Hisタグと融合された161P2F10Bをコードするベクターを用いるDNA免疫を使用する、161P2F10Bに対するモノクローナル抗体の生成)

別の実施形態において、C末端にてmyc-Hisタグに融合された161P2F10細胞外ドメインの975アミノ酸をコードするベクターを、構築した。この構築物を、DNAベースの免疫戦略において使用した。

20

【0677】

Balb/cマウスに、その尾の基部にて皮内(ID)免疫した。PBS中100μgのDNAによる3回の免疫を、各マウスに2週間にわたって投与した。免疫応答を増加するために、組織培養培地中にある2μgの161P2F10B-Fcタンパク質による腹腔内(i.p.)ブーストを、各マウスに、最終DNA免疫の10日間後に投与した。最終免疫の10日間後に出血を収集し、161P2F10Bのミドルループ(middle loop)に対する血清中での反応性を、161P2F10B-Fc融合タンパク質を標的として使用するELISAによって試験した(試験1)。並行して、その血清を、無関係のヒトFc融合タンパク質に対しても試験した(試験2)。その融合タンパク質の161P2F10B部分に対する特異的反応性が、示された。すべてのマウスを屠殺し、そして融合およびハイブリドーマ選択を、実施例11に記載されるように実行した。ハイブリドーマ上清を、161P2F10B-Fcタンパク質を標的として使用するELISAによって、10日間～17日間後にスクリーニングした。161P2F10B-Fcポジティブを、その後、161P2F10特異的クローンを同定するために、無関係のFcタンパク質に対してクロススクリーニングした。モノクローナル抗体を、組換えRat1細胞を使用して、細胞表面161P2F10Bに対する特異性および反応性について試験した。

30

【0678】

(実施例57: 161P2F10Bを内因性発現するUT7細胞を使用した、161P2F10Bに特異的なモノクローナル抗体の生成)

161P2F10Bに対する抗体を、IL3とともに培養したヒト巨核赤芽球細胞株UT-7を用いた免疫によって作製し得ることが、文献中に報告されている(Buhringら、Blood 94(7):2343, 1999)。この刊行物中に記載される抗体は、市販されており、そしてこの抗体を、本明細書中に記載される発明においてコントロールとして使用している。別の実施形態において、マウスに、1回の免疫当たり10⁶個のUT-7細胞を腹腔内免疫した。合計5回の免疫を、約2週間の間隔で投与した。最終注射は、融合のためにマウスを屠殺する3日前に投与した。マウスから、3回目の注射の10日間後に採血し、そしてその血清の161P2F10B特異的力価を、161P2F

40

50

10をスクリーニング因子として使用するELISAによって測定した。その後、高力価を有するマウスを、実施例11に記載されるように融合のために使用した。この様式で生成されたモノクローナル抗体を、ELISAによって選択した。細胞表面161P2F10Bを認識する能力を、161P2F10Bを発現するRat1細胞に対するFACSによって確認した。

【0679】

(実施例58: 161P2F10Bを発現する組換え細胞株3T3を使用する、161P2F10Bに特異的なモノクローナル抗体の生成)

別の実施形態において、マウスに、161P2F10Bを発現する3T3細胞を、1回の免疫当たり 10^6 個用いて、腹腔内免疫した。合計5回の免疫を、約2週間間隔で投与した。最終注射を、融合のためにマウスを屠殺する3日前に投与した。マウスから、3回目の注射の10日間後に採血し、その血清の161P2F10B特異的な力価を、161P2F10Bをスクリーニング因子として使用するELISAによって測定した。その後、高力価を有するマウスを、実施例11に記載されるように融合のために使用した。この様式で生成したモノクローナル抗体を、ELISAによって選択し、細胞表面161P2F10Bを認識する能力を、161P2F10Bを発現するRat1細胞に対するFACSによって確認した。

【0680】

(実施例59: 161P2F10Bを発現する組換え細胞株Rat1を使用し、161P2F10Bに特異的なモノクローナル抗体の生成)

別の実施形態において、161P2F10Bを発現するRat1細胞を用いてマウスを免疫した。その後、マウスを、実施例11に記載されるように融合のために使用した。この様式で生成したモノクローナル抗体を、ELISAによって選択した。細胞表面161P2F10Bを認識する能力を、161P2F10Bを発現するRat1細胞に対するFACSによって確認した。

【0681】

(実施例60: 腎臓癌患者標本における161P2F10Bタンパク質の検出)

161P2F10Bタンパク質の発現を確認するために、腎臓癌標本を、腎臓癌患者から得、ENPP3タンパク質に特異的な市販の抗体97A6(抗CD203cとも呼ばれる)(Immunotech, Marseilles, France)を使用して染色した。簡単に述べると、凍結組織を4ミクロン切片へと切断し、アセトン中で10分間固定した。その後、その切片を、PE標識マウスモノクローナル抗ENPP3抗体とともに3時間インキュベートした(図24A~C)か、またはアイソタイプコントロール抗体とともに3時間インキュベートした(図44G~I)。そのスライドを緩衝液中で3回洗浄し、蛍光顕微鏡によって分析した(図44A、BおよびC)か、またはDAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)とともにさらに1時間インキュベートした(図44D、EおよびF、図24A~C)。次に、この切片を、DABキット(SIGMA Chemicals)を使用して発色させた。ヘマトキシリンを使用して対比染色し、そして明視野顕微鏡法によって分析した(図44D、EおよびF)のいずれかを行った。この結果は、腎臓癌親組織における161P2F10Bの強力な発現(図44AおよびD)ならびにリンパ節への腎臓癌転移における161P2F10Bの強力な発現(図44CおよびF)を示したが、正常な腎臓において弱くその発現を示した(図44BおよびE)。ほとんど腎臓癌中の周囲の細胞付近で、その発現が検出された(図44AおよびD、図24AおよびB)。その発現は、細胞全体にわたり強く発現されており、腎臓癌の周囲の細胞に対して明らかな傾向があった(図24C)。このことは、161P2F10Bが、腎臓癌組織において膜結合型であることを示す。正常な腎臓において検出された弱い発現が、腎臓細管に局在化していた。アイソタイプコントロール抗体を用いて染色した切片は、ネガティブであった。このことは、抗ENPP3抗体の特異性を示す(図44G~I)。腎臓癌標本を、異なる型の腎臓腫瘍(腎臓癌、乳頭状細胞癌、腎細胞

10

20

30

40

50

癌、色素嫌性型、一過性細胞癌、および膨大細胞腫を含む)を有する患者から得、ENPP3タンパク質に特異的な市販の抗体97A6(抗CD203cとも呼ばれる)(Immunotech, Marseilles, France)を使用して、161P2F10Bについて染色した。腎明細胞癌および乳頭状細胞癌についてのすべての組織標本は、161P2F10Bについてポジティブであった(表LIX)。

【0682】

図45は、ウェスタンブロット分析によってヒト患者の癌における161P2F10Bの発現を示す。腎臓癌組織(KiCa)由来の細胞溶解物、リンパ節への腎臓癌転移(KiCa Met)由来の細胞溶解物、ならびに正常な腎臓(NK)由来の細胞溶解物を、抗161P2F10Bマウスモノクローナル抗体を使用するウェスタン分析に供した。簡単に述べると、組織(総タンパク質約25 μ g)を、SDS-PAGEサンプル緩衝液中に溶解し、10~20% SDS-PAGEゲル上で分離し、そしてニトロセルロースに移した。ブロットを、Tris緩衝化生理食塩水(TBS)+3%脱脂乳中でブロックし、その後、TBS+0.15% Tween-20+1%乳汁中の精製抗161P2F10B抗体を用いてプロービングした。その後、ブロットを洗浄し、そして抗マウスIgG-HRP結合体二次抗体の1:4,000希釈物とともにインキュベートした。洗浄後、抗161P2F10B免疫反応性バンドを発色させ、増強化学発光およびオートラジオグラフィフィルムに対する露光によって、可視化した。特異的な抗161P2F10B免疫反応性バンドは、161P2F10Bタンパク質のモノマー形態を示し、このモノマー形態は、約130kDaにて泳動する。これらの結果は、161P2F10Bが、このタンパク質を発現する腎臓癌、転移癌、および他のヒト癌についての診断および治療の標的として有用であることを、示す。

【0683】

腎臓癌組織における161P2F10Bの強力な発現、および正常な腎臓における161P2F10Bの限定的発現ならびに161P2F10Bの膜局在化は、161P2F10Bが、例えば、腎臓癌の診断および治療のための標的であることを示す。腎臓癌転移組織において検出される発現は、161P2F10Bが転移性疾患についての標的でもあることを、示す。本明細書中に開示されるように、腎臓癌組織および腎臓癌異種移植片をmAb 97A6を用いてウェスタンブロットおよび免疫組織化学分析すると、明細胞腎臓癌においてENPP3の強力な広範な染色を示したが、正常な腎臓においてはそれより有意に低いレベルまたは検出不可能なレベルでの染色を示した(図44、45、46、および24)。高い病期の明細胞癌および転移性疾患における、161P2F10B(ENPP3)の検出。

【0684】

(実施例61:結腸癌患者標本における161P2F10Bタンパク質の検出)

結腸腺癌の組織標本を、異なる9人の結腸癌患者から得た。凍結組織を4ミクロン切片へと切断し、アセトン中で10分間固定した。その後、その切片を、マウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)とともに3時間インキュベートした。そのスライドを緩衝液中で3回洗浄し、DAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)とともにさらに1時間インキュベートした。その後、その切片を緩衝液中で洗浄し、DABキット(SIGMA Chemicals)を使用して発色させ、ヘマトキシリンを使用して対比染色し、そして明視野顕微鏡法によって分析した。その結果は、9つの結腸癌患者組織のうちの2つにおいて161P2F10Bの強力な発現を示した。そのうちの1つを示す(図26)。161P2F10Bは、管腔細胞表面を有する腫瘍細胞において最も強力に発現されたが、この腫瘍組織すべてにわたっても発現された。

【0685】

(実施例62:前立腺癌患者標本における免疫組織化学による、161P2F10Bタンパク質の検出)

10

20

30

40

50

前立腺癌の組織標本を、異なる8人の前立腺癌患者から得た。凍結組織を4ミクロン切片へと切断し、アセトン中で10分間固定した。その後、その切片を、マウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)とともに3時間インキュベートした。そのスライドを緩衝液中で3回洗浄し、DAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)とともにさらに1時間インキュベートした。その後、その切片を緩衝液中で洗浄し、DABキット(SIGMA Chemicals)を使用して発色させ、ヘマトキシリンを使用して対比染色し、そして明視野顕微鏡法によって分析した。その結果は、8つの前立腺癌患者組織のうち6つにおいて161P2F10Bの発現を示した。そのうちの1つを示す(図25)。

10

【0686】

(実施例63: 正常組織標本における免疫組織化学による、161P2F10Bタンパク質の検出)

多数の器官由来の正常組織標本を、手術を受けている患者または剖検のいずれかから得た。凍結組織を4ミクロン切片へと切断し、アセトン中で10分間固定した。その後、その切片を、マウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)とともに3時間インキュベートした。そのスライドを緩衝液中で3回洗浄し、DAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)とともにさらに1時間インキュベートした。その後、その切片を緩衝液中で洗浄し、DABキット(SIGMA Chemicals)を使用して発色させ、ヘマトキシリンを使用して対比染色し、そして明視野顕微鏡法によって分析した。その結果は、腎臓標本すべての細管のうちいくつかにおいて161P2F10Bの弱い発現を示し、そして前立腺組織のうち半分においていくらかの腺上皮の弱い染色を示した。非常に少数の細胞における発現(肥満細胞であり得る、1つの肺サンプルにおける発現、1つの膀胱サンプルにおける発現、そして2つの結腸サンプルにおける発現)を除いて、研究した他の正常組織のいずれにおいても161P2F10Bの発現はなかった(表LX)。本明細書中で開示されるように、腎臓癌組織および腎臓癌異種移植片をmAb 97A6を用いてウェスタンブロットおよび免疫組織化学分析すると、明細胞腎臓癌においてENPP3の強力で明確な染色を示したが、正常な腎臓においてはそれより有意に低いレベルかまたは検出不可能なレベルでしか染色を示さなかった(図44、45、46、および24)。高い病期の明細胞癌および転移性疾患における、161P2F10B(ENPP3)の検出)。

20

30

【0687】

(実施例64: マウスモノクローナル抗体の特異的結合による、腎臓明細胞癌患者標本における161P2F10Bタンパク質発現の免疫組織化学による検出)

腎臓明細胞癌組織およびその適合型正常隣接組織を、腎臓癌患者から得た。凍結組織を4ミクロン切片へと切断し、アセトン中で10分間固定した。その後、その切片を、マウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)とともに3時間インキュベートした(図27パネルA、D)か、マウスモノクローナル抗体X41(3)50とともにインキュベートした(図27パネルB、E)か、またはマウスモノクローナル抗体X41(3)37とともにインキュベートした(図27パネルC、F)かのいずれかを行った。そのスライドを緩衝液中で3回洗浄し、DAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)とともにさらに1時間インキュベートした。その後、その切片を緩衝液中で洗浄し、DABキット(SIGMA Chemicals)を使用して発色させ、ヘマトキシリンを使用して対比染色し、そして明視野顕微鏡法によって分析した(図27パネルA~F)。その結果は

40

50

、腎臓明細胞癌患者組織において161P2F10Bの強力な発現を示した(図27パネルA~C)が、正常腎臓においては発現を弱く示した(図27パネルD~F)。その発現は、細胞周辺付近で顕著であった。このことは、161P2F10Bが、腎臓癌組織において膜結合型であることを示す。正常な腎臓において検出された弱い発現は、腎臓近位細管に局在化していた。本明細書中で開示されるように、腎臓癌組織および腎臓癌異種移植片をmAb 97A6を用いてウェスタンブロットおよび免疫組織化学分析すると、明細胞腎臓癌においてENPP3の強力で明確な染色を示したが、正常な腎臓においてはそれより有意に低いレベルでかまたは検出不可能なレベルでしか染色を示さなかった(図44、45、46、および24)。高い病期の明細胞癌および転移性疾患における、161P2F10B(ENPP3)の検出。

10

【0688】

(実施例65:抗161P2F10b MA bの特徴および有用性)

実施例11に記載されるような種々の免疫ストラテジーを使用して、161P2F10bタンパク質に特異的に結合する一群のMA bを作製した。この群の特徴を、図39にまとめる。これらの抗体は、フローサイトメトリーにより測定すると、内因性発現細胞株および組換え細胞株の表面上にある161P2F10bに高い親和性で特異的に結合する(図28および40)。表面161P2F10bの結合の際、これらのMA bは、このMA bタンパク質複合体のインターナリゼーションを媒介する(図33、34、および35)。従って、これらのMA bは、毒素結合体についての特異的標的化様式として有用であり、このことは、サポリン毒素結合体二次Abを伴うMA b X41.50による、Ca_ki-161P2F10b細胞の増殖阻害およびアポトーシス誘導によって例証されるとおりである(図36)。裸のMA bを用いる161P2F10b発現癌性細胞の処置はまた、MA b x41.50を注射したSCIDマウスにおけるUGK3腫瘍形成の阻害によって例証されるように、インビボで治療効果を有する(図23)。

20

【0689】

161P2F10bは、組換え精製タンパク質の状態(図31)および細胞上で(図32)の両方にて容易にモニターされる、ホスホジエステラーゼ酵素活性をコードする。161P2F10bの機能に対するこの酵素活性の関連性を、この活性を破壊する変異体の利用によってモニターし得る(図30)。161P2F10bとMA bとの結合は、161P2F10b酵素活性を、変化、破壊、ブロック、またはダウンレギュレートし得、このことは、161P2F10b発現癌および罹患組織を標的化するための有望な治療機構として役立つ。細胞表面161P2F10b細胞と、図39中に列挙されるMA b部分集団との結合は、細胞表面酵素活性のインターナリゼーションおよび顕著なダウンレギュレーションを媒介する(図37および38)。従って、このことは、細胞および組織における161P2F10bの機能を破壊するためのこれらのMA bの有用性を示す。

30

【0690】

161P2F10bタンパク質およびそのタンパク質に結合するMA bは、161P2F10b発現癌および罹患組織の診断において有用である。図39において要約されているようなMA b群の免疫組織化学分析は、種々の腎臓癌サンプルを特異的に(種々の程度に)染色し、隣接する正常組織はほとんど染色しないかまたは全く染色しない。従って、これらのMA bは、免疫組織化学による種々の161P2F10b発現癌についての診断試薬として有用であり、そして患者における画像化試薬としておそらく有用である。さらに、これらのMA bを使用して(特に、X48.54およびX41.29を使用した)、同じエピトープについて競合しない他のものも使用した)、161P2F10b発現癌細胞および161P2F10b発現癌組織由来のこのタンパク質の流出(shedding)および/または分泌を示した(図42および43)。このことは、血清診断マーカーおよび/または尿診断マーカーとしての161P2F10bの有用性を支持し、そして161P2F10bタンパク質の血清中濃度および/または尿中濃度を定量的に測定するための試薬としてのこれらのMA bの有用性を支持する。

40

【0691】

50

本出願全体を通して、種々のウェブサイトデータの内容、刊行物、特許出願、および特許が参照されている。(ウェブサイトは、そのユニフォーム・リソース・ロケータースなわちURL(ワールドワイドウェブ上でのアドレス)によって参照されている)。これらの参照物各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される。

【0692】

本発明は、本明細書中に開示される実施形態によって範囲を限定されるべきものではない。これらの実施形態は、本発明の個々の局面の単なる例示として意図され、そして機能的に等価である任意のものが、本発明の範囲内にある。本発明のモデルおよび方法に対する種々の改変が、本明細書中に記載されるモデルおよび方法に加えて、上記の説明および教示から当業者にとって明らかになる。これらは、同様に、本発明の範囲内にあることが意図される。そのような改変形または他の実施形態は、本発明の真の範囲および趣旨から逸脱することなく、実施され得る。

【0693】

【表1】

表:

表 I: 161P2F10B を発現する組織:

a. 例示的な正常組織:

前立腺

腎臓

b. 悪性組織

腎臓

子宮

脾臓

前立腺

結腸

肺

骨

リンパ球

乳房

卵巣

表 II: アミノ酸略号

一文字	三文字	フルネーム
F	Phe	フェニルアラニン
L	Leu	ロイシン
S	Ser	セリン
Y	Tyr	チロシン
C	Cys	システイン
W	Trp	トリプトファン
P	Pro	プロリン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
I	Ile	イソロイシン
M	Met	メチオニン
T	Thr	トレオニン
N	Asn	アスパラギン
K	Lys	リジン
V	Val	バリン
A	Ala	アラニン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
G	Gly	グリシン

【 0 6 9 4 】

【 表 2 】

表 III: アミノ酸置換マトリックス

GCGソフトウェア9. OBLOSUM62アミノ酸置換マトリックス(ブロック置換マトリックス)より適合された。より高い値、より起こりやすい置換は、関連する天然タンパク質に見出される (world wide web URL ikp.unibe.ch/manual/blosum62.htmlを参照のこと)。

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.	10
4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A	
	9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C	
		6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D	
			5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E	
				6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F	
					6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G	
						8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H	
							4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I	
								5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K	
									4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L	
										5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M	
											6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N	
												7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P	20
													5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q	
														5	-1	-1	-3	-3	-2	R	
															4	1	-2	-3	-2	S	
																5	0	-2	-2	T	
																	4	-3	-1	V	
																		11	2	W	
																			7	Y	

【 0 6 9 5 】

【表 3】

100

表 IV:
HLAクラスI / IIモチーフ / スーパーモチーフ

表 IV (A): HLAクラスI スーパーモチーフ / モチーフ

スーパーモチーフ	位置	位置	位置
	2 (一次アンカー)	3 (一次アンカー)	C 末端 (一次アンカー)
A1	TILVMS		FWY
A2	LIVMATQ		IVMATL
A3	VSMATLI		RK
A24	YFWIVLMT		FIYWLM
B7	P		VILFMWYA
B27	RHK		FYLWMIVA
B44	ED		FWYLMVA
B58	ATS		FWYLIVMA
B62	QLIVMP		FWYMIVLA
モチーフ			
A1	TSM		Y
A1		DEAS	Y
A2.1	LMVQIAT		VLMAT
A3	LMVISATFCGD		KYRHFA
A11	VTMLISAGNCDF		KRYH
A24	YFWM		FLIW
A*3101	MYTALIS		RK
A*3301	MVALFIST		RK
A*6801	AVTMSLI		RK
B*0702	P		LMFWYAIV
B*3501	P		LMFWYIVA
B51	P		LIVFWYAM
B*5301	P		IMFWYALV
B*5401	P		ATIVLMFWY

太字の残基が好ましく、イタリック体の残基はあまり好ましくない
 : ペプチドが、上表に明示したようにモチーフまたはスーパーモチ
 ーフの各々の一次アンカー位置に一次アンカーを有している場合、
 ペプチドは、モチーフを保有していると考えられる。

表 IV (B): HLAクラスII スーパーモチーフ

1	6	9
W, F, Y, V, J, L	A, V, I, L, P, C, S, T	A, V, I, L, C, S, T, M, Y

【 0 6 9 6 】

【表 4】

表 IV (C): HLAクラス II モチーフ

モチーフ		1°アンカー	2	3	4	5	1°アンカー	6	7	8	9
DR4	好ましい 有害な	FMYLIVW	M	T	W	I	VSTCPALIM	MH	R	MH	WDE
DR1	好ましい 有害な	MFLIVWY	C	CH	FD	CWD	VMATSPLIC	M	GDE	D	AVM
DR7	好ましい 有害な	MFLIVWY	M	W	A		IVMSACTPL	M	GRD	N	IV
DR3	モチーフ	1°アンカー	2	3	1°アンカー	4	5	1°アンカー	6		
好ましいモチーフ ^a		LIVMFY			D						
好ましいモチーフ ^b		LIVMFAY			DNQEST		KRH				
DR スーパーモチーフ		MFLIVWY					VMSTACPLI				

イタリック体の残基は、あまり好ましくないあるいは「許容される」残基を示す。

10

表 IV (D): HLAクラス II スーパーモチーフ

スーパーモチーフ	位置:	1	2	3	4	5	6	7	8	C-末端
A1			1°アンカー TILVMS							1°アンカー FWY
A2			1°アンカー LIVMATQ							1°アンカー LIVMAT
A3	好ましい 有害な		1°アンカー VSMATLI	YFW (4/5) DE (4/5)			YFW (3/5)	YFW (4/5)	P (4/5)	1°アンカー RK
A24			1°アンカー YFWVLMT							1°アンカー FIYWLM
B7	好ましい 有害な	FWY (5/5) LIVM (3/5) DE (3/5); P(5/5); G(4/5); A(3/5); QN(3/5)	1°アンカー P	FWY (4/5)		DE (3/5)	G (4/5)	QN (4/5)	FWY (3/5) DE (4/5)	1°アンカー VILFMWYA
B27			1°アンカー RHK							1°アンカー FYLWMIVA
B44			1°アンカー ED							1°アンカー FWYLIMVA
B58			1°アンカー ATS							1°アンカー FWYLIVMA
B62			1°アンカー QLIVMP							1°アンカー FWYMIVLA

イタリック体の残基は、あまり好ましくないあるいは「許容される」残基を示す。

20

30

40

【表5】

表IV(E):HLAクラスIモチーフ

	位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C- 末端
										または C-末端	
A1 9-マー	好ましい	GFYW	<u>1°アンカー</u> STM	DEA	YFW		P	DEQN	YFW	<u>1°アンカー</u> Y	
	有害な	DE		RHKLVMP	A	G	A				
A1 9-マー	好ましい	GRHK	ASTCLIVM	<u>1°アンカー</u> DEAS	GSTC		ASTC	LIVM	DE	<u>1°アンカー</u> Y	
	有害な	A	RHKDEPYFW		DE	PQN	RHK	PG	GP		
A1 10- マー	好ましい	YFW	<u>1°アンカー</u> STM	DEAQN	A	YFWQN		PASTC	GDE	P	<u>1°アンカー</u> Y
	有害な	GP		RHKGLIVM	DE	RHK	QNA	RHKYFW	RHK	A	
A1 10- マー	好ましい	YFW	STCLIVM	<u>1°アンカー</u> DEAS	A	YFW		PG	G	YFW	<u>1°アンカー</u> Y
	有害な	RHK	RHKDEPYFW			P	G		PRHK	QN	
A2.1 9-マー	好ましい	YFW	<u>1°アンカー</u> LM/VQAT	YFW	STC	YFW		A	P	<u>1°アンカー</u> VLIMAT	
	有害な	DEP		DERKH			RKH	DERKH			
		位置:1	2	3	4	5	6	7	8	9	C- 末端
A2.1 10- マー	好ましい	AYFW	<u>1°アンカー</u> LM/VQAT	LVIM	G		G		FYWL VIM		<u>1°アンカー</u> VLIMAT
	有害な	DEP		DE	RKHA	P		RKH	DERK	RKH H	
A3	好ましい	RHK	<u>1°アンカー</u> LMVISATFCGD	YFW	PRHKYF W	A	YFW		P	<u>1°アンカー</u> KYRHFA	
	有害な	DEP		DE							
A11	好ましい	A	<u>1°アンカー</u> VTLMISAGNCD F	YFW	YFW	A	YFW	YFW	P	<u>1°アンカー</u> KRYH	
	有害な	DEP						A	G		
A24 9-マー	好ましい	YFWRHK	<u>1°アンカー</u> YFWM		STC			YFW	YFW	<u>1°アンカー</u> FLIW	
	有害な	DEG		DE	G	QNP	DERH K	G	AQN		
A24 10- マー	好ましい		<u>1°アンカー</u> YFWM		P	YFWP		P			<u>1°アンカー</u> FLIW
	有害な			GDE	QN	RHK	DE	A	QN	DEA	
A310 1	好ましい	RHK	<u>1°アンカー</u> MVTALIS	YFW	P		YFW	YFW	AP	<u>1°アンカー</u> RK	
	有害な	DEP		DE		ADE	DE	DE	DE		
A330 1	好ましい		<u>1°アンカー</u> MVALFIST	YFW				AYFW		<u>1°アンカー</u> RK	
	有害な	GP		DE							
A680 1	好ましい	YFWSTC	<u>1°アンカー</u> AVTMSLI			YFWLIV M		YFW	P	<u>1°アンカー</u> RK	
	有害な	GP		DEG		RHK			A		
B070 2	好ましい	RHKFWY	<u>1°アンカー</u> P	RHK		RHK	RHK	RHK	PA	<u>1°アンカー</u> LMFWYAI V	
	有害な	DEQNP		DEP	DE	DE	GDE	QN	DE		

10

20

30

40

【表 6】

	位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C- 末端
A1	好ましい	GFYW	1°アンカー STM	DEA	YFW		P	DEQN	YFW	1°アンカー Y	または C-末端
9-マ	有害な	DE		RHKLIVMP	A	G	A				
A1	好ましい	GRHK	ASTCLIVM	1°アンカー DEAS	GSTC		ASTC	LIVM	DE	1°アンカー Y	
9-マ	有害な	A	RHKDEPYFW		DE	PQN	RHK	PG	GP		
B350	好ましい	FWYLIVM	1°アンカー P	FWY				FWY		1°アンカー LMFWYIV A	
1	有害な	AGP				G	G				
B51	好ましい	LIVMFWY	1°アンカー P	FWY	STC	FWY		G	FWY	1°アンカー LIVFWYA M	
	有害な	AGPDER HKSTC				DE	G	DEQN	GDE		
B530	好ましい	LIVMFWY	1°アンカー P	FWY	STC	FWY		LIVMFW	FWY	1°アンカー IMFWYAL V	
1	有害な	AGPQN					G	RHKQN	DE		
B540	好ましい	FWY	1°アンカー P	FWYLIVM		LIVM		ALIVM	FWYA	1°アンカー ATIVLMF WY	
1	有害な	GPQNDE		GDESTC		RHKDE	DE	QNDGE	DE		

10

20

【 0 6 9 9 】

【表 7】

表 IV (F):

HLA-スーパータイプの概要								
異なる民族集団におけるHLA-スーパータイプの総合的な表現型頻度								
特異性		表現型頻度						
スーパータイプ	位置 2	C末端	白色人種	N.A. 黒色人種	日本人	中国人	ヒスパニック	平均
B7	P	AILMVFWY	43.2	55.1	57.1	43.0	49.3	49.5
A3		AILMVST RK	37.5	42.1	45.8	52.7	43.1	44.2
A2		AILMVT	45.8	39.0	42.4	45.9	43.0	42.2
A24	YF (WIVLMT)	FI (YWLM)	23.9	38.9	58.6	40.1	38.3	40.0
B44	E (D)	FWYLIMVA	43.0	21.2	42.9	39.1	39.0	37.0
A1	TI (LVMS)	FWY	47.1	16.1	21.8	14.7	26.3	25.2
B27	RHK	FYL (WMI)	28.4	26.1	13.3	13.9	35.3	23.4
B62	QL (IVMP)	FWY (MIV)	12.6	4.8	36.5	25.4	11.1	18.1
B58	ATS	FWY (LIV)	10.0	25.1	1.6	9.0	5.9	10.3

10

表 IV (G):

異なるHLA-スーパータイプの組み合わせにより提供される予測集団範囲

HLA-スーパータイプ		表現型頻度					
		白色人種	N.A. 黒色人種	日本人	中国人	ヒスパニック	平均
		83.0	86.1	87.5	88.4	86.3	86.2
A2, A3 および B7		99.5	98.1	100.0	99.5	99.4	99.3
A2, A3, B7, A24, B44		99.9	99.6	100.0	99.8	99.9	99.8
および A1							
A2, A3, B7, A24, B44, A1, B27, B62, および B58							

モチーフは、スーパータイプの特異性を特徴付ける残基を表す。モチーフは、スーパーファミリー内の複数の対立遺伝子により認識される公開されたデータに基づいて決定される残基を組み込む。括弧内の残基は、スーパータイプ内の複数の対立遺伝子によって許容されるとまた予測される、さらなる残基である。

20

表 V: モチーフが生じる頻度

名前	平均 % 同一性	説明	潜在的な機能
zf-C2H2	34%	ジンク フィンガー、C2H2型	転写因子、推定核位置として機能する核酸結合タンパク質、
シトクロム_b_N	68%	シトクロム b (N末端) /b6/petB	膜結合オキシダーゼ、超酸化物を生成する
Ig	19%	免疫グロブリンドメイン	ドメインは、100アミノ酸長であり、保存されたドメイン内ジスルフィド結合を含む。
WD40	18%	WDFドメイン、G-β 反復	各々Trp-Aspモチーフを含んでいる約40残基のタンDEM反復。シグナル伝達およびタンパク質の相互作用において機能する。
PDZ	23%	PDZドメイン	膜下部位に対する標的化シグナル伝達分子として機能し得る
LRR	28%	ロイシンリッチ反復	タンパク質-タンパク質相互作用に関与する短い配列モチーフ
Pキナーゼ	23%	プロテインキナーゼドメイン	ATP結合部位ならびに触媒部位を含むセリン/スレオニンキナーゼおよびチロシンプロテインキナーゼの両方に共通である保存された触媒コア

30

40

【表 8】

PH	16%	PH ドメイン	細胞内シグナル伝達に与するかまたは細胞骨格構築物としてのプレクストリン相同体
EGF	34%	EGF-様 ドメイン	膜結合タンパク質または分泌タンパク質の細胞外ドメインに見出される30~40アミノ酸長
Rvt	49%	逆転写酵素 (RNA-依存DNA ポリメラーゼ)	
Ank	25%	Ank 反復	細胞質タンパク質、細胞骨格に対する完全膜タンパク質に関連する
Oxidored_q1	32%	NADH-ユビキノン/プラストキノン (複合体I)、多重鎖	膜に関連。膜を横切るプロトン転位に関係する。
Efhand	24%	EFハンド	カルシウム結合ドメイン、12残基の α ヘリックスドメインが両側に隣接する12残基ループから成る
Rvp	79%	レトロウイルス アスパルチル プロテアーゼ	触媒アスパルチル残基を中心とする、アスパルチルまたは酸性プロテアーゼ
コラーゲン	42%	コラーゲン3重ヘリックスリピート (20コピー)	結合組織の形成に関係する細胞外構造タンパク質。その配列は、G-X-Yから成り、そしてポリペプチド鎖は、3重ヘリックスを形成する。
Fn3	20%	フィブロネクチン III 型ドメイン	レセプターの細胞外リガンド結合領域に位置し、ジスルフィド結合に関係する二対のシステインを有する約200アミノ酸残基長である
7tm_1	19%	7回膜貫通レセプター (ロドプシンファミリー)	N末端は細胞外に位置するが、C末端は細胞質に位置する、疎水性7回膜貫通領域。Gタンパク質を通じたシグナル

表 VI: 161P2F10Bのモチーフおよび翻訳後修飾

N-グルコシル化部位:

一致の数 : 10

- 1 236-239 NFSL (配列番号 41)
- 2 279-282 NGSF (配列番号 42)
- 3 290-293 NGSV (配列番号 43)
- 4 426-429 NLSC (配列番号 44)
- 5 533-536 NGTH (配列番号 45)
- 6 582-585 NSTQ (配列番号 46)
- 7 594-597 NLTQ (配列番号 47)
- 8 687-690 NITH (配列番号 48)
- 9 699-702 NRTS (配列番号 49)
- 10 789-792 NKSH (配列番号 50)

o AMP-およびo GMP-依存プロテインキナーゼリン酸化部位

14-17 KKNT (配列番号 51)

プロテインキナーゼCリン酸化部位

【表 9】

一致の数 : 13

- 1 17-19 TLK
- 2 53-55 SCR
- 3 428-430 SCR
- 4 62-64 SFR
- 5 92-94 STR
- 6 240-242 SSK
- 7 335-337 SAR
- 8 53-55 SCR
- 9 428-430 SCR
- 10 502-504 SFK
- 11 603-605 TVK
- 12 676-678 SQK
- 13 698-700 SNR

10

カゼインキナーゼIIリン酸化部位

一致の数 : 15

- 1 88-91 TCVE (配列番号 52)
- 2 106-109 TRLE (配列番号 53)
- 3 114-117 SCSD (配列番号 54)
- 4 138-141 SWLE (配列番号 55)
- 5 240-243 SSKE (配列番号 56)
- 6 502-505 SFKE (配列番号 57)
- 7 507-510 TEVE (配列番号 58)
- 8 551-554 SHAE (配列番号 59)
- 9 584-587 TQLE (配列番号 60)
- 10 596-599 TQEE (配列番号 61)
- 11 660-663 TVPD (配列番号 62)
- 12 704-707 SQYD (配列番号 63)
- 13 813-816 TNVE (配列番号 64)
- 14 817-820 SCPE (配列番号 65)
- 15 846-849 TGLD (配列番号 66)

20

30

チロシンキナーゼリン酸化部位

- 700-706 RTSDSQY (配列番号 67)

40

N-ミリスチル化部位

一致の数 : 11

- 1 38-43 GLGLGL (配列番号 68)
- 2 40-45 GLGLGL (配列番号 69)
- 3 38-43 GLGLGL (配列番号 70)
- 4 40-45 GLGLGL (配列番号 71)

【表 1 0】

5	65-70 GLENCR (配列番号 72)	
6	222-227 GIIDNN (配列番号 73)	
7	263-268 GLKAAT (配列番号 74)	
8	273-278 GSEVAI (配列番号 75)	
9	280-285 GSFPSI (配列番号 76)	
10	331-336 GGPVSA (配列番号 77)	10
11	374-379 GMDQTY (配列番号 78)	

細胞接着配列

78-80 RGD

ソマトメジンB ドメイン特徴

一致の数 : 2

1	69-89 CRCDVACKDRGDCCWDFEDTC (配列番号 79)	20
2	113-133 CSCSDDCLQKKDCCADYKSVK (配列番号 80)	

【 0 7 0 3 】

【表 1 1】

表 VII:
検索ペプチド

161P2F10B 改变体 1 (配列番号: 81)

1 MESTLTLATE QPVKKNTLKK YKIACIVLLA LLVIMSLGLG LGLGLRKLEK QGSCRKCCFD
 61 ASFRGLENCR CDVACKDRGD CCWDFEDTCV BSTRIWMCNK FRCGETRLEA SLCSCSDDCL
 121 QKKDCCADYK SVCQGETSWL EENCDDTAQQS QCPEGFDLPP VILFSDMGFR AEYLYTWDTL
 181 MPNINKLKTC GIHSKYMRAM YPTKTFPNHY TIVTGLYPES HGIIDNNMYD VNLNKNFSL
 241 SKEQNNPAWW HGQPMWLTAM YQGLKAATYF WPGSEVAING SFPSIYMPYN GSVPFEEERIS
 301 TLLKWLIDLK AERPRFYTMY FEEDSSGHA GGPVSARVIK ALQVVDHAFG MLMEGLKQRN
 361 LHNCVNIILL ADHGMDQTYC NKMEYMTDYF PRINFFYMYE GPAPRIRAHN IPHDFFSFNS
 421 EEIVRNLSR KPDQHFQPYL TPDLPKRLHY AKNVRIDKVH LFVDQQLAV RSKSNTNCGG
 481 GNHGYNNEFR SMEAIFLAHG PSFKKTEVE PFENIEVYNL MCDLLRIQPA PNNGTHGSLN
 541 HLLKVPFYEP SHAEVSKFS VCGFANPLPT ESLDCFCPHL QNSTQLEQVN QMLNLTQEEI
 601 TATVKVNLPF GRPRVLQKNV DHCLLYHREY VSGFGKAMRM PMWSSYTPVQ LGDTSPLPPT
 661 VPDCLRADVR VPPSESQKCS FYLADKNITH GFLYPPASNR TSDSQYDALI TSNLVPMYEE
 721 FRKMWDYFHS VLLIKHATER NGVNVVSGPI FDYNYDGHFD APDEITKHLA NTDVPIPTHY
 781 FVVLTSCKNK SHTPENCPGW LDVLEFIIIPH RPTNVESCPE GKPEALWVEE RFTAHIARVR
 841 DVELLTGLDF YQDKVQPVSE ILQLKTYLPT FETTI

10

改变体 2

9マー
SCSDDCLQKDKCCADYK (配列番号: 82)

20

10マー
SCSDDCLQKDKCCADYKS (配列番号: 83)

15マー
LEASLCSCSDDCLQKDKCCADYKSVQGE (配列番号: 84)

改变体 3

9マー
RPTNVESCPGGKPEALWV (配列番号: 85)

10マー
RPTNVESCPGGKPEALWVE (配列番号: 86)

30

15マー
FIIPHRPTNVESCPGGKPEALWVEERFTA (配列番号: 87)

改变体 4

9マー
TYLPTFETPI (配列番号: 88)

10マー
KTYLPTFETPI (配列番号: 89)

15マー
EILQLKTYLPTFETPI (配列番号: 90)

40

【 0 7 0 4 】

【表 1 2】

表 VIII-V1-HLA-A1-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の
一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
105	SMDGFRAEY	25.000
754	NVESCPEGK	18.000
55	CSDDCLQKK	15.000
446	KTEVEPFEN	11.250
245	WLDLPKAER	10.000
798	VSEILQLKT	6.750
317	QTYCNKMEY	6.250
371	KPDQHFHPY	6.250
10	RCDVACKDR	5.000
314	GMDQTYCNK	5.000
322	KMEYMTDYF	4.500
454	NIEVNLMLC	4.500
29	CVESTRIWM	4.500
650	ITSNLVPMY	2.500
118	DTLMPNHNK	2.500
685	VVSGPIFDY	2.500
559	NVDHCLLYH	2.500
711	NTDVIPIPTH	2.500
740	WLDVLPFI	2.500
402	FVDQQLAV	2.500
431	SMEAIFLAH	2.250
610	RVPPSESQK	2.000
379	YLTPDLPKR	2.000
613	PSESQKCSF	1.350
213	GSEVAINGS	1.350
359	NSEIIVRNL	1.350
128	KTCGIHSKY	1.250
326	MTDYFPRIN	1.250
426	NNEFRSMEA	1.125
632	FLYPPASNR	1.000
163	IIDNNMYDV	1.000
512	SLDCFCPHL	1.000
66	CADYKSVCC	1.000
653	NLVPMYEEF	1.000
606	RADVVRPPS	1.000
54	SCSDDCLQK	1.000
767	WVEERFTAH	0.900
448	EVEPFENIE	0.900
525	QLEQVNMQL	0.900
79	WLEENCDTA	0.900
492	HAEVSKFS	0.900
537	QEITATVK	0.900
5	GLENCRCDV	0.900
47	RLEASL CSC	0.900
641	TSDSQYDAL	0.750
626	KNITHGFLY	0.625
558	KNVDHCLLY	0.625
783	ELLTGLDFY	0.500
62	KKDCCADYK	0.500
310	LADHGMDQT	0.500

表 VIII-V1-HLA-A1-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の
一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
167	NMYDVNLNK	0.500
562	HCLLYHREY	0.500
197	LTAMYQGLK	0.500
699	FDAPDEITK	0.500
787	GLDFYQDKV	0.500
83	NCDTAQQSQ	0.500
593	DTSPLPPTV	0.500
284	VVDHAFGML	0.500
144	KTFPNHYTI	0.500
417	NCGGGNHGY	0.500
350	NIPHDFFSF	0.500
97	DLPPVILFS	0.500
742	DVLPFIIPH	0.500
250	KAERPRFYT	0.450
292	LMEGLKQRN	0.450
677	ATERNGVNV	0.450
281	FEEPDSGGH	0.450
618	KCSFYLDK	0.400
571	VSGFGKAMR	0.300
536	TQEEITATV	0.270
193	QPMWLTAMY	0.250
687	SGPIFDYNY	0.250
772	FTAHARVR	0.250
655	VPMYEEFRK	0.250
476	HGSLNHLK	0.250
712	TDVPIPTHY	0.250
550	FGPRVLQK	0.250
601	VPDCLRADV	0.250
578	MRMPMWSSY	0.250
546	VNLFFGRPR	0.250
461	MCDLLRIQP	0.250
395	RIDKVHLFV	0.250
586	YTPQLGDT	0.250
96	FDLPPVILF	0.250
509	PTESLDCFC	0.225
758	CPEGKPEAL	0.225
733	TPENCPGWL	0.225
493	AEVSKFSV	0.225
43	CGETRLEAS	0.225
722	VVLTSCKNK	0.200
746	FIIHRPTN	0.200
436	FLAHGPSFK	0.200
743	VLPFIIPHR	0.200
133	HSKYMRAMY	0.150
201	YQGLKAATY	0.150
231	GSVPFEERI	0.150
686	VSGPIFDYN	0.150
382	PDLPKRLHY	0.125
191	HGQPMWLTA	0.125
701	APDEITKHL	0.125

表 VIII-V2-HLA-A1-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号5の
一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
2	CSDDCLQRK	15.000
9	RKDCCADYK	0.500
1	SCSDDCLQR	0.500
5	DCLQRKDCC	0.010
8	QRKDCCADY	0.005
3	SDDCLQRKD	0.003
6	CLQRKDCCA	0.001
4	DDCLQRKDC	0.001
7	LQRKDCCAD	0.000

表 VIII-V3-HLA-A1-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号7の
一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
3	NVESCPCGGK	18
6	SCPCGGKPEA	0.02
5	ESPCGGKPE	0.015
9	GGKPEALWV	0.013
2	TNVESCPCGG	0.005
7	CPGGKPEAL	0.003
1	PTNVESCPCG	0.003
4	VESCPCGGKP	0
8	PCGGKPEALW	0

表 VIII-V4-HLA-A1-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号9の
一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
2	YLPTFETPI	0.01
1	TYLPTFETP	0.001

表 IX-V1-HLA-A1-10マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の
一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、10アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+9である。

10

20

30

40

【表 13】

開始	部分配列	スコア
798	VSEILQLKTY	67.500
711	NTDVPPIPHY	62.500
326	MTDYFPRINF	62.500
781	DVELLTGLDF	45.000
448	EVEPFENIEV	45.000
220	GSFSPSIYMPY	37.500
381	TPDLPKRLHY	31.250
310	LADHGMDQTY	25.000
686	VSGPIFDYNY	15.000
213	GSEVAINGSF	13.500
402	FVDQQWLAVR	10.000
559	NVDHCLLYHR	10.000
613	PSESQKCSFY	6.750
525	QLEQVNLMLN	4.500
567	HREYVSGFGK	4.500
492	HAEEVSKFSV	4.500
536	TQEEITATVK	2.700
684	NVVS GPIFDY	2.500
698	HFDAPDEITK	2.500
284	VVDHAFGMLM	2.500
658	YEEFRKMWDY	2.250
446	KTEVEPFENI	2.250
762	KPEALWVEER	2.250
742	DVLPFIIPHR	2.000
119	TLMPNINKLK	2.000
767	WVEERFTAHI	1.800
53	CSCSDDCLQK	1.500
641	TSDSQYDALI	1.500
104	FMSMDGFRAEY	1.500
359	NSEIVRNLS	1.350
349	HNIPHDFFSF	1.250
328	DYFPRINFFY	1.250
601	VPDCLRADVR	1.250
95	GFDLPPVILF	1.250
157	YPESHGIDN	1.125
654	LVPMYEEFRK	1.000
653	NLVPMYEEFR	1.000
649	LITSNLVPMY	1.000
47	RLEASLSCSCS	0.900
29	CVESTRIWMC	0.900
5	GLENCRCOVA	0.900
110	RAEYLYTWDI	0.900
79	WLEENCDAQ	0.900
431	SMEAIFLAHG	0.900
356	FSFNSEEIVR	0.750
785	LTGLDFYQDK	0.500
623	LADKNITHGF	0.500
83	NCDTAQQSQC	0.500
66	CADYKSVCCG	0.500
541	TATVKVNLPI	0.500
10	RCDVACKDRG	0.500
794	KVQPVSEILQ	0.500
787	GLDFYQDKVQ	0.500
163	IIDNNMYDVN	0.500
512	SLDCFCPHLQ	0.500
461	MCDLLRIQPA	0.500
217	AINGSFPSIY	0.500
97	DLPPVILFSM	0.500

表 IX-V1-HLA-A1-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の一部である。
各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
292	LMEGLKQRNL	0.450
487	FYEP SHAEEV	0.450
92	CPEGF DLPPV	0.450
43	CGETRLEASL	0.450
235	FEERISTLLK	0.450
454	NIEVYNLMCD	0.450
261	FEEPDSSGHA	0.450
758	CPEGKPEALW	0.450
338	MYEGPAPRIR	0.450
316	DQTYCNKMEY	0.375
756	ESCPEGKPEA	0.300
263	EPDSSGHAGG	0.250
740	WLDVLPFIIP	0.250
586	YTVPQLGDTS	0.250
314	GMDQTYCNKM	0.250
479	LNHLLKVPFY	0.250
139	AMYPTKTFPN	0.250
168	MYDVNLNKNF	0.250
25	FEDTCVETR	0.250
377	KPYLTPDLPR	0.250
105	SMDGFRAEYL	0.250
591	LGDTSPLPPT	0.250
166	NNMYDVNLNK	0.250
144	KTFPNHYTIV	0.250
371	KPDQHF KPYL	0.250
690	IFDYN YDGHF	0.250
426	NNEFRSMEAI	0.225
74	QGETSWLEEN	0.225
360	SEEIVRNLS	0.225
677	ATERNGVNVV	0.225
570	YVSGFGKAMR	0.200
129	TCGIHSKYMR	0.200
721	FVVLTSCKNK	0.200
682	GVNVVSGPIF	0.200
196	WLTAMYQGLK	0.200
434	AIFLAHGPSF	0.200
54	SCSDDCLQKK	0.200
478	SLNHLLKVPF	0.200
437	LAHGSPFKEK	0.200
250	KAERPRFYTM	0.180
231	GSVPFEERIS	0.150
192	GQPMWLTAMY	0.150

表 IX-V2-HLA-A1-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号5の一部である。
各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
1	CSCSDDCLQR	0.750
2	SCSDDCLQRK	0.200
3	CSDDCCLQRKD	0.075
10	RKDCCADYKS	0.050
4	SDDCLQRKDC	0.025
6	DCLQRKCCA	0.010
8	LQRKCCADY	0.002
9	QRKCCADYK	0.001
5	DDCLQRKDC	0.001
7	CLQRKCCAD	0.000

表 IX-V3-HLA-A1-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号7の一部である。
各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
6	ESCPGGKPEA	0.3
4	NVESC PGGKP	0.09
3	TNESC PGGK	0.05
7	SCPGGKPEAL	0.01
2	PTNVESC PGG	0.005
8	CPGGKPEALW	0.005
1	RPTNVESC PG	0.003
10	GGKPEALWVE	0
9	PGGKPEALWV	0
5	VESC PGGKPE	0

表 IX-V4-HLA-A1-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号9の一部である。
各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
2	TYLPTFETPI	0.005
1	KTYLPTFETP	0.003

表 X-V1-HLA-A0201-9マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の一部である。
各開始位置は、特定され、ペプチド長は、9アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置である。

10

20

30

40

【表 1 4】

+8		
開始	部分配列	スコア
663	KMWDYFHSV	11367.476
563	CLLYHREYV	693.538
325	YMTDYFPRI	270.002
807	YLPTFETI	182.365
119	TLMPNINKL	181.794
196	WLTAMYQGL	147.401
459	NLMCDLLRI	88.783
113	LYTWDTLM	73.129
547	NLPFGRPRV	69.552
765	ALWVEERFT	68.037
740	WLDVLPFII	45.649
238	RISTLLKWL	37.157
155	GLYPESHGI	33.385
512	SLDCFPHL	32.471
579	RMPMWSSYT	29.601
199	AMYQGLKAA	26.408
395	RIDKVLHFV	21.039
402	FVDQQWLAV	19.036
524	TQLEQVNM	17.575
747	IIPHRPTNV	16.258
163	IIDNNMYDV	14.957
400	HLFVDQQWL	14.781
787	GLDFYQDKV	13.632
90	SQCPEFDL	12.562
693	YNYDGHFDA	11.352
283	QVVDHAFGM	10.337
300	NLHNCVNI	9.838
555	VLQKNVDHC	9.518
532	MLNLTQEEI	8.691
570	YVSGFGKAM	7.599
802	LQLKTYLPT	7.129
500	SVCGFANPL	7.103
805	KTYLPTFET	6.723
430	RSMEAIFLA	6.563
277	RVIKALQV	5.739
171	VNLNKNFSL	5.087
59	CLQKDCCA	4.968
534	NLTQEEITA	4.968
383	DLPKRLHYA	4.713
800	EILQLKTYL	4.483
5	GLENCRCDV	4.451
452	FENIEVYNL	4.395
307	IILLADHGM	4.297
714	VPIPTHYFV	4.245
477	GSLNHLLKV	3.864
111	AEYLYTWDT	3.478
488	YEPSHAEV	3.048
79	WLENCOTA	2.938
580	MPMWSSYTV	2.856
30	VESTRIWMC	2.833
217	AINGSFPSI	2.726
649	LITSNLVPM	2.671
51	SLCSCSDDC	2.434
670	SVLLIKHAT	2.413
449	VEPFENIEV	2.299
380	LTPDLPKRL	2.068
21	CCWDFEDTC	2.055

表 X-V1-HLA-A0201-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
144	KTFPNHYTI	1.876
297	KQRNLHNCV	1.876
240	STLLKWL	1.866
536	TQEEITATV	1.850
535	LTQEEITAT	1.659
356	FSFNSEEIV	1.552
528	QVNQMLNLT	1.500
583	WSSYTVPQL	1.475
622	YLADKNITH	1.405
525	QLEQVNM	1.367
794	KVQPVSEIL	1.314
72	VCQGETSWL	1.304
467	IQPAPNNGT	1.284
233	VPFEERIST	1.255
192	GQPMWLTAM	1.159
456	EYVNLCDL	1.032
131	GIHSKYMRA	1.025
280	KALQVDHA	1.007
291	MLMEGLKQR	0.884
427	NEFRSMEAI	0.846
784	LLTGLDFYQ	0.808
447	TEVEPFENI	0.774
715	PIPTHYFV	0.750
250	KAERPRFYT	0.740
98	LPPVILFSM	0.735
47	RLEASLCS	0.731
330	FPRINFFYM	0.687
474	GTHGSLNHL	0.682
337	YMYEGPAPR	0.650
274	VSARVIKAL	0.545
521	QNSTQLEQV	0.512
540	ITATVKVNL	0.504
493	AEEVSKFSV	0.502
270	AGGPVSARV	0.454
665	WDYFHSVLL	0.437
790	FYQDKVQPV	0.419
44	GETRLEASL	0.415
190	WHGQPMWLT	0.411
656	PMYEEFRKM	0.394
436	FLAHGPSFK	0.377
527	EQVNQMLNL	0.374
115	YTWDTLMPN	0.373
708	HLANTDVPI	0.355

表 X-V2-A0201-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号5の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、		
開始	部分配列	スコア
663	KMWDYFHSV	11367.476
563	CLLYHREYV	693.538
325	YMTDYFPRI	270.002
807	YLPTFETI	182.365
119	TLMPNINKL	181.794
196	WLTAMYQGL	147.401
459	NLMCDLLRI	88.783
113	LYTWDTLM	73.129
547	NLPFGRPRV	69.552
765	ALWVEERFT	68.037
740	WLDVLPFII	45.649
238	RISTLLKWL	37.157
155	GLYPESHGI	33.385
512	SLDCFPHL	32.471
579	RMPMWSSYT	29.601
199	AMYQGLKAA	26.408
395	RIDKVLHFV	21.039
402	FVDQQWLAV	19.036
524	TQLEQVNM	17.575
747	IIPHRPTNV	16.258
163	IIDNNMYDV	14.957
400	HLFVDQQWL	14.781
787	GLDFYQDKV	13.632
90	SQCPEFDL	12.562
693	YNYDGHFDA	11.352
283	QVVDHAFGM	10.337
300	NLHNCVNI	9.838
555	VLQKNVDHC	9.518
532	MLNLTQEEI	8.691
570	YVSGFGKAM	7.599
802	LQLKTYLPT	7.129
500	SVCGFANPL	7.103
805	KTYLPTFET	6.723
430	RSMEAIFLA	6.563
277	RVIKALQV	5.739
171	VNLNKNFSL	5.087
59	CLQKDCCA	4.968
534	NLTQEEITA	4.968
383	DLPKRLHYA	4.713
800	EILQLKTYL	4.483
5	GLENCRCDV	4.451
452	FENIEVYNL	4.395
307	IILLADHGM	4.297
714	VPIPTHYFV	4.245
477	GSLNHLLKV	3.864
111	AEYLYTWDT	3.478
488	YEPSHAEV	3.048
79	WLENCOTA	2.938
580	MPMWSSYTV	2.856
30	VESTRIWMC	2.833
217	AINGSFPSI	2.726
649	LITSNLVPM	2.671
51	SLCSCSDDC	2.434
670	SVLLIKHAT	2.413
449	VEPFENIEV	2.299
380	LTPDLPKRL	2.068
21	CCWDFEDTC	2.055

そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
6	CLQRKDCCA	4.968
5	DCLQRKDCC	0.004
4	DDCLQRKDC	0.001
1	SCSDDCLQR	0.000
2	CSDDCLQRK	0.000
7	LQRKDCCAD	0.000
9	RKDCCADYK	0.000
3	SDDCLQRKD	0.000
8	QRKDCCADY	0.000

表 X-V3-HLA-A2-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号7の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
9	GGKPEALWV	0.087
7	CPGGKPEAL	0.068
6	SCPGGKPEA	0.032
2	TNVESCPGG	0.002
4	VESCPGGKP	0
1	PTNVESCPG	0
3	NVESCPGGK	0
8	PGGKPEALW	0
5	ESCPGGKPE	0

表 X-V4-HLA-A2-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号9の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
2	YLPTFETPI	182.365
1	TYLPTFETP	0

表 XI-V1-HLA-A0201-10マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、10アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
663	KMWDYFHSV	2862.980
337	YMYEGPAPRI	454.740
765	ALWVEERFTA	239.160
102	ILFSMDGFRA	181.243
632	FLYPPASNRT	109.693
379	YLTPDLPKRL	98.267

10

20

30

40

【表 15】

表 XI-V1-HLA-A0201-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、10アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
162	GIIDNNMYDV	90.183
309	LLADHGMDQT	58.537
115	YTWDTLMPNI	52.169
579	RMPMWSSYTV	50.232
746	FIIPHRPTNV	43.992
555	VLQKNVDHCL	36.316
407	WLAVRKSNT	34.279
34	RIWMCNKFR	32.884
524	TQLEQVQML	32.857
600	TVPOCLRADV	24.952
801	ILQLKTYLPT	19.003
199	AMYQGLKAAT	17.222
534	NLTQEEITAT	17.140
105	SMDGFRAEYL	16.632
21	CCWDFEDTCV	15.450
531	QMLNLTQEEI	13.661
520	LQNSTQLEQV	13.511
614	SESQKCSFYL	13.251
648	ALITSNLVPM	11.426
51	SLCSQSDDC	10.468
387	RLHYAKNVR	10.433
71	SVCQGETSWL	10.281
120	LMPNINKLKT	9.149
300	NLHNCVNIIL	8.759
795	VQPVSEILQL	8.469
233	VPFEERISTL	8.271
144	KTFPNHYTIV	7.693
4	RGLENCRCDV	6.887
535	LTQEEITATV	6.733
97	DLPPVILFSM	4.970
282	LQVVDHAFGM	4.966
400	HLFVDQQWLA	4.687
767	WVEERFAHI	4.187
371	KPDQHFQPYL	4.080
224	SIYMPYNGSV	3.978
786	TGLDFYQDKV	3.375
622	YLADKNITHG	3.233
207	ATYFWPGSEV	3.091
546	VNLPGFRPRV	2.856
714	VPIPTHYFV	2.753
458	YNLMCDLLRI	2.666
532	MLNLTQEEIT	2.545
713	DVPIPTHYFV	2.510
499	FSVCGFANPL	2.438
799	SEILQLKTYL	2.285
291	MLMEGLKQRN	1.922
283	QVVDHAFGML	1.893
136	YMRAMYPTKT	1.882
554	RVLQKNVDHC	1.813
155	GLYPESHGII	1.779

表 XI-V1-HLA-A0201-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、10アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
547	NLPFGRPRVL	1.752
455	IEVYNLMCDL	1.624
526	LEQVQMLNLL	1.624
167	NMYDVNLNKN	1.624
484	KVPFYEPSHA	1.521
314	GMDQTYCNKM	1.435
123	NINKLKTGGI	1.435
317	QTYCNKMEYM	1.369
128	KTCGHSKSYM	1.328
508	LPTESLDCFC	1.243
358	NFSEEIVRNL	1.210
284	VVDHAFGMLM	1.123
111	AEYLYTWDTL	1.107
805	KTYLPTFETT	1.079
466	RIQPAPNNGT	1.025
139	AMYPTKTFPN	0.999
329	YFPRINFFYM	0.962
640	RTSDSQYDAL	0.894
170	DVNLNKNFSL	0.813
89	QSQCPEGFDL	0.809
28	TCVESTRIWM	0.731
716	IPTHYFVWLT	0.723
306	NIILLADHGM	0.683
242	LLKWLDLPKA	0.680
662	RKMWDYFHSV	0.679
504	FANPLPTESL	0.669
452	FENIEVYNLM	0.667
232	SVPFEERIST	0.652
425	YNNEFRSMEA	0.612
564	LLYHREYVSG	0.608
511	ESLDCFCPHL	0.603
198	TAMYQGLKAA	0.587
401	LFVDQQWLAV	0.572
399	VHLFVDQQWL	0.513
63	KDCCADYKSV	0.507
665	WDYFHSVLLI	0.491
392	KNVRIDKVLH	0.488
29	CVESTRIWMC	0.480
216	VAINGSFPSI	0.468
440	GPSFKEKTEV	0.454
773	TAHARVRDV	0.444
339	YEGPAPRIRA	0.444
646	YDALITSNLV	0.444
610	RVPPSESQKC	0.435

表 XI-V2-A0201-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号5の 一部である； 各開始位置は、特定され、		
開始	部分配列	スコア
167	NMYDVNLNK	300.000
314	GMDQTYCNK	60.000
632	FLYPASNR	45.000

表 XI-V3-HLA-A2-10マー 161P2F10B		
ペプチド長は、10アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
7	CLQRKDCCAD	0.015
6	DCLQRKDCCA	0.009
4	SDDCLQRKDC	0.003
8	LQRKDCCADY	0.001
2	SCSDDCLQRK	0.001
5	DDCLQRKDCC	0.000
1	CSCSDDCLQR	0.000
10	RKDCCADYKS	0.000
3	CSDCLQRKD	0.000
9	QRKDCCADYK	0.000

表 XI-V3-HLA-A2-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号7の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、10アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
7	SCPGGKPEAL	0.068
9	PGGKPEALWV	0.055
6	ESCPGGKPEA	0.002
5	VESCPGGKPE	0
8	CPGGKPEALW	0
1	RPTNVESCPG	0
3	TNVESCPGGK	0
10	GGKPEALWVE	0
2	PTNVESCPGG	0
4	NVESCPGGKP	0

表 XI-V4-HLA-A2-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号9の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、10アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
2	TYLPTFETPI	0.02
1	KTYLPTFETP	0.002

表 XII-V1-HLA-A3-9マー 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
167	NMYDVNLNK	300.000
314	GMDQTYCNK	60.000
632	FLYPASNR	45.000

10

20

30

40

【表 16】

表 XII-V1-HLA-A3-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
242	LLKWLDLPK	40.000
337	YMYEGPAPR	30.000
663	KMWDYFHSV	27.000
436	FLAHGSPFK	20.000
136	YMRAMYPTK	20.000
105	SMDGFRAEY	18.000
120	LMPNINKLK	15.000
155	GLYPESHGI	13.500
379	YLTPDLPKR	9.000
803	QLKTYLPTF	9.000
743	YLPFIIPHR	9.000
291	MLMEGLKQR	6.750
245	WLDLPAKER	6.000
322	KMEYMTDYF	6.000
102	ILFSMDGFR	6.000
672	LLKHATER	6.000
325	YMTDYFPRI	5.400
653	NLVPMYEEF	4.500
32	STRIWMCNK	4.500
685	VVSGPIFDY	4.050
387	RLHYAKNVR	4.000
610	RVPPSESQK	3.000
400	HLFVDQQWL	3.000
281	ALQVVDHAF	3.000
113	YLYTWDTLM	3.000
459	NLMCDLLRI	2.700
618	KCSFYLDK	2.700
783	ELLTGLDFY	2.700
119	TLMPNINKL	2.025
144	KTFPNHYTI	2.025
317	QTYCNKMEY	2.000
754	NVESCPEGK	2.000
363	IVRNLSRCK	2.000
350	NIPHDFFSF	1.800
431	SMAIFLAH	1.800
203	GLKAATYFW	1.800
512	SLDCFCPHL	1.800
300	NLHNCVNI	1.800
807	YLPTFETTI	1.800
740	WLDVLPFI	1.800
787	GLDFYQDKV	1.800
722	VVLTSCNKN	1.500
128	KTCGHSKY	1.350
118	DTLMPNINK	1.350
654	LVPMYEEFR	1.200
34	RIWMCNKFR	1.000
272	GPVSARVIK	0.900
655	VPMYEEFRK	0.900
405	QQWLAVRSK	0.900
197	LTAMYQLK	0.900

表 XII-V1-HLA-A3-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
568	REYVSGFGK	0.900
525	QLEQVNMQL	0.900
199	AMYQGLKAA	0.750
797	PVSEILQLK	0.675
532	MLNLTQEEI	0.600
5	GLENCRCDV	0.600
8	NCRCDVACK	0.600
564	LLYHREYVS	0.600
555	VLQKNVDHC	0.600
384	LPKRLHYAK	0.600
708	HLANTDVPI	0.600
650	ITSNLVPMY	0.600
196	WLTAMYQGL	0.600
390	YAKNVRIDK	0.600
542	ATVKVNLPF	0.450
101	VILFSMDGF	0.450
794	KVQPVSEIL	0.405
534	NLTQEEITA	0.400
54	SCSDDCLQK	0.400
622	YLAGDNKITH	0.400
805	KTYLPTFET	0.338
79	WLEENCDDTA	0.300
579	RMPMWSSYT	0.300
47	RLEASLCSK	0.300
563	CLLYHREYV	0.300
577	AMRMPMWSS	0.270
362	EIVRNLSR	0.270
217	AINGSFPSI	0.270
482	LLKVPFYEP	0.270
500	SVCGFANPL	0.270
269	HAGGPVSAR	0.270
126	KLKTCGIHS	0.240
474	GTHGSLNHL	0.203
51	SLCSCSDDC	0.200
258	TMYFEEDPS	0.200
547	NLPFGRPRV	0.200
59	CLQKDCCA	0.200
550	FGRPRVLQK	0.180
290	GMLMEGLKQ	0.180
484	KVPFYEPESH	0.180
371	KPDQHFKPY	0.180
55	CSDDCLQKK	0.150
139	AMYPTKTFP	0.150
450	EPFENIEVY	0.135
481	HLLKVPFYE	0.135
241	TLLKWLDLP	0.135
456	EVYNLMCDL	0.135

表 XII-V2-HLA-A3-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号5の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
6	CLQRKDCCA	0.200
2	CSDDCLQRK	0.150
1	SCSDDCLQR	0.080
9	RKDCCADYK	0.020
8	QRKDCCADY	0.004
5	DCLQRKDCC	0.001
7	LQRKDCCAD	0.001
4	DDCLQRKDC	0.000
3	SDDCLQRKD	0.000

表 XII-V3-HLA-A3-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号7の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
3	NVESCPEGK	0.6
7	CPGGKPEAL	0.009
6	SCPGGKPEA	0.003
9	GGKPEALWV	0.002
1	PTNVESCPG	0
2	TNVESCPGG	0
8	PGGKPEALW	0
4	VESCPGGKP	0
5	ESCPGGKPE	0

表 XII-V4-HLA-A3-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号9の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、9アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア
2	YLPTFETPI	1.8
1	TYLPTFETP	0

表 XIII-V1-HLA-A3-10マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の 一部である； 各開始位置は、特定され、 ペプチド長は、10アミノ酸であり、 そして各ペプチドに対する 末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
126	KLKTCGIHKS	90.000

10

20

30

40

【表 17】

表 XIII-V1-HLA-A3-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、10アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
241	TLLKWLDPK	60.000
119	TLMPNINKLK	33.750
663	KMWDYFHSVL	27.000
653	NLVPMYEEFR	27.000
383	DLPKRLHYAK	18.000
196	WLTAMYQGLK	18.000
290	GMLMEGLKQR	13.500
377	KPYLTPDLPK	9.000
337	YMYEGPAPRI	6.750
654	LVPMYEEFRK	6.000
671	VLLIKHATER	6.000
155	GLYPESHGII	4.050
684	NVVSQPIFDY	4.050
577	AMRMPMWSSY	4.000
102	ILFSMDGFRA	3.000
785	LTGLDFYQDK	3.000
765	ALWVEERFTA	3.000
400	HLFVDQQWLA	3.000
478	SLNHLLKVPF	2.000
226	YMPYNGSVPF	2.000
559	NVDHCLLYHR	1.800
314	GMDQTYCNKM	1.800
300	NLHNCVNIIL	1.800
402	FVDQQWLAVR	1.800
217	AINGSFPSIY	1.800
721	FVVLTSCKNK	1.500
220	GSFPSIYMPY	1.350
543	TVKVNLPFGR	1.200
649	LITSNLVPMY	1.200
330	FPRINFFYMY	1.080
762	KPEALWVEER	1.080
434	AIFLAHGSPF	1.000
531	QMLNLTQEEI	0.900
105	SMDGFRAEYL	0.900
295	GLKQRNLHNC	0.900
555	VLQKNVDHCL	0.900
362	EIVRNLSCKR	0.900
536	TQEEITATVK	0.900
632	FLYPPASNRT	0.750
796	QPVSEILQLK	0.675
97	DLPPVILFSM	0.608
742	DVLPFIIPHR	0.608
51	SLCSCSDDCL	0.600
682	GVNVVSGPIF	0.600
579	RMPMWSSYTV	0.600
5	GLENCRCDDVA	0.600
387	RLHYAKNARI	0.600
247	DLPKAERPRF	0.600
570	YVSGFGKAMR	0.600
393	NVRIDKVHLF	0.600

表 XIII-V1-HLA-A3-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、10アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
199	AMYQGLKAAT	0.500
139	AMYPTKTFPN	0.450
648	ALITSNLVPM	0.450
379	YLTPDLPKRL	0.450
437	LAHGSPFKEK	0.450
802	LQLKTYLPTF	0.405
162	GIIDNNMYDV	0.405
481	HLLKVPFYEP	0.405
446	KTEVEPFENI	0.405
545	KVNLPFGRPR	0.360
192	GQPMWLTAMY	0.360
34	RIVMCMKFRFC	0.300
326	MTDYFPRINF	0.300
711	NTDVIPIPTHY	0.300
54	SCSDDCLQKK	0.300
507	PLPTESLDCF	0.300
136	YMRAMYPTKT	0.300
242	LLKWLDPKA	0.300
686	VSGPIFDYNY	0.270
784	LLTGLDFYQD	0.270
767	VVEERFTAHI	0.270
172	NLNKNFSLSS	0.240
656	PMYEEFRKMW	0.225
115	YTWDTLMPNI	0.225
805	KTYLPTFETT	0.225
144	KTFPNHYTIV	0.225
366	NLSCKRPDQH	0.200
801	ILQLKTYLPT	0.200
356	FSFNSEEIVR	0.200
53	CSCSDDCLQK	0.200
120	LMPNINKLKT	0.200
258	TMYFEEDPSS	0.200
368	SCRKPDQHFK	0.200
113	YLYTWDTLMP	0.200
166	NNMYDVNLNK	0.180
495	EVSKFSVCGF	0.180
740	WLDVLPFIIP	0.180
323	MEYMTDYFPR	0.180
563	CLLYHREYVS	0.180
101	VILFSMDGFR	0.180
203	GLKAATYFWP	0.180
322	KMEYMTDYFP	0.180
534	NLTQEEITAT	0.150
167	NMYDVNLNKN	0.150
309	LLADHGMDQT	0.150
596	PLPPTVPDCL	0.135
280	KALQVVDHAF	0.135
31	ESTRIWMCKN	0.135
474	GTHGSLNHLL	0.135

表 XIII-V2-HLA-A3-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号5の一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、10アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
2	SCSDDCLQRK	0.300
8	LQRKCCADY	0.120
1	CSCSDDCLQR	0.040
7	CLQRKDCCAD	0.020
9	QRKCCADYK	0.020
6	DCLQRKCCA	0.001
10	RKCCADYKS	0.000
4	SDDCLQRKDC	0.000
5	DDCLQRKDC	0.000
3	CSDCLQRKD	0.000

表 XIII-V3-HLA-A3-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号7の一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、10アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
3	TNVESCPGGK	0.027
7	SCPGGKPEAL	0.009
8	CPGGKPEALW	0.005
4	NVESCPGGKP	0.001
6	ESCPGGKPEA	0
10	GGKPEALWVE	0
1	RPTNVESCPG	0
2	PTNVESCPGG	0
9	PGGKPEALWV	0
5	VESCPGGKPE	0

表 XIII-V4-HLA-A3-10マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号9の一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、10アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
1	KTYLPTFETP	0.045
2	TYLPTFETPI	0.004

表 XIV-V1-HLA-A11-9マー
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の一部である；
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
1	KTYLPTFETP	0.045
2	TYLPTFETPI	0.004

10

20

30

40

【表18】

開始	部分配列	スコア
610	RVPPSESQK	6.000
363	IVRNLSCKR	2.000
754	NVESCPEGK	2.000
167	NMYDVNLNK	1.600
722	VLTSCKNK	1.500
314	GMDQTYCNK	1.200
655	VPMYEEFRK	1.200
568	REYVSGFGK	1.080
32	STRIWMCNK	1.000
197	LTAMYQGLK	1.000
272	GPVSARVIK	0.900
118	DTLMPNINK	0.900
242	LLKWLDLPK	0.800
618	KCSFYLDK	0.600
390	YAKNVRIDK	0.400
654	LVPMYEEFR	0.400
136	YMRAMYPTK	0.400
384	LPKRLHYAK	0.400
436	FLAHGPSFK	0.400
54	SCSDDCLQK	0.400
667	YFHSVLLIK	0.400
720	YFVLTSCK	0.300
387	RLHYAKNVR	0.240
34	RIWMCNKFR	0.240
797	PVSEILQLK	0.200
8	NCRCDVACK	0.200
120	LMPNINKLK	0.200
632	FLYPPASNR	0.160
337	YMYEGPAPR	0.160
102	ILFMSDGFRR	0.160
324	EYMTDYFPR	0.144
405	QQWLAVRSK	0.120
378	PYLTPDLPK	0.120
144	KTFPNHYTI	0.120
672	LLIKHATER	0.120
554	RVLQKNVDH	0.090
283	QVVDHAFGM	0.090
277	RVIKALQVV	0.090
743	VLPFIPIHR	0.080
291	MLMEGLKQR	0.080
357	SFNSEEIVR	0.080
379	YLTPDLPKR	0.080
245	WLDLPKAER	0.080
62	KKDCCADYK	0.060
794	KVQPVSEIL	0.060
537	QEEITATVK	0.060
682	GVNVVSGPI	0.060
484	KVPFYEPHS	0.060
10	RCDVACKDR	0.060
685	VVSGPIFDY	0.060
640	RTSDSQYDA	0.060
2	SFRGLENCR	0.040
476	HGSLNHLK	0.040
289	FGMLMEGLK	0.040
559	NVDHCLLYH	0.040
317	QTYCNKMEY	0.040
699	FDAPDEITK	0.040
29	CVESTRIWM	0.040

表 XIV-V1-HLA-A11-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の
一部である。
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
550	FGRPRVLQK	0.040
402	FVDQQWLAV	0.040
269	HAGGPVSAR	0.040
236	EERISTLLK	0.036
362	EIVRNLSCKR	0.036
786	TGLDFYQDK	0.030
240	STLLKWLDL	0.030
128	KTCGIHSKY	0.030
474	GTHGSLNHL	0.030
542	ATVKVNLPF	0.030
458	YNLMCDLLR	0.024
663	KMWDYFHSV	0.024
131	GIHSKYMRA	0.024
345	RIRAHNIPH	0.024
155	GLYPESHGI	0.024
203	GLKAATYFW	0.024
395	RIDKVFHFV	0.024
393	NVRIDKVHL	0.020
284	VVDHAFGML	0.020
500	SVCGFANPL	0.020
772	FTAHJARVR	0.020
369	CRKPDQHFV	0.020
71	SVCQGETSW	0.020
55	CSDDCLQKK	0.020
127	LKTCGIHSL	0.020
767	WVEERFAH	0.020
174	NKNFSLSSK	0.020
544	KVKNLPIFGR	0.018
742	DVLPFIIPH	0.018
805	KTYLPTFET	0.018
192	GQPMWLTAM	0.018
90	SQCEGFDL	0.018
297	KQRNLHNCV	0.018
459	NLMCDLLRI	0.016
130	CGIHSKYMR	0.012
5	GLENCRCDV	0.012
42	RCGETRLEA	0.012
253	RPRFYTMFY	0.012
740	WLDVLPFII	0.012
787	GLDFYQDKV	0.012
616	SQKCSFYLA	0.012
350	NIPHDFFSF	0.012

表 XIV-V2-HLA-A11-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号5の
一部である。
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
1	SCSDDCLQR	0.080
9	RKDCCADYK	0.060
2	CSDDCLQRK	0.020
6	CLQRKDCCA	0.004
7	LQRKDCCAD	0.001
8	QRKDCCADY	0.000
5	DCLQRKDCC	0.000
4	DDCLQRKDC	0.000
3	SDDCLQRKD	0.000

表 XIV-V3-HLA-A11-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号7の
一部である。
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
3	NVESCPEGK	2
7	CPGGKPEAL	0.002
6	SCPGGKPEA	0.002
9	GGKPEALWV	0.001
1	PTNVESCPG	0
2	TNVESCPGG	0
4	VESCPGGKP	0
8	PGGKPEALW	0
5	ESCPGGKPE	0

表 XIV-V4-HLA-A11-9マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号9の
一部である。
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、9アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+8である。

開始	部分配列	スコア
2	YLPTFETPI	0.004
1	TYLPTFETP	0.001

表 XV-V1-HLA-A11-10マ-
161P2F10B

各ペプチドは、配列番号3の
一部である。
各開始位置は、特定され、
ペプチド長は、10アミノ酸であり、
そして各ペプチドに対する
末端位置は開始位置+9である。

開始	部分配列	スコア
654	LVPMYEEFRK	6.000

【表 19】

表 XV-V1-HLA-A11-10マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の一部である； 各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
377	KPYLTPDLPK	2.400
135	KYMRAMYPTK	2.400
721	FVLTSCKNK	1.500
543	TVKVNLPFGR	1.200
241	TLLKWLDPK	1.200
126	KLKTCGIHISK	1.200
785	LTGLDFYQDK	1.000
559	NVDHCLLYHR	0.800
719	HYFVLTSCK	0.800
389	HYAKNVRIDK	0.800
536	TQEEITATVK	0.600
666	DYFHSVLLIK	0.480
196	WLTAMYQGLK	0.400
402	FVDQQWLAVR	0.400
570	YVSGFGKAMR	0.400
119	TLMPNINKLK	0.400
698	HFDAPDEITK	0.400
435	IFLAHGPFK	0.300
796	QPVSEILQK	0.300
383	DLPKRHYAK	0.240
54	SCSDDCLQKK	0.200
288	AFGMLMEGLK	0.200
368	SCRKPDQHFK	0.200
742	DVLPFIIPHR	0.180
631	GFLYPPASNR	0.180
290	GMLMEGLKQR	0.180
362	EIVRNLSCKR	0.180
336	FYMYEGPAPR	0.160
457	VYNLMCDLLR	0.160
166	NNMYDVNLNK	0.160
671	VLLIKHATER	0.120
235	FEERISTLLK	0.120
545	KVNLPFGRPR	0.120
762	KPEALWVEER	0.120
653	NLVPMYEEFR	0.120
101	VILFMSDGFR	0.120
437	LAHGPFKEK	0.100
684	NVSGPIFDY	0.090
129	TCGIHISKYMR	0.080
323	MEYMTDYFPR	0.072
567	HREYVSGFGK	0.060
753	TNVEscapeGK	0.060
271	GGPVSARVIK	0.060
682	GVNVSGPIF	0.060
489	EPShAEVSK	0.060
484	KVPFYEPSHA	0.060
144	KTFPNHYTIV	0.060
398	KVHLFVDQQW	0.060
475	THGSLNHLLK	0.040
117	WDTLMPNINK	0.040

表 XV-V1-HLA-A11-10マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の一部である； 各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
173	LNKNFSLSSK	0.040
313	HGMDQTYCNK	0.040
597	LPPTVPDCLR	0.040
284	VVDHAFGMLM	0.040
53	CSCSDDCLQK	0.040
601	VPDCLRADV	0.040
549	PFGRPRVLQK	0.040
162	GIDNNMYDV	0.036
609	VRVPPSESQK	0.030
283	QVVDHAFGML	0.030
640	RTSDSQYDAL	0.030
446	KTEVEPFENI	0.030
474	GTHGSLNHLL	0.030
282	LQVVDHAFGM	0.027
421	GNHGYNNEFR	0.024
663	KMWDYFHSVL	0.024
765	ALWVEERFTA	0.024
579	RMPMWSSYTV	0.024
155	GLYPESHGI	0.024
102	ILFSDMGFRA	0.024
152	IVTGLYPESH	0.020
71	SVCQGETSWL	0.020
304	CVNIILLADH	0.020
207	ATYFWPGSEV	0.020
767	WVEERFTAH	0.020
197	LTAMYQGLKA	0.020
600	TVPDCLRADV	0.020
115	YTWDTLMPNI	0.020
617	QKCSFYLADK	0.020
326	MTDYFPRINF	0.020
317	QTYCNKMEYM	0.020
61	QKKDCCADYK	0.020
393	NVRIDKVHLF	0.020
386	KRLHYAKNVR	0.018
244	KWLDLPKAER	0.018
192	GQPMWLTAMY	0.018
272	GPVSARVIKA	0.018
170	DVNLNKNFSL	0.018
404	DQQWLAVRSK	0.018
400	HLFVDQQWLA	0.016
356	FSFNSEIVR	0.016
128	KTCGIHISKYM	0.015
378	PYLTPDLPKR	0.012
771	RFTAHARVR	0.012
268	GHAGGPVSAR	0.012
250	KAERPRFYTM	0.012
108	GFRAEYLYTW	0.012
573	GFGKAMRMPM	0.012
387	RLHYAKNVR	0.012

表 XV-V2-HLA-A11-10マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号5の一部である； 各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
2	SCSDDCLQRK	0.200
9	QRKDCCADYK	0.020
1	CSCSDDCLQR	0.008
8	LQRKDCCADY	0.006
6	DCLQRKDCCA	0.001
7	CLQRKDCCAD	0.000
10	RKDCCADYKS	0.000
4	SDDCLQRKDC	0.000
5	DDCLQRKDCC	0.000
3	CSDDCLQRKD	0.000

表 XV-V3-HLA-A11-10マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号7の一部である； 各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
3	TNVEscapeGK	0.06
8	CPGGKPEALW	0.002
7	SCPGGKPEAL	0.002
4	NVEscapeGK	0.002
1	RPTNVEscapeG	0.001
10	GGKPEALWVE	0
2	PTNVEscapeG	0
6	ESCPGGKPEA	0
9	PGGKPEALWV	0
5	VESCPGGKPE	0

表 XV-V4-HLA-A11-10マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号9の一部である； 各開始位置は、特定され、ペプチド長は、10アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+9である。		
開始	部分配列	スコア
2	TYLPTFETPI	0.006
1	KTYLPTFETP	0.006

表 XVI-V1-HLA-A24-9マ- 161P2F10B		
各ペプチドは、配列番号3の一部である； 各開始位置は、特定され、ペプチド長は、9アミノ酸であり、そして各ペプチドに対する末端位置は開始位置+8である。		
開始	部分配列	スコア

10

20

30

40

【表 20】

開始	部分配列	スコア
112	EYLYTWDTL	300.000
457	VYNLMCDLL	300.000
328	DYFPRNFF	144.000
156	LYPESHGII	90.000
338	MYEGPAPRI	75.000
666	DYFHSVLLI	50.000
424	GYNNEFRSM	45.000
40	KFRCGETRL	40.000
318	TYCNKMEYM	25.000
288	AFGMLMEGL	24.000
794	KVQPVSIL	20.160
95	GFDLPPVIL	20.000
435	IFLAHGSPF	15.000
135	KYMRAMYPT	15.000
633	LYPEASNRT	10.800
790	FYQDKQPV	10.800
806	TYLPTFETT	10.800
359	NSEEIVRNL	10.080
525	QLEQVQML	10.080
660	EFRKMWDYF	10.000
428	EFRSMEAIF	10.000
569	EYVSGFGKA	9.900
238	RISTLLKWL	9.600
119	TLMPNINKL	9.504
657	MYEEFRKMW	9.000
621	FYLADKNIT	9.000
225	IYMPYNGSV	9.000
200	MYQGLKAAT	9.000
380	LTPDLPKRL	8.640
597	LPPTVPDCL	8.400
140	MYPTKTFPN	7.500
800	EILQLKTYL	7.200
149	HYTIVTGLY	7.000
719	HYFVLTSC	7.000
701	APDEITKHL	6.720
168	MYDVNLNKN	6.600
736	NCPGWL DVL	6.000
259	MYFEEDSS	6.000
138	RAMYPTKTF	6.000
758	CPEGKPEAL	6.000
733	TPENC PGWL	6.000
527	EQVQMLNL	6.000
240	STLLKWL DL	6.000
615	ESQKCSFYL	6.000
165	DNNMYDVNL	6.000
72	VCQGETSWL	6.000
322	KMEYMTDYF	6.000
645	QYDALITSN	6.000
796	QPVSILQL	6.000
171	VNLNKNFSL	6.000
505	ANPLPTESL	6.000
556	LQKNVDHCL	5.600
347	RAHNIPHDF	5.600
540	ITATVKVNL	5.600
274	VSARVIKAL	5.600
208	TYFWPGSEV	5.500
355	FFSFNSEEI	5.500
620	SFYLADKNI	5.000

表 XVI-V1-HLA-A24-9マージ
161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
474	GTHGSLNHL	4.800
456	EYVNL MCDL	4.800
716	IPTHYFVVL	4.800
196	WLTAMYQGL	4.800
90	SQCEGFDL	4.800
500	SVCGFANPL	4.800
400	HLFVDQQWL	4.800
284	VVDHAFGML	4.800
776	IARVRDVEL	4.400
542	ATVKVNL PF	4.200
764	EALWVEERF	4.200
281	ALQVVDHAF	4.200
189	VVHGQPMWL	4.000
512	SLDCFPHL	4.000
393	NVRIDKVHL	4.000
583	WSSYVTPQL	4.000
302	HNCVNIILL	4.000
664	MWDYFHSVL	4.000
548	LPFGRPRVL	4.000
52	LCSCSDDCL	4.000
253	RPRFYTMFY	4.000
641	TSDSQYDAL	4.000
653	NLVPMYEEF	3.960
234	PFEERISTL	3.600
350	NIPHDFSF	3.600
101	VILFSMDGF	3.000
299	RNLHNCVNI	3.000
713	DVPIPTHYF	3.000
683	VNVVSGPIF	3.000
202	QGLKAATYF	3.000
421	GNIHGYNNEF	2.640
739	GWLDVLPFI	2.520
144	KTFPNHYTI	2.400
368	SCRKPDQHF	2.400
479	LNHLLKVPF	2.400
508	LPTESLDCF	2.400
682	GNNVVS GPI	2.100
88	QSQCEPGF	2.000
227	MPYNGSVPF	2.000
496	VSKFSVCGF	2.000
248	LPKAERPRF	2.000
803	QLKTYLPTF	2.000

表 XVI-V2-HLA-A24-9マージ
161P2F10B

各ペプチドは配列番号5の一部である。各開始位置は、特定されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
5	DCLQRKDCC	0.150
6	CLQRKDCCA	0.150
2	CSDDCLQRK	0.014
8	QRKDCCADY	0.012
1	SCSDDCLQR	0.012
4	DDCLQRKDC	0.010
7	LQRKDCCAD	0.010
9	RKDCCADYK	0.002
3	SDDCLQRKD	0.001

表 XVI-V3-HLA-A24-9マージ
161P2F10B

各ペプチドは配列番号7の一部である。各開始位置は、特定されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
7	CPGGKPEAL	4
6	SCPGGKPEA	0.165
9	GGKPEALWV	0.12
2	TNVESCPGG	0.018
3	NVESCPGGK	0.015
5	ESCPGGKPE	0.012
8	PGGKPEALW	0.01
1	PTNVESCPG	0.002
4	VESCPGGKP	0.001

表 XVI-V4-HLA-A24-9マージ
161P2F10B

各ペプチドは配列番号9の一部である。各開始位置は、特定されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
2	YLPTFETPI	1.5
1	TYLPTFETP	1.08

表 XVII-V1-HLA-A24-10マージ
161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。

開始	部分配列	スコア
645	QYDALITSNL	280.000

【表 2 1】

表 XVII-V1-HLA-A24-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号3の一部である:各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
168	MYDVNLNKNF	120.000
565	LYHREYVSGF	100.000
806	TYLPTFETTI	90.000
324	EYMTDYFPRI	90.000
569	EYVSGFGKAM	37.500
112	EYLYTWDTLM	37.500
375	HFKPYLTPDL	28.800
428	EFRSMEAIFL	20.000
790	FYQDKVQPVV	12.600
524	TQLEQVNLQML	12.096
392	KNVRIDKVHL	12.000
700	DAPDEITKHL	10.080
690	IFDYNIDGHF	10.000
95	GFDLPPVILF	10.000
487	FYEPHAEV	9.900
663	KMWDFHFSVL	9.600
640	RTSDSQYDAL	9.600
633	LYPPASNRTS	9.000
283	QVVDHAFGML	8.640
328	DYFPRINFFY	8.400
280	KALQVVDHAF	8.400
555	VLQKNVDHCL	8.400
371	KPDQHFQPYL	8.000
118	DTLMPNINKL	7.920
200	MYQGLKAATY	7.500
692	DYNYDGHFDA	7.500
757	SCPEGKPEAL	7.200
504	FANPLPTESL	7.200
511	ESLDCFCPHL	7.200
195	MWLTAMYQGL	7.200
732	HTPENCPGWL	7.200
499	FSVCGFANPL	7.200
43	CGETRLEASL	7.200
358	FNSEIVRNL	6.720
547	NLPFGRPRVL	6.000
170	DVNLNKNFSL	6.000
795	VQPVSEILQL	6.000
89	QSQCPEGFDL	6.000
470	APNNGTHGSL	6.000
209	YFWPGSEVAI	6.000
588	VPQLGDTSPV	6.000
292	LMEGLKQRNL	6.000
379	YLTPDLPKRL	5.760
300	NLHNCVNIL	5.600
539	EITATVKVNL	5.600
68	DYKSVQGET	5.500
354	DDFSVQSEEI	5.500
234	PFEERISTLL	5.040
114	LYTWDTLMPN	5.000
318	TYCNKMEYMT	5.000

表 XVII-V1-HLA-A24-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号3の一部である:各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
208	TYFWPGSEVA	5.000
585	SYTVPQLGDT	5.000
735	ENCPGWLVDL	4.800
287	HAFGMMEGL	4.800
473	NGTHGSLNHL	4.800
474	GTHGSLNHLL	4.800
233	VPFEERISTL	4.800
94	EGFDLPPVIL	4.800
329	YFPRINFFYM	4.500
775	HIARVRDVEL	4.400
349	HNIPHDFFSF	4.320
213	GSEVAINGSF	4.200
51	SLCSCSDDCL	4.000
71	SVCQGETSWL	4.000
239	ISTLLKWLDL	4.000
517	CPHLQNSTQL	4.000
582	MWSSYTPQL	4.000
188	AWWHGQPMWL	4.000
776	IARVRDVELL	4.000
347	RAHNIPHDFF	4.000
105	SMDGFRAEYL	4.000
556	LQKNVDHCLL	4.000
456	EYVNLKCDLL	4.000
664	MWDFHFSVLL	4.000
420	GGNHYNNNEF	3.960
478	SLNHLLKVPF	3.600
299	RNLHNCVNII	3.600
446	KTEVEPFENI	3.600
652	SNLVPMYEEF	3.300
247	DLPKAERPRF	3.000
802	LQLKTYLPTF	3.000
87	ACQSQCPEGF	3.000
226	YMPYNGSVPF	3.000
451	PFENIEVYNL	3.000
682	GVNVVSGPIF	3.000
781	DVELLTGLDF	3.000
623	LADKNLTHGF	2.800
541	TATVKVNLPF	2.800
32	STRIWMCNKF	2.640
573	GFGKAMRMPM	2.500
367	LSCRKPDQHF	2.400
739	GWLDVLPFII	2.160
681	NGVNVVSGPI	2.100
434	AIFLAHGSPF	2.000
393	NVRIDKVHLF	2.000
737	CPGWLDVLPF	2.000
495	EVSKFVSCGF	2.000
326	MTDYFPRINF	2.000
201	YQGLKAATYF	2.000

表 XVII-V2-HLA-A24-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号5の一部である:各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
6	DCLQRKDCCA	0.150
8	LQRKDCCADY	0.100
10	RKDCCADYKS	0.022
3	CSDCLQRKD	0.016
7	CLQRKDCCAD	0.015
2	SCSDCLQRK	0.014
4	SDDCLQRKDC	0.010
1	CSCSDDCLQR	0.010
5	DDCLQRKDCC	0.010
9	QRKDCCADYK	0.001

表 XVII-V3-HLA-A24-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号7の一部である:各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
7	SCPGKPEAL	6
6	ESCPGKPEA	0.132
8	CPGKPEALW	0.1
1	RPTNVESCPG	0.02
3	TNVESCPGGK	0.018
4	NVESCPGGKP	0.017
10	GGKPEALWVE	0.012
9	PGKPEALWV	0.01
2	PTNVESCPGG	0.002
5	VESCPGGKPE	0.001

表 XVII-V4-HLA-A24-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号9の一部である:各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
2	TYLPTFETPI	90
1	KTYLPTFETP	0.024

表 XVIII-V1-HLA-B7-9マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号3の一部である:各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。		

【表 2 2】

開始	部分配列	スコア
343	APRIRAHNI	240.000
330	FPRINFFYM	200.000
393	NVRIDKVHL	200.000
776	IARVRDVEL	120.000
548	LPFGRPRVL	80.000
716	IPHYFVWL	80.000
796	QPVSEILQL	80.000
597	LPPTVPDCL	80.000
701	APDEITKHL	72.000
552	RPRVLQKNV	40.000
758	CPEGKPEAL	24.000
733	TPENCPGWL	24.000
500	SVCGFANPL	20.000
456	EVYNLMCDL	20.000
98	LPPVILFSM	20.000
794	KVQPVSEIL	20.000
505	ANPLPTESL	18.000
580	MPMWSSYTV	12.000
119	TLMPNINKL	12.000
284	VVDHAFGML	6.000
283	QVVDHAFGM	5.000
570	YVSGFGKAM	5.000
778	RVRDVELLT	5.000
274	VSARVIKAL	4.000
240	STLLKWLDL	4.000
736	NCPGWLQVL	4.000
90	SQCPEGFDL	4.000
714	VPIPTHYFV	4.000
800	EILQLKTYL	4.000
196	WLTAMYQGL	4.000
540	ITATVKVNL	4.000
238	RISTLLKWL	4.000
253	RPRFYTYMYF	4.000
72	VCQGETSWL	4.000
474	GTHGSLNHL	4.000
40	KFRCGETRL	4.000
400	HLFVDQQWL	4.000
615	ESQKCSFYL	4.000
171	VNLNKNFSL	4.000
527	EQVQNMLNL	4.000
165	DNNMYDVNL	4.000
583	WSSYTPVQL	4.000
380	LTPDLPKRL	4.000
556	LQKNVDHCL	4.000
52	LCSCSDCL	4.000
302	HNCVNIILL	4.000
251	AERPRFYTM	3.000
233	VPFEERIST	3.000
409	AVRSKSNTN	3.000
29	CVESTRIWM	2.250
146	FPNHYTIVT	2.000
682	GVNVVSGPI	2.000
485	VPFYEPSHA	2.000
611	VPPSESQKC	2.000
297	KQRNLHNCV	2.000
121	MPNINKLKT	2.000
601	VPDCLRADV	1.800
608	DVRVPPSES	1.500

表 XVIII-V1-HLA-B7-9マー
161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
574	FGKAMRMPM	1.500
219	NGSFPSIYM	1.500
288	AFGMLMEGL	1.200
459	NLMCDLLRI	1.200
525	QLEQVQNML	1.200
512	SLDCFCPHL	1.200
193	QPMWLTAMY	1.200
217	AINGSFPSI	1.200
641	TSDSQYDAL	1.200
777	ARVRDVELL	1.200
359	NSEIVRNL	1.200
470	APNNGTHGS	1.200
453	ENIEVYNLM	1.000
307	IILLADHGM	1.000
113	YLYTWDTLM	1.000
572	SGFGKAMRM	1.000
524	TQLEQVQNML	1.000
129	TCGIHSKYM	1.000
192	GQPMWLTAM	1.000
649	LITSNLVPM	1.000
45	ETRLEASLC	1.000
277	RVIKALQVV	1.000
198	TAMYCGLKA	0.900
577	AMRMPMWSS	0.900
248	LPKAERPRF	0.600
655	VPMYEEFRK	0.600
647	DALITSNLV	0.600
270	AGGPVSARV	0.600
528	QVNQMLNLT	0.500
363	IVRNLSRCK	0.500
670	SVLLIKHAT	0.500
13	VACKDRGDC	0.450
589	PQLGDTSP	0.400
708	HLANTDVPI	0.400
299	RNLHNCVNI	0.400
807	YLPTFETTI	0.400
475	THGSLNHL	0.400
452	FENIEVYNL	0.400
94	EGFDLPPVI	0.400
227	MPYNGSVPF	0.400
471	PNNGTHGSL	0.400
211	WPGSEVAIN	0.400

表 XVIII-V2-HLA-B7-9マー
161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
5	DCLQRKDCC	0.100
6	CLQRKDCCA	0.100
7	LQRKDCCAD	0.100
4	DDCLQRKDC	0.015
1	SCSDDCLQR	0.010
2	CSDDCLQRK	0.003
8	QRKDCCADY	0.002
3	SDDCLQRKD	0.000
9	RKDCCADYK	0.000

表 XVIII-V3-HLA-B7-9マー
161P2F10B

各ペプチドは配列番号7の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
7	CPGGKPEAL	80
9	GGKPEALWV	0.2
6	SCPGGKPEA	0.1
3	NVESCPCGGK	0.015
5	ESCPGGKPE	0.01
2	TNVESCPCGG	0.01
8	PGGKPEALW	0.003
4	VESCPCCGKP	0.002
1	PTNVESCPCG	0.001

表 XVIII-V4-HLA-B7-9マー
161P2F10B

各ペプチドは配列番号9の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
2	YLPTFETPI	0.4
1	TYLPTFETP	0.001

表 XIX-V1-HLA-B7-10マー
161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。

開始	部分配列	スコア
470	APNNGTHGSL	240.000

【表 2 3】

表 XIX-V1-HLA-B7-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号3の一部である;各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
776	IARVRDVELL	120.000
588	VPQLGDTSPIL	80.000
517	CPHLQNSTQL	80.000
233	VPFEERISTL	80.000
655	VPMYEEFRKM	60.000
371	KPDQHFKPYL	24.000
283	QVVDHAFGML	20.000
186	NPAWWHGQPM	20.000
170	DVNLNKNFSL	20.000
456	EYVNLMDLL	20.000
71	SVCGQGETSWL	20.000
504	FANPLPTESL	18.000
409	AVRSKSNINC	15.000
287	HAFGMLMEGL	12.000
700	DAPDEITKHL	12.000
94	EGFDLPPVIL	6.000
343	APRIRAHNIP	6.000
275	SARVIKALQV	6.000
300	NLHNCVNIIL	4.000
89	QSQCPEGFDL	4.000
775	HIARVRDVEL	4.000
239	ISTLLKWLDL	4.000
392	KNVRIDKVLH	4.000
440	GPSFKEKTEV	4.000
547	NLPFGRPRVL	4.000
795	VQPVSEILQL	4.000
732	HTPENCPGWL	4.000
473	NGTHGSLNHL	4.000
555	VLQKNVDHCL	4.000
511	ESLDCFCPHL	4.000
51	SLCSCSDCL	4.000
714	VPITPHYFV	4.000
757	SCPEGKPEAL	4.000
330	FPRINFFYMY	4.000
663	KMWDYFHSVL	4.000
640	RTSDSQYDAL	4.000
524	TQLEQVQML	4.000
428	EFRSMEAIFL	4.000
358	FNSEEIVRNL	4.000
735	ENCPGWLDVL	4.000
118	DTLMPNINKL	4.000
539	EITATVKVNL	4.000
556	LQKNVDHCLL	4.000
474	GTHGSLNHLL	4.000
499	FSVCGFANPL	4.000
379	YLTPDLPKRL	4.000
744	LPIIPIHRPT	3.000
648	ALITSNLVPM	3.000
716	IPTHYFVLT	2.000
552	RPRVLQKNVD	2.000

表 XIX-V1-HLA-B7-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号3の一部である;各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
595	SPLPPTVPC	2.000
272	GPVSARVIKA	2.000
273	PVSARVIKAL	2.000
508	LPTESLDCFC	2.000
253	RPRFYTMFE	2.000
121	MPNINKLKT	2.000
506	NPLPTESLDC	2.000
701	APDEITKHLA	1.800
600	TVPDCLRADV	1.500
218	INGSFPSIYM	1.500
28	TCVESTRIWM	1.500
284	VVDHAFGMLM	1.500
43	CGETRLEASL	1.200
270	AGGPVSARVI	1.200
292	LMEGLKQRNL	1.200
105	SMDGFRAEYL	1.200
624	ADKNITHGFL	1.200
188	AWWHGQPMWL	1.200
216	VAINGSFPSI	1.200
92	CPEGFDLPPV	1.200
111	AELYTWDTL	1.200
571	VSGFKAMRM	1.000
423	HGYNNEFRSM	1.000
713	DVPIPTHYFV	1.000
191	HGQPMWLTAM	1.000
393	NVRIDKVLHF	1.000
159	ESHGIIDNNM	1.000
523	STQLEQVQNM	1.000
282	LQVVDHAFGM	1.000
97	DLPPVILFSM	1.000
136	YMRAMYPTKT	1.000
306	NIILLADHGM	1.000
317	QTYCNKMEYM	1.000
131	GIHSKYMRAM	1.000
128	KTCGIHSKYM	1.000
207	ATYFWPGSEV	0.900
198	TAMYQGLKAA	0.900
250	KAERPRFYTM	0.900
12	DVACKDRGDC	0.750
232	SVPFEERIST	0.750
608	DVRVPPSESQ	0.750
337	YMYEGPAPRI	0.600
676	HATERNGVNV	0.600
390	YAKNVRIDKV	0.600
773	TAHIARVRDV	0.600
193	QPMWLTAMYQ	0.600
767	VVEERPTAHI	0.600
580	MPMWSSYTVP	0.600
269	HAGGPVSARV	0.600

表 XIX-V2-HLA-B7-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号5の一部である;各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
8	LQRKDCCADY	0.200
6	DCLQRKDCCA	0.100
7	CLQRKDCCAD	0.010
1	CSCSDDCLQR	0.010
5	DDCLQRKDCC	0.010
2	SCSDDCLQRK	0.010
4	SDDCLQRKDC	0.004
3	CSDDCCLQRK	0.003
9	QRKDCCADYK	0.001
10	RKDCCADYKS	0.001

表 XIX-V3-HLA-B7-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号7の一部である;各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
7	SCPGGKPEAL	4
8	CPGGKPEALW	0.6
1	RPTNVESCPG	0.2
6	ESCPGGKPEA	0.1
4	NVESCPGGKP	0.023
9	PGGKPEALWV	0.02
10	GGKPEALWVE	0.01
3	TNVESCPGGK	0.01
2	PTNVESCPGG	0.001
5	VESCPGGKPE	0.001

表 XIX-V4-HLA-B7-10マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号9の一部である;各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。		
開始	部分配列	スコア
2	TYLPTFETPI	0.04
1	KTYLPTFETP	0.01

表 XX-V1-HLA-B3501-9マー 161P2F10B		
各ペプチドは配列番号3の一部である;各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。		

【表 2 4】

開始	部分配列	スコア
253	RPRFYTYMYF	120.000
330	FPRINFFYIM	120.000
248	LPKAERPRF	90.000
450	EPFENIEVY	80.000
98	LPPVILFSM	40.000
508	LPTESLDCF	40.000
193	QPMWLTAMY	40.000
133	HSKYMRAMY	30.000
796	QPVSEILQL	30.000
552	RPRVLQKNV	24.000
371	KPDQHFQPY	24.000
343	APRIRAHNI	24.000
597	LPPTVDPCL	20.000
548	LPGGRPRVL	20.000
716	IPHYFVVL	20.000
227	MPYNGSVPF	20.000
496	VSKFSVCGF	15.000
701	APDEITKHL	12.000
776	IARVRDVEL	9.000
558	KNVDHCLLY	8.000
733	TPENCPGWL	6.000
758	CPEGKPEAL	6.000
347	RAHNIPHDF	6.000
138	RAMYPTKTF	6.000
638	SNRTSDSQY	6.000
233	VPFEERIST	6.000
574	FGKAMRMPM	6.000
583	WSSYTPVQL	5.000
615	ESQKCSFYL	5.000
274	VSARVIKAL	5.000
393	NVRIDKVHL	4.500
453	ENIEVYNLM	4.000
128	KTCGIHISKY	4.000
580	MPMWSSYTV	4.000
714	VPIPTHYFV	4.000
351	IPHDFFSFN	4.000
626	KNITHGFLY	4.000
283	QVVDHAFGM	4.000
524	TQLEQVNQM	4.000
803	QLKTYLPTF	3.000
611	VPPSESQKC	3.000
368	SCRKPDQHF	3.000
359	NSEEIVRNL	3.000
556	LQKNVDHCL	3.000
764	EALWVEERF	3.000
485	VPFYEPSHA	3.000
161	HGIIDNNMY	3.000
180	SSKEQNNPA	3.000
211	WPGSEVAIN	3.000
238	RISTLLKWL	2.000
222	FPSIYMPYN	2.000
562	HCLLYHREY	2.000
685	VVSGPIFDY	2.000
649	LITSNLVPM	2.000
650	ITSNLVPMY	2.000
146	FPNHYTIVT	2.000
218	INGSFPSIY	2.000
634	YPPASNRTS	2.000

表 XX-V1-HLA-B3501-9マー・
161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
107	DGFRAEYLY	2.000
783	ELLTGLDFY	2.000
570	YVSGFGKAM	2.000
121	MPNINKLKT	2.000
113	YLYTWDITLM	2.000
317	QTYCNKMEY	2.000
231	GSVPFEERI	2.000
417	NCGGGNHGY	2.000
219	NGSFPSIYM	2.000
129	TCGIHISKYM	2.000
201	YQGLKAATY	2.000
307	IILLADHGM	2.000
687	SGPIFDYNY	2.000
192	GQPMWLTAM	2.000
489	EPSHAEEVS	2.000
794	KVQPVSEIL	2.000
470	APNNGTHGS	2.000
572	SGFGKAMRM	2.000
430	RSMEAIFLA	2.000
380	LTPDLPKRL	2.000
641	TSDSQYDAL	1.500
203	GLKAATYFW	1.500
350	NIPHDFFSF	1.500
406	HLFVDQQWL	1.500
90	SQCPEGFDL	1.500
72	VCQGETSWL	1.500
124	INKLKTGGI	1.200
61	QKDKCCADY	1.200
778	RVRDVELLT	1.200
601	VPDCLRADV	1.200
297	KQRNLHNCV	1.200
736	NCPGWLDVL	1.000
732	HTPENCPGW	1.000
196	WLTAMYQGL	1.000
28	TCVESTRIW	1.000
683	VNVVSGPIF	1.000
202	QGLKAATYF	1.000
500	SVCGFANPL	1.000
527	EQVNQMLNL	1.000
88	QSQCPEGF	1.000
713	DVPIPTHYF	1.000
302	HNCVNIILL	1.000

表 XX-V2-HLA-B35-9マー・
161P2F10B

各ペプチドは配列番号5の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
8	QRKDCCADY	1.200
5	DCLQRKDC	0.100
6	CLQRKDCCA	0.100
7	LQRKDCCAD	0.045
1	SCSDCLQR	0.030
2	CSDDCLQRK	0.030
4	DDCLQRKDC	0.010
9	RKDCCADYK	0.001
3	SDDCLQRKD	0.000

表 XX-V3-HLA-B35-9マー・
161P2F10B

各ペプチドは配列番号7の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
7	CPGGKPEAL	20
9	GGKPEALWV	0.9
6	SCPGGKPEA	0.1
8	PGGKPEALW	0.05
5	ESCPGGKPE	0.05
2	TNVESCPGG	0.02
3	NVESCPGGK	0.003
1	PTNVESCPG	0.002
4	VESCPGGKP	0.001

表 XX-V4-HLA-B35-9マー・
161P2F10B

各ペプチドは配列番号9の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは9アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 8である。

開始	部分配列	スコア
2	YLPTFETPI	0.4
1	TYLPTFETP	0.001

表 XXI-V1-HLA-B35-10マー・
161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。

開始	部分配列	スコア
248	LPKAERPRFY	120.000

【表 25】

表 XXI-V1-HLA-B35-10マー・161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。

開始	部分配列	スコア
330	FPRINFFYMY	120.000
655	VPMYEEFRKM	60.000
233	VPFEERSTL	40.000
141	YPTKTFPNHY	40.000
186	NPAWWHGGQPM	40.000
737	CPGWLDVLPF	30.000
588	VPQLGDTSP	30.000
104	FSMDGFRAEY	20.000
470	APNNGTHGSL	20.000
517	CPHLQNSTQL	20.000
180	SSKEQNPAW	15.000
776	IARVRDVELL	13.500
371	KPDQHFQPYL	12.000
381	TPDLPKRLHY	12.000
686	VSGPIFDYNY	10.000
220	GSFPSIYMPY	10.000
571	VSGFGKAMRM	10.000
511	ESLDCFCPHL	10.000
159	ESHGIIDNNM	10.000
637	ASNRTSDSQY	10.000
89	QSQCPEGFDL	7.500
280	KALQVVDHAF	6.000
700	DAPDEITKHL	6.000
347	RAHNIPHDF	6.000
577	AMRMPMWSSY	6.000
320	CNKMEYMTDY	6.000
440	GPSFKEKTEV	6.000
384	LPKRLHYAKN	6.000
60	LQKDCCADY	6.000
499	FSVCGFANPL	5.000
239	ISTLLKWL	5.000
367	LSCRKPDQHF	5.000
70	KSVCQGETSW	5.000
556	LQKNVDHCLL	4.500
612	PPSESQKCSF	4.000
640	RTSDSQYDAL	4.000
351	IPHDFFSFNS	4.000
508	LPTESLDCFC	4.000
663	KMWDFHHSV	4.000
714	VPIPTHYFV	4.000
28	TCVESTRIWM	4.000
450	EPFENIEVYN	4.000
128	KTCGIHSCYM	4.000
250	KAERPRFYTM	3.600
287	HAFGMLMEGL	3.000
32	STRIWMCNKF	3.000
393	NVRIDKVHLF	3.000
14	ACKDRGDCCW	3.000
392	KNVRIDKVHL	3.000

表 XXI-V1-HLA-B35-10マー・161P2F10B

各ペプチドは配列番号3の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。

開始	部分配列	スコア
758	CPEGKPEALW	3.000
541	TATVKVNLFP	3.000
423	HGYNNEFRSM	3.000
506	NPLPTESLDC	3.000
798	VSEILQLKTY	3.000
504	FANPLPTESL	3.000
97	DLPPVILFSM	2.000
316	DQTYCNKMEY	2.000
595	SPLPPTVPDC	2.000
272	GPVSARVIKA	2.000
648	ALITSNLVPM	2.000
479	LNHLLKVPFY	2.000
283	QVVDHAFGML	2.000
416	TNCGGGNHGY	2.000
131	GIHSCYMRAM	2.000
649	LITSNLVPMY	2.000
684	NVSGPIFDY	2.000
306	NIILLADHGM	2.000
121	MPNINKLKTC	2.000
358	FNSEIIVRNL	2.000
218	INGSFPSIYM	2.000
192	GQPMWLTAMY	2.000
317	QTYCNKMEYM	2.000
757	SCPEGKPEAL	2.000
611	VPPSESQKCS	2.000
744	LPIIHRPT	2.000
217	AINGSFPSIY	2.000
191	HGQPMWLTAM	2.000
341	GPAPRIRAHN	2.000
732	HTPENCPGWL	2.000
282	LQVVDHAFGM	2.000
716	IPHYFVYLT	2.000
94	EGFDLPPVIL	2.000
523	STQLEQVQNM	2.000
619	CSFYLDADKNI	2.000
524	TQLEQVQNML	2.000
748	IPHRPTNVES	2.000
390	YAKNVRIDKV	1.800
310	LADHGMDQTY	1.800
275	SARVIKALQV	1.800
92	CPEGFDLPPV	1.800
71	SVCQGETSWL	1.500
213	GSEVAINGSF	1.500
349	HNIPHDFFSF	1.500
795	VQPVSEILQL	1.500
574	FGKAMRMPMW	1.500
496	VSKFSVCGFA	1.500
247	DLPKAERPRF	1.500
552	RPRVLQKNVD	1.200
676	HATERNGVNV	1.200

表 XXI-V2-HLA-B35-10マー・161P2F10B

各ペプチドは配列番号5の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。

開始	部分配列	スコア
8	LQRKCCADY	6.000
6	DCLQRKCCA	0.100
1	CSCSDCLQR	0.075
3	CSDDCLQRK	0.030
2	SCSDCLQRK	0.020
7	CLQRKCCAD	0.015
5	DDCLQRKCC	0.010
9	QRKCCADYK	0.006
10	RKCCADYKS	0.006
4	SDCLQRKDC	0.003

表 XXI-V3-B35-10マー・161P2F10B

各ペプチドは配列番号7の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。

開始	部分配列	スコア
8	CPGGKPEALW	10
7	SCPGGKPEAL	1
1	RPTNVESCPG	0.6
6	ESCPGGKPEA	0.5
9	PGGKPEALWV	0.03
10	GKPEALWVE	0.03
3	TNVESCPGGK	0.02
4	NVESCPGGK	0.003
2	PTNVESCPGG	0.001
5	VESCPGGKPE	0.001

表 XXI-V4-HLA-B35-10マー・161P2F10B

各ペプチドは配列番号9の一部である。各開始位置は、特定化されており、ペプチドの長さは10アミノ酸であり、各ペプチドの末端位置は、開始位置 + 9である。

開始	部分配列	スコア
2	TYLPTFETPI	0.04
1	KTYLPTFETP	0.02

10

20

30

40

【表 26】

表 XXII-XLIX:

表 XXII-V1-HLA-A1-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
165	SMDGFRAEY	29
431	KPDQHFKPY	28
442	PDLPKRLHY	26
188	KTCGIHSKY	24
618	KNVDHCLLY	23
710	ITSNLVPMY	23
858	VSEILQLKT	23
8	ATEQPVKKN	21
193	HSKYMRAMY	21
202	PTKTFPNHY	21
377	QTYCNKMEY	21
491	SMEAIFLAH	21
209	HYTIVTGLY	19
391	PRINFFYMY	19
462	FVDQQWLAV	19
477	NCGGGNHGY	19
514	NEVYNLMC	19
638	MRMPMWSSY	19
772	TDVPIPTHY	19
859	SEILQLKTY	19
13	VKKNLTKKY	18
389	YFPRINFFY	18
455	RIDKVHLFV	18
686	KNITHGLFY	18
737	ATERNGVNV	18
745	VSGPIFDY	18
843	ELLTGLDFY	18
152	CPEGFDLPP	17
167	DGFRAEYLY	17
217	YPESHGIID	17
221	HGIIDNNMY	17
261	YQGLKAATY	17
281	SFPSIYMPY	17
371	ADHGMDQTY	17
420	SEEVNRNLS	17
674	SESQKCSFY	17
698	SNRTSDSQY	17
747	SGPIFDYNY	17
771	NTDVPIPTH	17
839	VRDVELLTG	17
115	CSDDCLOKQK	16
134	QGETSWLEE	16
253	QPMWLTAMY	16
312	ERPRFYTMY	16
381	NKMEYMTDY	16
386	MTDYFPRIN	16
506	KTEVEPFEN	16
510	EPFENIEVY	16
540	NHLLKVPFY	16
569	PTESLDCFC	16
602	ATVKVNLPF	16
619	NVDHCLLYH	16
622	HCLLYHREY	16
651	LGDTSPPLP	16

表 XXII-V1-HLA-A1-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
659	PTVPDCLRA	16
673	PSESQKCSF	16
701	TSDSQYDAL	16
89	CVESTRIWM	15
121	QKKDCCADY	15
210	YTIIVTGLYP	15
278	INGSFPSIY	15
309	PKAERPRFY	15
321	FEEPDSSEGH	15
344	VVDHAFGML	15
419	NSEIVRNIL	15
521	MCDLLRIQP	15
547	FYEPShAE	15
585	QLEQVNOQL	15
719	EEFRKMWDY	15
851	YQDKVQVPS	15
47	KLEKQGSCR	14
116	SDDCLQKQD	14
273	GSEVAINGS	14
300	STLLKWLDL	14
508	EVEPFENIE	14
646	YTVPQLGDT	14
754	NYDGHFDAP	14
847	GLDFYQDKV	14

表 XXII-V2-HLA-A1-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
8	QRKDCCADY	15
2	CSDDCLOQRK	14
3	SDDCLQKQD	14
9	RKDCCADYK	10
1	SCSDDCLOQR	8

表 XXII-V3-HLA-A1-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
5	ESCPGGKPE	11
3	NVESCPGGK	10
9	GGKPEALWV	10
1	PTNVESCPG	6
4	VESCPGGKP	5

表 XXII-V4-HLA-A1-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
1	TYLPTFETP	7
2	YLPTFETPI	3

表 XXIII-V1-HLA-A0201-9マー 161P2F10B		
Pos	123456789	score
179	TLMPNINKL	30
40	GLGLGLRKL	29

表 XXIII-V1-HLA-A0201-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
723	KMWDYFHSV	25
27	VLLALLVIM	24
29	LALLVIMSL	24
31	LLVIMSLGL	24
215	GLYPESHGI	24
277	AINGSFPSI	24
519	NLMCDLLRI	24
572	SLDCFCPHL	24
33	VIMSLGLGL	23
360	NLHNCVNI	23
847	GLDFYQDKV	23
867	YLPTFETI	23
23	IACIVLLAL	22
298	RISTLLKWL	22
534	GTHGSLNHL	22
607	NLPFGRPRV	22
768	HLANTDVP	22
24	ACIVLLALL	21
26	IVLALLVI	21
223	IIDNNMYDV	21
259	AMYQGLKAA	21
460	HLFVDQQWL	21
592	MLNLTQEEI	21
623	CLLYHREYV	21
21	YKIACIVLL	20
22	KIACIVLLA	20
25	CIVLLALLV	20
65	GLENCRCDV	20
256	WLTAMYQGL	20
300	STLLKWLDL	20
337	RVIKALQVV	20
385	YMTDYFPRI	20
439	YLPDLPKR	20
537	GSLNHLLKV	20
560	SVCGFANPL	20
600	ITATVKVNL	20
807	IIPHRPTNV	20
836	IARVRDVEL	20
28	LLALLVIMS	19
37	LGLGLGLGL	19
204	KTFPNHYTI	19
451	AKNVRIDKV	19
455	RIDKVHLFV	19
585	QLEQVNOQL	19
653	DTSPLPPTV	19
709	LITSNLVPM	19
800	WLDVLPFII	19
5	LTLATEQPV	18
36	SLGLGLGLG	18
285	IYMPYNGSV	18
351	MLMEGLKQR	18
367	IILLADHGM	18
443	DLPKRLHYA	18
682	YLADKNITH	18
731	VLLIKHATE	18
834	AHIARVRDV	18

10

20

30

40

【表 27】

表 XXIII-V1-HLA-A0201-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
840	RDVELLTGL	18
860	EILQLKTYL	18
35	MSLGLGLGL	17
38	GLGLGLGLR	17
139	WLEENCDTA	17
165	SMDGFRAEY	17
173	YLYTWDTLM	17
334	VSARVIKAL	17
397	YMYEGPAPR	17
440	LTPDLPKRL	17
462	FVDQQWLAV	17
512	FENIEVYNL	17
538	SLNHLLKVP	17
565	ANPLPTESL	17
595	LTQEEITAT	17
596	TQEEITATV	17
737	ATERNGVNV	17
738	TERNGVNVV	17
799	GWLDVLPFI	17
825	ALWVEERT	17
850	FYQDKVQPV	17
854	KVQPVSEIL	17
863	QLKTYLPTF	17
34	IMSLGLGLG	16
157	DLPPVLFSS	16
208	NHYTIVTGL	16
231	VNLKNFSL	16
301	TLKWLDP	16
330	AGGPVSARV	16
453	NVRIDKVLH	16
520	LMCDLLRIQ	16
646	YTPQLGDT	16
706	YDALITSNL	16
707	DALITSNLV	16
732	LLIKHATER	16
774	VPIPTHYFV	16
796	NCPGWLDVL	16
806	FIHPHPTN	16
837	ARVRDVELL	16
861	ILQLKTYLP	16
18	LKQKIACI	15
104	GETRLEASL	15
107	RLEASLCSL	15
119	CLQKDCCA	15
132	VCOGETSWL	15
211	TIVTGLYPE	15
305	WLDLPKAER	15
328	GHAGGPVSA	15
340	KALQVVDHA	15
344	WDHAFGML	15
369	LLADHGMDD	15
419	NSEEIVRNL	15
496	FLAHGPSFK	15
542	LLKVPFYEP	15
591	QMLNLTQEE	15
594	NLTQEEITA	15

表 XXIII-V1-HLA-A0201-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
598	EEITATVKV	15
608	LPFGRPRVL	15
615	VLQKNVDHC	15
692	FLYPPASNR	15
708	ALITSNLVP	15
735	KHATERNGV	15
761	APDEITKHL	15
775	PIPTHYFVV	15
803	VLPFIIPHR	15
831	RFTAHARV	15
843	ELLTGLDFY	15
856	QPVSEILQL	15
865	KTYLPTFET	15
30	ALLVIMSLG	14
42	GLGLRKLEK	14
150	SQCEPGEFDL	14
155	GFDLPPVIL	14
191	GIHSKYMRA	14
268	TYFWPGSEV	14
270	FWPGSEVAI	14
284	SIYMPYNGS	14
294	PFEERISTL	14
303	LKWLDPKA	14
336	ARVIKALQV	14
341	ALQVVDHAF	14
348	AFGMLMEGL	14
350	GMLMEGLKQ	14
362	HNCVNIILL	14
368	ILLADHGMD	14
436	FKPYLTPDL	14
448	LHYAKNVRI	14
524	LLRIQPAPN	14
548	YEPHAEV	14
581	QNSTOLEQV	14
588	QVQNMLNLT	14
624	LLYHREYVS	14
640	MPMWSSYTV	14
643	WSSYTVPQL	14
656	PLPPTVPDC	14
661	VPCDLRADV	14
664	CLRADVRVP	14
688	ITHGFLYPP	14
713	NLVPMYEEF	14
716	PMYEEFRKM	14
730	SVLLIKHAT	14
742	GVNVVSGPI	14
764	EITKHLANT	14
776	IPHYFVVL	14
844	LLTGLDFYQ	14
853	DKVQPVSEI	14

表 XXIII-V2-HLA-A0201-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
6	CLQRKDCCA	15
2	CSDDCLQRK	5

表 XXIII-V2-HLA-A0201-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
3	SDDCLQRKD	5

表 XXIII-V3-HLA-A0201-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
7	CPGGKPEAL	14
6	SCPGGKPEA	13
9	GGKPEALWV	13

表 XXIII-V4-HLA-A0201-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
2	YLPTFETPI	21

表 XXIV-V1-HLA-A0203-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
結果なし		

表 XXIV-V2-HLA-A0203-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
結果なし		

表 XXIV-V3-HLA-A0203-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
結果なし		

表 XXIV-V4-HLA-A0203-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
結果なし		

表 XXV-V1-HLA-A3-9マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
670	RVPPSESQK	33
496	FLAHGPSFK	27
692	FLYPPASNR	27
42	GLGLRKLEK	26
423	IVRNLSRCK	26
6	TLATEQPVK	25
614	RVLQKNVDH	25
12	PVKKNTLKK	24
302	LLKWLDPK	24
610	FGRPRVLQK	24
47	KLEKQGSCR	23
708	ALITSNLVP	23
26	MLLALLVI	22
447	RLHYAKNVR	22
782	VLTSCKNK	22
838	RVRDVELLT	22
337	RVIKALQVV	21
405	RIRAHNIPH	21

【表 2 8】

表 XXV-V1-HLA-A3-9 マー- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
469	AVRSKSNTN	21
597	QEEITATVK	21
628	REYVSGFGK	21
682	YLADKNITH	21
731	VLLIKHATE	21
732	LLIKHATER	21
814	NVESCPEGK	21
857	PVSEILQLK	21
863	QLKTYLPTF	21
39	LGLGLGRK	20
351	MLMEGLKQR	20
624	LLYHREYVS	20
843	ELLTGLDFY	20
196	YMRAMYPTK	19
227	NMYDVNLNK	19
338	VIKALQVVD	19
341	ALQVDHAF	19
544	KVPFYEPSH	19
664	CLRADVRVP	19
802	DVLPFIIPH	19
806	FIIPHRPTN	19
827	WVEERFAH	19
27	VLLALLVIM	18
30	ALLVIMSLG	18
38	GLGLGLGLR	18
107	RLEASL CSC	18
114	SCSDDCLQK	18
261	YQGLKAATY	18
275	EVAINGSFP	18
305	WLDLPKAER	18
368	ILLADHGMD	18
422	EIVRNLS CR	18
453	NVRIDKVHL	18
524	LLRIQPAPN	18
550	PSHAEVSK	18
745	VVSGPIFDY	18
759	FDAPDEITK	18
835	HIARVRDVE	18
157	DLPPVILFS	17
162	ILFSMDGFR	17
186	KLKTCGIHS	17
215	GLYPESHGI	17
296	EERISTLLK	17
439	YLTPDLPKR	17
458	KVHLFVDQQ	17
619	NVDHCLLYH	17
647	TVPQLGDT S	17
668	DVRVPPSES	17
713	NLVPMYEEF	17
854	KVQPVSEIL	17
7	LATEQPVKK	16
44	GLRKLEKQG	16
68	NCRCDVACK	16
94	RIVMCNKFR	16
122	KKDCCADYK	16
131	SVCQGETSW	16

表 XXV-V1-HLA-A3-9 マー- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
343	QVVDHAFGM	16
355	GLKQRNLHN	16
369	LLADHGMDQ	16
442	PDLPKRLHY	16
455	RIDKVHLFV	16
498	AHGSPFKEK	16
523	DLRIQPAP	16
526	RIQPAPNNG	16
560	SVCGFANPL	16
630	YVSGFGKAM	16
678	KCSFYLADK	16
698	SNRTSDSQY	16
768	HLANTDVPI	16

表 XXV-V2-HLA-A3-9 マー- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
9	RKDCCADYK	17
6	CLQRKDCCA	14
8	QRKDCCADY	13
1	SCSDDCLQR	12
2	CSDDCLQRK	11

表 XXV-V3-HLA-A3-9 マー- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
3	NVESCPEGK	22
9	GKPEALWV	11

表 XXV-V4-HLA-A3-9 マー- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
2	YLPTFETPI	11

表 XXVI-V1-HLA-A26-9 マー- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
510	EPFENIEVY	31
516	EVYNLMCDL	29
773	DVPIPTHYF	26
388	DYFPRINFF	25
719	EEFRKMWDY	25
422	EIVRNLS CR	24
710	ITSNLVPMY	24
745	VVSGPIFDY	24
802	DVLPFIIPH	24
843	ELLTGLDFY	24
275	EVAINGSFP	23
587	EQVNQMLNL	23
860	EILQLKTYL	23
167	DGFRAEYLY	22
188	KTCGIHSKY	22
297	ERISTLLKW	21
312	ERPRFYTMY	21
508	EVEPFENIE	21

表 XXVI-V1-HLA-A26-9 マー- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
602	ATVKVNLPF	21
10	EQPVKKNTL	20
344	VVDHAFGML	20
534	GTHGSLNHL	20
555	EVSKFSVCG	20
841	DVELLTGLD	20
859	SEILQLKTY	20
32	LVIMSLGLG	19
72	DVACKDRGD	19
105	ETRLEASC	19
136	ETSWLEENC	19
172	EYLYWDTL	19
230	DVNLNKNFS	19
300	STLLKWL DL	19
377	QTYCNKMEY	19
488	EFRSMEAIF	19
560	SVCGFANPL	19
599	EITATVKVN	19
653	DTSPLPPTV	19
668	DVRVPPSES	19
764	EITKHLANT	19
840	RDVELLTGL	19
854	KVQPVSEIL	19
856	QPVSEILQL	19
202	PTKTFPNHY	18
337	RVIKALQVV	18
364	CVNILLAD	18
440	LTPDLPKRL	18
453	NVRIDKVHL	18
454	VRIDKVHLF	18
646	YTVPLGDT	18
675	ESQKCSFYL	18
720	EFRKMWDYF	18
772	TDVPIPTHY	18
824	EALWVEERF	18
857	PVSEILQLK	18
24	ACIVLALL	17
77	DRGDCCWDF	17
178	DTLMPNINK	17
274	SEVAINGSF	17
298	RISTLLKWL	17
551	SHAEVSKF	17
554	EEVSKFSVC	17
629	EYVSGFGKA	17
660	TVPDCLRAD	17
685	DKNITHGFL	17
726	DYFHSVLLI	17
853	DKVQPVSEI	17
2	ESTLTLATE	16
21	YKIACIVLL	16
33	VIMSLGLGL	16
87	DTCVESTRI	16
145	DTAQSQSCP	16
154	EGFDLPPVI	16
179	TLMPNINKL	16
219	ESHGIIDNN	16

10

20

30

40

【表 29】

位置	123456789	スコア
225	DNNMYDVNL	16
294	PFEERISTL	16
333	PVSARVIKA	16
419	NSEEIVRNL	16
421	EEIVRNLSC	16
513	ENIEVYNLM	16
600	ITATVKVNL	16
603	TVKVNLPFG	16
618	KNVDHCLLY	16
744	NVWGPJFD	16
830	ERFTAHIAR	16
837	ARVRDVELL	16
13	VKNLTKKY	15
26	MLLALLVI	15
204	KTFPNHYTI	15
221	HGIIDNNMY	15
343	QVVDHAFGM	15
391	PRINFFYMY	15
458	KVHLFVDQQ	15
493	EAIFLAHGP	15
540	NHLLKVPFY	15
568	LPTESLDCF	15
595	LTQEITAT	15
598	EEITATVKV	15
619	NVDHCLLYH	15
626	YHREYVSGF	15
686	KNITHGLFY	15
763	DEITKHLAN	15
781	FVLTSCKN	15

位置	123456789	スコア
8	QRKDCCADY	11
4	DDCLQRKDC	8
5	DCLQRKDCC	8
2	CSDDCLQRK	5

位置	123456789	スコア
3	NVESCPCGK	12
5	ESCPGCKPE	12
7	CPGCKPEAL	10
1	PTNVESCPG	8
2	TNVESCPGK	7

位置	123456789	スコア
1	TYLPTFETP	3

位置	123456789	スコア

位置	123456789	スコア
776	IPTHYFVVL	25
761	APDEITKHL	24
608	LPFGRPRVL	23
818	CPEGKPEAL	23
856	QPVSEILQL	22
313	RPRFYTMFY	20
403	APRIRAHNI	20
657	LPPTVPDCL	20
793	TPENCPGWL	20
287	MPYNGSVPF	19
308	LPKAERPRF	19
390	FPRINFFYM	19
612	RPRVLQKNV	19
661	VPDCLRADV	19
181	MPNINKLKT	18
206	FPNHYTIVT	18
655	SPLPPTVPD	18
774	VPIPTHYFV	18
293	VPFEERIST	17
640	MPMWSSYTV	17
155	GFDLPPVIL	16
158	LPPVILFSM	16
545	VPFYEPSHA	16
565	ANPLPTESL	16
568	LPTESLDCF	16
808	IPHRPTNVE	16
35	MSLGLGLGL	15
37	LGLGLGLGL	15
152	CPEGFDLPP	15
836	IARVRDVEL	15
23	IACIVLLAL	14
33	VIMSLGLGL	14
100	KFRCGETRL	14
323	EPDSSGHAG	14
431	KPDQHFQPY	14
441	TPDLPKRLH	14
453	NVRIDKVHL	14
549	EPSHAEVVS	14
600	ITATVKVNL	14
643	WSSYTVPOL	14
649	PQLGDTSP	14
822	KPEALWVEE	14
21	YKIACIVLL	13
24	ACIVLLALL	13
58	CFDASFRGL	13
132	VCGGETSWL	13
201	YPTKTFPNH	13
253	QPMWLTAMY	13
271	WPGSEVAIN	13
282	FPSIYMPYN	13
298	RISTLLKWL	13
332	GPVSARVIK	13
348	AFGMLMEGL	13
401	GPAPRIRAH	13
411	IPHDFFSFN	13
489	FRSMEAIFL	13

位置	123456789	スコア
530	APNNGTHGS	13
560	SVCGFANPL	13
587	EQVNOMLNL	13
658	PPTVPDCLR	13
695	PPASNRSD	13
796	NCPGWL.DVL	13
797	CPGWL.DVLP	13
837	ARVRDVELL	13
1	MESTLTLAT	12
11	QPVKNTLTK	12
20	KYKIACIVL	12
31	LLVIMSLGL	12
112	LCSCSDDCL	12
150	SQCPGFDL	12
179	TLMPNINKL	12
198	RAMYPTKTF	12
208	NHYTIVTGL	12
225	DNNMYDVNL	12
249	VVHGGQPMWL	12
277	AINGSFPSI	12
300	STLLKWL.DL	12
311	AERPRFYTM	12
334	VSARVIKAL	12
344	VDHAFGML	12
398	MYEGPAPRI	12
400	EGPAPRIRA	12
408	AHNIPHDF	12
428	SCRKPDQHF	12
436	FKPYLTPDL	12
455	RIDKVHLFV	12
500	GPSFKEKTE	12
510	EPFENIEVY	12
528	QPAPNNGTH	12
531	PNNGTHGSL	12
534	GTHGSLNHL	12
572	SLDCFPHL	12
602	ATVKVNLPF	12
630	VVSGFGKAM	12
672	PPSESQKCS	12
675	ESQKCSFYL	12
701	TSDSQYDAL	12
706	YDALITSNL	12
724	MWDYFHSVL	12
725	WDYFHSVLL	12
840	RDVELLTGL	12
854	KVQPVSEIL	12
860	EILQLKTYL	12

位置	123456789	スコア
6	CLQRKDCCA	6
1	SCSDDCLQR	4
7	LQRKDCCAD	4
9	RKDCCADYK	2
2	CSDDCLQRK	1

10

20

30

40

【表 30】

表 XXVII-V2-B0702-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
3	SDDCLRKRD	1
4	DDCLRKDC	1
8	QRKDCCADY	1

表 XXVII-V3-HLA-B0702-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
7	CPGGKPEAL	24

表 XXVII-V4-HLA-B0702-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
2	YLPTFETPI	8

表 XXVIII-V1-HLA-B08-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
836	IARVRDVEL	32
18	LKKYKIACI	28
184	INKLKTGCI	28
818	CPEGKPEAL	27
355	GLKQRNLHN	26
403	APRIRAHNI	26
502	SFKEKTEVE	24
608	LPFGRPRVL	24
10	EQPVKKNTL	23
300	STLLKWLDL	23
231	VNLNKNFSL	22
308	LPKAERPRF	22
786	SCKNKSHTP	22
863	QLKTYLPTF	22
294	PFEERISTL	21
353	MEGLKQRNL	21
20	KYKIACIVL	20
616	LQKNVDHCL	20
98	CNKFRCGET	19
761	APDEITKHL	19
40	GLGLGLRKL	18
53	SCRKCFDA	18
74	ACKDRGDCC	18
166	MDGFRAEYL	18
238	SLSSEQNN	18
313	RPRFYTMYF	18
448	LHYAKNVRI	18
454	VRIDKVLHF	18
460	HLFVDQQWL	18
500	GPSFKEKTE	18
542	LLKVPFYEP	18
556	VSKFSVCGF	18
572	SLDCFCPHL	18
776	IPTHYFVVL	18
861	ILQLKTYLP	18
11	OPVKKNTLK	17
15	KNTLKKYKI	17
17	TLKKYKIAC	17

表 XXVIII-V1-HLA-B08-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
42	GLGLRKLKLEK	17
179	TLMPNINKL	17
263	GLKAATYFW	17
401	GPAPRIRAH	17
444	LPKRLHYAK	17
453	NVRIDKVHL	17
504	KEKTEVEPF	17
585	QLEQVNCML	17
682	YLADKNITH	17
731	VLLIKHATE	17
856	QPVSEILQL	17
23	IACIVLLAL	16
29	LALLVIMSL	16
31	LLVIMSLGL	16
55	RKRCFDFASF	16
100	KFRCGETRL	16
119	CLQKDKCCA	16
126	CADYKSVCCQ	16
186	KLKTCGIHS	16
256	WLTAMYQGL	16
302	LLKWLDPK	16
338	VIKALQVVD	16
467	WLAVRSKSN	16
469	AVRSKSNTN	16
601	TATVKVNL	16
610	FGRPRVLQK	16
657	LPPTVPDCL	16
684	ADKNITHGF	16
736	HATERNGVN	16
793	TPENCPGWL	16
860	EILQLKTYL	16
33	VIMSLGLGL	15
51	QGSCRKCF	15
191	GIHSKYMRA	15
240	SSSEQNPA	15
298	RISTLLKWL	15
388	DYFPRINFF	15
626	YHREYVSGF	15

表 XXVIII-V2-B08-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
6	CLQRKDKCCA	16
8	QRKDCCADY	10
5	DCLRKDKCC	8
7	LQRKDKCAD	7

表 XXVIII-V3-HLA-B08-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
7	CPGGKPEAL	27

表 XXVIII-V4-HLA-B08-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア

表 XXVIII-V4-HLA-B08-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
2	YLPTFETPI	12

表 XXIX-V1-HLA-B1510-9マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
192	IHSKYM RAM	24
578	PHLQNSTQL	22
208	NHYTIVTGL	21
535	THGSLNHLL	21
361	LHNCVNIIL	20
551	SHAEVSKF	19
626	YHREYVSGF	19
328	GHAGGPVSA	17
408	AHNIPHDF	17
220	SHGIIDNNM	16
600	ITATVKVNL	16
608	LPFGRPRVL	16
776	IPTHYFVVL	16
836	IARVRDVEL	16
155	GFDLPPVIL	15
179	TLMPNINKL	15
419	NSEIVRNIL	15
809	PHRPTNVES	15
10	EQPVKKNTL	14
21	YKIACIVL	14
40	GLGLGLRKL	14
294	PFEERISTL	14
440	LTPDLPKRL	14
448	LHYAKNVRI	14
757	GHFDAPDEI	14
818	CPEGKPEAL	14
23	IACIVLLAL	13
100	KFRCGETRL	13
250	WHGQPMWLT	13
334	VSARVIKAL	13
346	DHAFGMLME	13
362	HNCVNIIL	13
434	QHFKPYLTP	13
453	NVRIDKVHL	13
498	AHGSPFKEK	13
643	WSSYTVPQL	13
767	KHLANTDVP	13
778	THYFVLTSL	13
793	TPENCPGWL	13
796	NCPGWLVDL	13
834	AHARVRDV	13
860	EILQLKTYL	13
20	KYKIACIVL	12
58	CFDASFRL	12
150	SCPEGFDL	12
172	EYLYTWDTL	12
225	DNNMYDVNL	12
249	WWHGQPMWL	12
353	MEGLKQRNL	12
432	PDQHFKPYL	12
516	EYVNLMDCL	12

10

20

30

40

【表 3 1】

表 XXIX-V1-HLA-B1510-9 マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
534	GTHGSLNHL	12
540	NHLLKVPFY	12
585	QLEQVNQML	12
587	EQVNQMLNL	12
621	DHCLLYHRE	12
675	ESQKCSFYL	12
689	THGFLYPPA	12
701	TSDSQYDAL	12
706	YDALITSNL	12
724	MWDYFHSVL	12
725	WDYFHSVLL	12
728	FHSVLLIKH	12
735	KHATERNGV	12
791	SHTPENCPG	12
854	KVQPVSEIL	12
24	ACIVLLALL	11
29	LALLVIMSL	11
35	MSLGLGLGL	11
37	LGLGLGLGL	11
104	GETRLEASL	11
112	LCSCSDDCL	11
132	VCQGETSWL	11
295	FEERISTLL	11
298	RISTLLKWL	11
348	AFGMLMEGL	11
436	FKPYLTPDL	11
460	HLFVDQQWL	11
482	NHGYNNEFR	11
489	FRSMEAIFL	11
512	FENIEVYNL	11
531	PNGGTHGSL	11
560	SVCGFANPL	11
565	ANPLPTESL	11
572	SLDCFPHL	11
617	QKNVDHCLL	11
649	PQLGDTSP	11
657	LPPTVPDCL	11
761	APDEITKHL	11
837	ARVRDVELL	11
840	RDVELLTGL	11
856	QPVSEILQL	11

表 XXIX-V2-B1510-9 マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
2	CSDDCLQRK	3
1	SCSDDCLQR	2
3	SDDCLQRKD	2
5	DCLQRKDC	2
7	LQRKDCCAD	2
4	DDCLQRKDC	1
8	QRKDCCADY	1

表 XXIX-V3-HLA-B1510-9 マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
7	CPGGKPEAL	13

表 XXIX-V4-HLA-B1510-9 マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
1	TYLPTFETP	4
2	YLPTFETPI	1

表 XXX-V1-HLA-B2705-9 マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
93	TRIWMCNKF	25
454	VRIDKVHLF	24
830	ERFTHAIR	24
429	CRKPDQHF	23
489	FRSMEAIFL	23
837	ARVRDVELL	23
77	DRGDCCWDF	21
391	PRINFFYMY	21
638	MRMPMWSSY	21
312	ERPRFYTM	20
721	FRKMWDYFH	20
840	RDVELLTGL	20
29	LALLVIMSL	19
40	LGLGLRKL	19
525	LRIQPAPNN	19
614	RVLQKNVDH	19
39	LGLGLRKL	18
100	KFRCGETRL	18
388	DYFPRINFF	18
470	VRSKSNTNC	18
481	GNHGYNNEF	18
534	GTHGSLNHL	18
578	PHLQNSTQL	18
632	SGFGKAMRM	18
670	RVPPSESQK	18
692	FLYPPASNR	18
732	LLIKHATER	18
860	EILQLKTYL	18
11	QPVKNTLK	17
38	LGLGLGLR	17
42	LGLRKLK	17
48	LEKQGSCRK	17
55	RKKCFDASF	17
178	DTLMPNINK	17
179	TLMPNINKL	17
227	NMYDVNLNK	17
262	QGLKAATYF	17
374	GMDQTYCNK	17
446	KRLHYAKNV	17
447	RLHYAKNVR	17
602	ATVKVNLPF	17
611	GRPRVLQKN	17
628	REYVSGFGK	17
856	QPVSEILQL	17

表 XXX-V1-HLA-B2705-9 マー - 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
21	YKIACIVLL	16
24	ACIVLLALL	16
35	MSLGLGLGL	16
37	LGLGLGLGL	16
104	GETRLEASL	16
155	GFDLPPVIL	16
156	FDLPPVILF	16
187	LKTCGIHSK	16
188	KTCGIHSKY	16
198	RAMYPTKTF	16
208	NHYTIVTGL	16
287	MPYNGSVPF	16
294	PFEERISTL	16
297	ERISTLLKW	16
298	RISTLLKWL	16
336	ARVIKALQV	16
353	MEGLKQRNL	16
387	TDYFPRINF	16
397	YMYEGPAPR	16
510	EPFENIEVY	16
551	SHAEVSKF	16
600	ITATVKVNL	16
608	LPFGRPRVL	16
739	ERNGVNVVS	16
760	DAPDEITKH	16
6	TLATEQPVK	15
12	PVKKNTLKK	15
47	KLEKQGSCR	15
49	EKQGSCRKK	15
63	FRGLENCRC	15
94	RWMCNKFR	15
106	TRLEASLCS	15
162	ILFSDGFR	15
190	CGHSKYMR	15
229	YDVNLNKNF	15
231	VNLNKNFSL	15
300	STLLKWL	15
305	WLDLPAER	15
313	RPRFYTMF	15
329	HAGGPVSAR	15
332	GPVSARVIK	15
351	MLMEGLKQR	15
359	RNLHNCVNI	15
401	GPAPRIRAH	15
406	IRAHNIPHD	15
407	RAHNIPHDF	15
419	NSEEIVRNL	15
423	IVRNLSCRK	15
438	PYLTPDLPK	15
439	YLTPDLPKR	15
460	HLFVDQQWL	15
463	VDQQWLAVR	15
495	IFLAHGSPF	15
512	FENIEVYNL	15
613	PRVLQKNVD	15
649	PQLGDTSP	15

10

20

30

40

【表 3 2】

表 XXX-V1-HLA-B2705-9 マー・ 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
669	VRVPPSESQ	15
706	YDALITSNL	15
782	VVLTCKNKK	15
802	DVLPFIIPH	15
803	VLPFIIPHR	15
824	EALWVEERF	15
854	KVQPVSEIL	15
7	LATEQPVKK	14
10	EOPVKKNTL	14
14	KKNTLKYYK	14
15	KNTLKYYKI	14
20	KYKIACIVL	14
23	IACIVLLAL	14
56	KKCFDASFR	14
62	SFRGLENCR	14
69	CRCDVACKD	14
70	RCDVACKDR	14
99	NKFRCGETR	14
132	VCOGETSWL	14
169	FRAEYLYTW	14
197	MRAMYPTKT	14
204	KTFPNHYTI	14
215	GLYPESHGI	14
225	DNNMYDVNL	14
234	NKNFSLSSK	14
252	GQPMWLTAM	14
274	SEVAINGSF	14
295	FEERISTLL	14
308	LPKAERPRF	14
314	PRFYTMIFE	14
334	VSARVIKAL	14
362	HNCVNIILL	14
405	RIRAHNIPH	14
424	VRNLSCRKP	14
428	SCRKPDQHF	14
452	KNVRIDKVH	14
498	AHGSPFKEK	14
504	KEKTEVEPF	14
518	YNLMCDLLR	14
533	NGTHGSLNH	14
539	LNHLLKVPF	14
540	NHLLKVPFY	14
560	SVCGFANPL	14
565	ANPLPTESL	14
584	TQLEQVNQM	14
585	QLEQVNQML	14
587	EQVNQMLNL	14
597	QEEITATVK	14
610	FGRPRVLQK	14
631	VSGFGKAMR	14
678	KCSFYLADK	14
716	PMYEEFRKM	14
725	WDYFHSVLL	14
745	VVSGPIFDY	14
771	NTDVPPIPH	14
796	NCPGWLVDL	14

表 XXX-V1-HLA-B2705-9 マー・ 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
799	GWLDVLPFI	14
836	IARVRDVEL	14
839	VRDVELLTG	14
842	VELLTGLDF	14
26	IVLLALLVI	13
27	VLLALLVIM	13
31	LLVIMSLGL	13
45	LRKLEKQGS	13
86	EDTCVESTR	13
101	FRCGETRLE	13
115	CSDDCLQKK	13
122	KKDCCADYK	13
161	VILFSDMGF	13
172	EYLYTWDTL	13
173	YLYTWDTLM	13
201	YPTKTFPNH	13
220	SHGIIDNNM	13
249	VVHGQPMWL	13
261	YQGLKAATY	13
291	GSVPFEERI	13
302	LLKWLDPK	13
341	ALQVMDHAF	13
354	EGLKQRNLH	13
358	QRNLHNCVN	13
361	LHNCVNIIL	13
365	VNIILLADH	13
367	IILLADHGM	13
371	ADHGMDQTY	13
377	QTYCNKMEY	13
398	MYEGPAPRI	13
404	PRIRAHNIP	13
417	SFNSEIVR	13
422	SFVNLSCR	13
440	LTPDLPKRL	13
442	PDLPKRLHY	13
448	LHYAKNVRI	13
465	QQWLAVRSK	13
477	NCGGGNHGY	13
484	GVNNEFRSM	13
496	FLAHGSPFK	13
513	ENIEVYNLM	13
516	EVYNLMCDL	13
531	PNNGTHGSL	13
550	PSHAEVSK	13
568	LPTESLDCF	13
606	VNLPFGRPR	13
620	VDHCLLYHR	13
626	YHREYVSGF	13
643	WSSYTPQL	13
662	PDCLRADVR	13
675	ESQKCSFYL	13
713	NLVPMYEEF	13
715	VPMYEEFRK	13
719	EEFRKMWDY	13
727	YFHSVLLIK	13
728	FHSVLLIKH	13

表 XXX-V1-HLA-B2705-9 マー・ 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
743	VNVVSGPIF	13
751	FDYNYDGHF	13
757	GHFADAPDEI	13
759	FDAPDEITK	13
761	ARDEITKHL	13
772	TDVPIPTHY	13
776	IPTHYFVVL	13
780	YFVVLTSCK	13
798	PGWLDVLPF	13
818	CPEGKPEAL	13
823	PEALWVEER	13
832	FTAHARVR	13
843	ELLTGLDFY	13
853	DKVQPVSEI	13
857	PVSEILQLK	13
859	SEILQLKTY	13
863	QLKTYLPTF	13
33	VIMSLGLGL	12
54	CRKCFDAS	12
68	NCRCDVACK	12
87	DTCVESTRI	12
92	STRIVMCNK	12
112	LCSCSDDCL	12
114	SCSDDCLQK	12
148	QQSQCPGEF	12
150	SQCPEGFDL	12
154	EGFDLPPVI	12
165	SMDGFRAEY	12
167	DGFRAEYLY	12
180	LMPNINKLK	12
185	NKIKTCGHI	12
196	YMRAMYPTK	12
221	HGIIDNNMY	12
257	LTAMYQGLK	12
277	AINGSFPSI	12
280	GSFPSIYMP	12
290	NGSVPFEEER	12
296	EERISTLLK	12
307	DLPKAERPR	12
311	AERPRFYTM	12
331	GGPVSARVI	12
339	IKALQVVDH	12
348	AFGMLMEGL	12
382	KMEYMTDYF	12
408	AHINIPHDF	12
431	KPDQHFQPY	12
432	PDQHFQPYL	12
436	FKPYLTPDL	12
444	LPKRLHYAK	12
450	YAKNVRIDK	12
453	NVRIDKVHL	12
475	NTNCGGNH	12
535	THGSLNHLL	12
536	HGSLNHLLK	12
544	KVPFYEPSH	12
556	VSKFVSCGF	12

10

20

30

40

【表 3 3】

表 XXX-V1-HLA-B2705-9 マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
604	VKVNLPFGR	12
616	LQKNVDHCL	12
618	KNVDHCLLY	12
622	HCLLYHREY	12
627	HREYVSGFG	12
658	PPTVPDCLR	12
665	LRADVRVPP	12
673	PSESQKCSF	12
674	SESQKCSFY	12
680	SFYLADKNI	12
682	YLADKNITH	12
684	ADKNITHGF	12
686	KNITHGFLY	12
698	SNRTSDSQY	12
710	ITSNLVPMY	12
720	EFRKMWDYF	12
724	MWDYFHSV	12
726	DYFHSVLLI	12
747	SGPIFDYNY	12
810	HRPTNVESC	12
846	TGLDFYQDK	12

表 XXX-V2-HLA-B2705-9 マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
8	QRKDCCADY	19
9	RKDCCADYK	15
2	CSDCLQRK	13
1	SCSDCLQR	12

表 XXX-V3-HLA-B2705-9 マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
7	CPGGKPEAL	13
3	NVESCPCGK	10
6	SCPCGKPEA	7

表 XXX-V4-HLA-B2705-9 マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
2	YLPTFETPI	8
1	TYLPTFETP	4

表 XXXI-V1-HLA-B2709-9 マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
446	KRLHYAKNV	24
837	ARVRDVELL	24
336	ARVIKALQV	23
489	FRSMEAIFL	21
454	VRIDKVLHF	20
93	TRIVMCNKF	19
77	DRGDCCWDF	18
359	RNLHNCVNI	16
840	RDVELLTLG	15

表 XXXI-V1-HLA-B2709-9 マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
19	KKYKIACIV	14
104	GETRLEASL	14
155	GFDLPPVIL	14
204	KTFPNHYTI	14
208	NHYTIVTGL	14
215	GLYPESHGI	14
291	GSVPFEERI	14
298	RISTLLKWL	14
525	LRIQPAPNN	14
537	GSLNHLLKV	14
799	GWLDVLPFI	14
831	RFTAHIARV	14
856	QPVSEILQL	14
35	MSLGLGLGL	13
37	LGLGLGLGL	13
40	GLGLGLRKL	13
100	KFRCGETRL	13
106	TRLEASLCS	13
297	ERISTLLKW	13
300	STLLKWLDL	13
314	PRFYTMFE	13
337	RVIKALQV	13
407	RAHNIPHDF	13
419	NSEIVRNL	13
455	RIDKVLHFV	13
460	HLFVDCQWL	13
512	FENIEVYNL	13
534	GTHGSLNHL	13
578	PHLQNSTQL	13
587	EQVNQMLNL	13
600	ITATVKVNL	13
611	GRPRVLQKN	13
612	RPRVLQKNV	13
643	WSSYTPQL	13
649	PQLGDTSP	13
699	NRTSDSQYD	13
725	WDYFHSVLL	13
757	GHFADPEI	13
776	IPTHYFVVL	13
854	KVQPVSEIL	13
15	KNTLKKYKI	12
20	KYKIACIVL	12
21	YKIACIVLL	12
23	IACIVLLAL	12
24	ACIVLLALL	12
26	IVLLALLVI	12
29	LALLVIMSL	12
31	LLVIMSLGL	12
33	VIMSLGLGL	12
55	RKKCFDASF	12
156	FDLPPVILF	12
172	EYLYTWDIL	12
198	RAMYPTKTF	12
225	DNNMYDVNL	12
231	VNLNKNFSL	12
313	RPRFYTMFY	12

表 XXXI-V1-HLA-B2709-9 マー 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
331	GGPV SARVI	12
391	PRINFFYMY	12
406	IRAHNIPHD	12
429	CRKPDQHF	12
448	LHYAKNVRI	12
453	NVRIDKVLH	12
495	IFLAHGPSF	12
516	EVYNLMCDL	12
584	TQLEQVNM	12
608	LPFGRPRVL	12
632	SGFGKAMRM	12
663	DCLRADVRV	12
669	VRVPPSESQ	12
706	YDALITSNL	12
726	DYFHSVLLI	12
761	APDEITKHL	12
830	ERFTAHIAR	12
836	IARVRDVEL	12
860	EILQLKTYL	12
25	CIVLALLV	11
27	VLLALLVIM	11
63	FRGLENCRC	11
65	GLENCRCDV	11
69	CRCDVACKD	11
150	SQCPEGFDL	11
154	EGFDLPPVI	11
166	MDGFRAEYL	11
169	FRAEYLYTW	11
179	TLMPNINKL	11
252	GQPMWLTAM	11
256	WLTAMYQGL	11
262	QGLKAATYF	11
287	MPYNGSVPF	11
295	FEERISTLL	11
311	AERPRFYTM	11
330	AGGPVSARV	11
348	AFGMLMEGL	11
353	MEGLKQRNL	11
367	IILLADHGM	11
385	YMTDYFPRI	11
387	TDYFPRINF	11
388	DYFPRINFF	11
398	MYEGPAPRI	11
403	PRIRAHNI	11
404	PRIRAHNIP	11
432	PDQHFKPYL	11
436	FKPYLTPDL	11
440	LTPDLPKRL	11
470	VRKSNTNC	11
481	GNHGYNNEF	11
484	GYNNEFRSM	11
504	KEKTEVEPF	11
519	NLMCDLLRI	11
535	THGSLNHL	11
560	SVCGFANPL	11
565	ANPLPTESL	11

10

20

30

40

【表 3 4】

位置	123456789	スコア
572	SLDCFCPHL	11
602	ATVKVNLPF	11
613	PRVLQKNVD	11
617	QKNVDHCLL	11
638	MRMPMWSSY	11
665	LRADVRVPP	11
680	SFYLADKNI	11
701	TSDSQYDAL	11
709	LITSNLVPM	11
721	FRKMWDYFH	11
737	ATERGNVNV	11
739	ERNGVNVVS	11
742	GVMNVSGPI	11
774	VPIPTHYFV	11
798	PGWLDVLPF	11
810	HRPTNVESC	11
820	EGKPEALWV	11
824	EALWVEERF	11
834	AHIARVRDV	11
839	VRDVELLTG	11
842	VELLTGLDF	11
847	GLDFYQDKV	11

位置	123456789	スコア
8	QRKDCCADY	10
9	RKDCCADYK	5

位置	123456789	スコア
9	GGKPEALWV	14
7	CPGGKPEAL	10

位置	123456789	スコア
2	YLPTFETPI	8
1	TYLPTFETP	3

位置	123456789	スコア
859	SEILQLKTY	29
719	EEFRKMWDY	25
242	KEQNNPAWW	24
487	NEFRSMEAI	24
295	FEERISTLL	23
504	KEKTEVEPF	23
842	VELLTGLDF	23
274	SEVANGSF	22
353	MEGLKORNL	22
674	SESQKCSFY	22
104	GETRLEASL	21

位置	123456789	スコア
512	FENIEVYNL	21
819	PEGKPEALW	21
179	TLMPNINKL	20
388	DYFPRINFF	20
828	VEERFTAHl	20
311	AERPRFYTM	19
507	TEVEPFENI	19
510	EPFENIEVY	19
598	EEITATVKV	19
21	YKIACIVLL	18
24	ACIVLLALL	18
297	ERISTLLKW	18
334	VSARVIKAL	18
761	APDEITKHL	18
156	FDLPPVILF	17
421	EEIVRNLSL	17
454	VRIDKVLHF	17
608	LPFGRPRVL	17
684	ADKNITHGF	17
763	DEITKHILAN	17
1	MESTLTLAT	16
90	VESTRIWMC	16
204	KTFPNHYTI	16
341	ALQVVDHAF	16
362	HNCVNIILL	16
442	PDLPKRLHY	16
565	ANPLPTESL	16
686	KNITHGFLY	16
837	ARVRDVELL	16
9	TEQPVKKNT	15
10	EQPVKKNTL	15
13	VKKNTLKKY	15
29	LALLVIMSL	15
93	TRIWMCNKF	15
154	EGFDLPPVI	15
171	AEYLYTWDT	15
198	RAMYPTKTF	15
218	PESHGIDN	15
294	PFEERISTL	15
296	EEERISTLLK	15
298	RISTLLKWL	15
371	ADHGMDQTY	15
391	PRINFFYMY	15
399	YEGPAPRIR	15
431	KPDQHFQPY	15
440	LTPDLPKRL	15
745	VVSGPIFDY	15
772	TDVPIPTHY	15
796	NCPGWLDVL	15
843	ELLTGLDFY	15
856	QPVSEILQL	15
23	IACIVLLAL	14
40	GLGLGRKRL	14
51	QGSCRKQCF	14
141	EENCDAQQ	14
150	SQCPGFDL	14

位置	123456789	スコア
155	GFDLPPVIL	14
165	SMDGFRAEY	14
167	DGFRAEYLY	14
172	EYLYTWDTL	14
188	KTCGHSKY	14
208	NHYTIVTGL	14
221	HGIIDNNMY	14
241	SKEQNNPAW	14
300	STLLKWLDL	14
312	ERPRFYMY	14
322	EEDSSGHA	14
403	APRIRAHNI	14
407	RAHNIPHDF	14
419	NSEEIVRNL	14
420	SEEIVRNLS	14
540	NHLLKVPFY	14
554	EEVSKFSVC	14
560	SVCGFANPL	14
587	EQVNOMLNL	14
602	ATVKVNLPF	14
618	KNVDHCLLY	14
638	MRMPMWSSY	14
713	NLVPMYEEF	14
738	TERNGVNVV	14
818	CPEGKPEAL	14
829	EERFTAHIA	14
854	KVQPVSEIL	14

位置	123456789	スコア
8	QRKDCCADY	11
1	SCSDDCLQR	5

位置	123456789	スコア
7	CPGGKPEAL	14
4	VESCPGGKP	12
8	PGGKPEALW	11
5	ESCPGGKPE	7

位置	123456789	スコア
2	YLPTFETPI	10
1	TYLPTFETP	6

位置	123456789	スコア
707	DALITSNLV	26
608	LPFGRPRVL	25
776	IPTHYFVVL	24
29	LALLVIMSL	23

10

20

30

40

【表 3 5】

表 XXXIII-V1-HLA-B5101-9マ- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
331	GGPVSARVI	23
657	LPPTVPDCL	23
23	IACIVLLAL	22
154	EGFDLPPVI	22
640	MPMWSSYTV	22
403	APRIRAHNI	21
448	LHYAKNVRI	21
760	DAPDEITKH	20
761	APDEITKHL	20
774	VPIPTHYFV	20
26	MLLALLVI	19
612	RPRVLQKNV	19
661	VPDCLRADV	19
694	YPPASNRTS	19
726	DYFHSVLLI	19
818	CPEGKPEAL	19
836	IARVROVEL	19
7	LATEQPVKK	18
37	LGLGLGLGL	18
793	TPENCPGWL	18
856	QPVSEILQL	18
330	AGGPVSARV	17
340	KALQVVDHA	17
510	EPFENIEVY	17
867	YLPTFETTI	17
87	DTCVESTRI	16
206	FPNHYTIVT	16
216	LYPESHGII	16
287	MPYNGSVPF	16
385	YMTDYFPRI	16
437	KPYLTPDLP	16
568	LPTESLDCF	16
663	DCLRADVVR	16
683	LADKNITHG	16
736	HATERNGVN	16
799	GWLDVLPFI	16
808	IPHRPTNVE	16
820	EGKPEALWV	16
853	DKVQPVSEI	16
60	DASFRGLEN	15
201	YPTKTFPNH	15
208	NHYTIVTGL	15
270	FWPGSEVAI	15
293	VPFEERIST	15
450	YAKNVRIDK	15
497	LAHGSPFKE	15
552	HAEEVSKFS	15
601	TATVKVNL	15
653	DTSPLPPTV	15
680	SFYLADKNI	15
738	TERNGVNVV	15
769	LANTDVPI	15
804	LPIIHRP	15
824	EALWVEERF	15
5	LTLATEQPV	14
11	QPVKNTLK	14

表 XXXIII-V1-HLA-B5101-9マ- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
18	LKYYKIACI	14
19	KKYKIACIV	14
43	LGLRKLKQ	14
124	DCCADYKSV	14
158	LPPVILFSM	14
181	MPNINKLKT	14
215	GLYPESHGI	14
258	TAMYQGLKA	14
308	LPKAERPRF	14
347	HAFGMLMEG	14
360	NLHNCVNI	14
398	MYEGPAPRI	14
411	IPHDFFSFN	14
500	GPSFKEKTE	14
507	TEVEPFENI	14
519	NLMCDLLRI	14
537	GSLNHLLKV	14
545	VPFYEPSHA	14
566	NPLPTESLD	14
671	VPPSESQKC	14
672	PPSESQKCS	14
15	KNTLKYYKI	13
39	LGLGLGLRK	13
184	INKLKTGCI	13
198	RAMYPTKTF	13
204	KTFPNHYTI	13
217	YPESHGIID	13
265	KAATYFWPG	13
277	AINGSFPSI	13
329	HAGGPVSAR	13
337	RVKALQVV	13
359	RNLHNCVNI	13
440	LTPDLPKRL	13
446	KRLHYAKNV	13
468	LAVRSKSNT	13
487	NEFRSMEAI	13
528	QPAPNGTH	13
529	PAPNGTHG	13
549	EPShAEVVS	13
564	FANPLPTES	13
577	CPHLQNSTQ	13
596	TQEITATV	13
655	SPLPPTVPD	13
757	GHFADAPEI	13
775	PIPTHYFVV	13
796	NCPGWLDVL	13
807	IIPHRPTNV	13
833	TAHIARVRD	13
850	FYQDKVQPV	13
41	LGLGLRKL	12
73	VACKDRGDC	12
126	CADYKSVCC	12
146	TAQQSQCE	12
152	CPEGFDLPP	12
176	TWDTLMPNI	12
225	DNNMYDVNL	12

表 XXXIII-V1-HLA-B5101-9マ- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
271	WPGSEVAIN	12
272	PGSEVAING	12
282	FPSIYMPYN	12
285	IYMPYNGSV	12
361	LHNCVNIIL	12
370	LADHGMDQT	12
390	FPRINFFYM	12
401	GPAPRIRAH	12
402	PAPRIRAHN	12
419	NSEIVRNL	12
431	KPDQHFQPY	12
441	TPDLPKRLH	12
444	LPKRLHYAK	12
455	RIDKVHLFV	12
509	VEPFENIEV	12
548	YEPShAEV	12
592	MLNLQEEI	12
598	EETATVKV	12
600	ITATVKVNL	12
636	KAMRMPMWS	12
648	VPQLGDTSP	12
651	LGDTSPPLP	12
666	RADVRVPPS	12
715	VPMYEEFRK	12
723	KMWDYFHSV	12
742	GVNVVSGPI	12
768	HLANTDVPI	12
778	THYFVVLTS	12
811	RPTNVESCP	12
822	KPEALWEE	12
828	VEERFTAHI	12
834	AHIARVRDV	12

表 XXXIII-V2-HLA-B5101-9マ- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
5	DCLQRKDCC	6
4	DDCLQRKDC	5
2	CSDCLQRK	3
3	SDDCLQRKD	3
7	LQRKDCCAD	3
1	SCSDCLQR	2

表 XXXIII-V3-HLA-B5101-9マ- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
7	CPGGKPEAL	19
9	GGKPEALWV	16

表 XXXIII-V4-HLA-B5101-9マ- 161P2F10B		
位置	123456789	スコア
2	YLPTFETPI	15
1	TYLPTFETP	7

【表 3 6】

表 XXXIV-V1-HLA-A1-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
441	TPDLPKRLHY	32
771	NTDVPIPTHY	31
858	VSEILQLKTY	30
673	PSESQKCSFY	29
718	YEEFRKMWDY	27
370	LADHGMQDQY	25
746	VSGPIFDYNY	24
280	GSFPSIYMPY	23
617	QKNVDHCLLY	23
164	FSMDGFRAEY	21
311	AERPRFYTMY	21
386	MTDYFPRINF	21
388	DYFPRINFFY	20
390	FPRINFFYMY	20
697	ASNRTSDSQY	20
220	SHGIIDNNMY	19
295	FEERISTLLK	19
420	SEEIVRNLSL	19
506	KTEVEPFENI	19
508	EVEPFENIEV	19
737	ATERNGVNVV	19
430	RKPDQHFQPY	18
685	DKNITHGFLY	18
800	WLDVLPFIIP	18
8	ATEQPVKKNY	17
12	PVKKNLTKKY	17
155	GFDLPPVILF	17
166	MDGFRAEYLY	17
187	LKTCGIHSKY	17
192	IHSKYMRAMY	17
201	YPTKTFPNHY	17
208	NHYTIVTGLY	17
277	AINGSFPSIY	17
419	NSEEIVRNLS	17
476	TNCGGGNHGY	17
509	VEPFENIEVY	17
709	LITSNLVPMY	17
841	DVELLTGLDF	17
115	CSDDCLQKQD	16
217	YPESHGIIDN	16
252	GQPMWLTAMY	16
260	MYQGLKAATY	16
539	LNHLLKVPFY	16
569	PTESLDCFCP	16
637	AMRMPMWSSY	16
701	TSDSQYDALI	16
762	PDEITKHLAN	16
842	VELLTGLDFY	16
120	LQKDCCADY	15
257	LTAMYQGLKA	15
273	GSEVAINGSF	15
308	LPKAERPRFY	15
321	FEEDSSGHA	15
376	DQTYCNKMEY	15
380	CNKMEYMTDY	15
547	FYEPShAEV	15

表 XXXIV-V1-HLA-A1-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
553	AEEVSKFSVC	15
572	SLDCFCPHLQ	15
621	DHCLLYHREY	15
744	NVSGPIFDY	15

表 XXXIV-V2-HLA-A1-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
3	CSDDCLQRKD	16
8	LQRKCCADY	15
4	SDDCLQRKDC	13
10	RKCCADYKS	12
1	CSCSDDCLQR	10

表 XXXIV-V3-HLA-A1-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
4	NVESCPCGGK	13
6	ESCPGGKPEA	8
2	PTNVESCPGG	6
9	PGGKPEALWV	6

表 XXXIV-V4-HLA-A1-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
1	KTYLPTFETP	9
2	TYLPTFETPI	4

表 XXXV-V1-HLA-A0201-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
28	LLALLVIMSL	30
22	KIACIVLLAL	27
30	ALLVIMSLGL	26
36	SLGLGLGLGL	24
708	ALITSNLVPM	24
835	HIARVRDVEL	24
17	TUKKYKIACI	23
222	GIIDNNMYDV	23
284	SIYMPYNGSV	23
806	FIIPHRPTNV	23
23	IACIVLLALL	22
34	IMSLGLGLGL	22
39	LGLGLGLRKL	22
111	SLCSCSDDCL	22
165	SMDGFRAEYL	22
178	DTLMPNINKL	22
215	GLYPESHGII	22
302	LLKWLDPKA	22
397	YMYEGPAPRI	22
439	YLTDPKRL	22
595	LTQEEITATV	22
615	VLQKNVDHCL	22
25	CIVLALLVI	21
157	DLPPVILFSM	21

表 XXXV-V1-HLA-A0201-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
352	LMGLKQRNL	21
450	YAKNVRIDKV	21
639	RMPMWSSYTV	21
723	KMWDYFHSVL	21
32	LVIMSLGLGL	20
293	VPFEERISTL	20
360	NLHNCVNIL	20
564	FANPLPTESL	20
591	QMLNLTQEEI	20
737	ATERNGVNVV	20
836	IARVRDVELL	20
4	TLTLATEQPV	19
369	LLADHGMQDT	19
447	RLHYAKNVRI	19
607	NLPFGRPRVL	19
656	PLPPTVPDCL	19
682	YLADKNITHG	19
692	FLYPPASNRT	19
825	ALWVEERFTA	19
26	IVLALLVIM	18
183	NINKLKTGCI	18
204	KTFPNHYTIV	18
259	AMYQGLKAAT	18
267	ATYFWPGSEV	18
276	VAINGSFPSI	18
329	HAGGPVSARV	18
347	HAFGMLMEGL	18
534	GTHGSLNHLL	18
594	NLTQEEITAT	18
833	TAHIARVRDV	18
27	VLLALLVIMS	17
42	GLGLRKLKQ	17
162	ILFSMDGFRA	17
175	YTWDTLMPNI	17
180	LMPNINKLKT	17
186	KLKTCGIHKS	17
227	NMYDVNLNKN	17
335	SARVIKALQV	17
361	LHNCVNILL	17
418	FNSEEIVRNL	17
518	YNLMCDLLRI	17
536	HGSLNHLLKV	17
552	HAEVSKFSV	17
580	LQNSTQLEQV	17
624	LLYHREYVSG	17
660	TVPDCLRADV	17
736	HATERNGVNV	17
768	HLANTDVPIPI	17
775	PIPTHYFVVL	17
861	ILQLKTYLPT	17
6	TLATEQPVKK	16
20	KYKIACIVLL	16
31	LLVIMSLGLG	16
131	SVCQGETSWL	16
152	CPEGFDLPPV	16
196	YMRAMYPTKT	16

【表 3 7】

表 XXXV-V1-HLA-A0201-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
230	DVNLNKNFSL	16
269	YFWPGSEVAI	16
336	ARVIKALQV	16
366	NILLADHGM	16
374	GMDQTYCNKM	16
467	WLAVRSKSNT	16
526	RIQPAPNGT	16
599	EITATVKVNL	16
606	VNLPFGRPRV	16
700	RTSDSQYDAL	16
792	HTPENCPGWL	16
839	VRDVELLTGL	16
855	VQPVSEILQL	16
9	TEQPVKKNL	15
24	ACIVLLALLV	15
171	AEYLYTWDTL	15
224	IDNNMYDVNL	15
257	LTAMYQGLKA	15
333	PVSARVIKAL	15
343	QVVDHAFGML	15
355	GLKQRNLHNC	15
359	RNLHNCVNI	15
454	VRIDKVLHFV	15
460	HLFVDQQLWA	15
461	LFVDQQLAV	15
491	SMEAIFLAHG	15
496	FLAHGSPSKE	15
519	NLMCDLLRIQ	15
530	APNINGTHGSL	15
538	SLNHLLKVPF	15
541	HLLKVPFYEP	15
583	STQLEQVNM	15
592	MLNLQEEIT	15
642	MWSSYTVPQL	15
706	YDALITSNLV	15
731	VLLIKHATER	15
765	ITKHLANTDV	15
774	VPIPTHYFV	15
817	SCPEGKPEAL	15
827	VVEERFTAHI	15
846	TGLDFYQDKV	15
33	VIMSLGLGLG	14
57	KCFDASFRGL	14
64	RGLENCRCDV	14
65	GLENCRCDA	14
173	YLYTWDTLMP	14
191	GIHSKYMRAM	14
232	NLNKNFSLSS	14
338	VIKALQVVDH	14
341	ALQVVDHAFG	14
350	GMLMEGLKQR	14
368	ILLADHGMDCQ	14
494	AIFLAHGSPF	14
508	EVEPFENIEV	14
533	NGTHGSLNHL	14
547	FYEPSHAEEV	14

表 XXXV-V1-HLA-A0201-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
584	TQLEQVNOML	14
709	LITSNLVPMY	14
722	RKMWDYFHSV	14
732	LLIKHATERN	14
734	IKHATERNGV	14
773	DVPIPTHYFV	14
830	ERFTAHIARV	14
844	LLTGLDFYQD	14
849	DFYQDKVQPV	14
859	SEILQLKTYL	14
866	TYLPTFETTI	14

表 XXXV-V2-HLA-A0201-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
7	CLQRKDCCAD	11
2	SCSDCLQRK	7
6	DCLQRKDCCA	5

表 XXXV-V3-HLA-A0201-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
7	SCPGGKPEAL	15
9	PGGKPEALWV	8

表 XXXV-V4-HLA-A0201-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
2	TYLPTFETPI	12
1	KTYLPTFETP	8

表 XXXVI-V1-HLA-A0203-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
258	TAMYQGLKAA	19
259	AMYQGLKAAT	17
15	KNLTKKYKIA	10
21	YKIACIVLLA	10
52	GSCRKCFDA	10
65	GLENCRCDA	10
101	FRCGETRLEA	10
118	DCLQKDCCA	10
138	SWLENCDDTA	10
162	LFSDMGFRA	10
190	CGHSKYMRA	10
239	LSSKEQNPFA	10
250	WHGQPMWLT	10
257	LTAMYQGLKA	10
268	TYFWPGSEVA	10
302	LLKWLDPKA	10
321	FEEDSSGHA	10
327	SGHAGGPVSA	10
332	GPVSARVIKA	10
339	IKALQVVDHA	10
362	HNCVNIILA	10

表 XXXVI-V1-HLA-A0203-10 マー-161P2F10B		
位置	1234567890	スコア
394	NFFYMYEGPA	10
399	YEGPAPRIRA	10
442	PDLPKRLHYA	10
460	HLFVDQQLWA	10
485	YNNEFRSMEA	10
489	FRSMEAIFLA	10
521	MCDLLRIQPA	10
544	KVPFYEPSHA	10
556	VSKFSVCGFA	10
593	LNLQEEITA	10
628	REYVSGFGKA	10
658	PPTVPDCLRA	10
675	ESQKCSFYLA	10
688	ITHGFLYPPA	10
699	NRTSDSQYDA	10
728	FHSVLLIKHA	10
752	DYNYDGHFDA	10
761	APDEITKHLA	10
816	ESCPEKPEA	10
825	ALWVEERFTA	10
828	VEERFTAIIA	10
16	NTLKKYKIAC	9
22	KIACIVLLAL	9
53	SCRKCFDAS	9
66	LENCRCDVAC	9
102	RCGETRLEAS	9
119	CLOKDCCAD	9
139	WLENCDDTAQ	9
163	LFSDMGFRAE	9
191	GIHSKYMRAM	9
240	SSKEQNPFAW	9
251	HGQPMWLTAM	9
269	YFWPGSEVAI	9
303	LKWLDPKAE	9
322	EEDSSGHAG	9
328	GHAGGPVSAR	9
333	PVSARVIKAL	9
340	KALQVVDHAF	9
363	NCVNILLAD	9
395	FFYMYEGPAP	9
400	EGPAPRIRAH	9
443	DLPKRLHYAK	9
461	LFVDQQLAV	9
486	NNEFRSMEAI	9
490	RSMEAIFLAH	9
522	CDLLRIQPAP	9
545	VPFYEPSHAE	9
557	SKFSVCGFAN	9
594	NLTQEEITAT	9
629	EYVSGFGKAM	9
659	PTVPDCLRAD	9
676	SQKCSFYLAD	9
689	THGFLYPPAS	9
700	RTSDSQYDAL	9
729	HSVLLIKHAT	9
753	YNYDGHFDAP	9

10

20

30

40

【表 3 8】

表 XXXVI-V1-HLA-A0203-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
762	PDEITKHLAN	9
817	SCPEGKPEAL	9
826	LWVEERFAH	9
829	EERFAHAR	9

表 XXXVI-V2-HLA-A0203-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
6	DCLQRKDCCA	10
7	CLQRKDCCAD	9
8	LQRKDCCADY	8

表 XXXVI-V3-HLA-A0203-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
6	ESCPGGKPEA	10
7	SCPGGKPEAL	9
8	CPGGKPEALW	8

表 XXXVI-V4-HLA-A0203-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XXXVII-V1-HLA-A3-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
38	GLGLGLGLRK	27
6	TLATEQPVKK	26
186	KLKTCGIHSP	26
301	TLLKWLDPK	25
337	RVIKALQVVD	25
838	RVRDVELLTG	25
47	KLEKQGSCRK	23
179	TLMPNINKLK	23
256	WLTAMYQGLK	23
277	AINGSFPSY	23
212	VTGLYPESH	21
422	EIVRNLSRCK	21
437	KPYLTPDLPK	21
443	DLPKRLHYAK	21
462	FVDQQWLAVR	21
494	AIFLAHGSPF	21
605	KVNLPFGRPR	21
730	SVLLIKHATE	21
731	VLLIKHATER	21
781	FVLTSCKNK	21
841	DVELLTGLDF	21
195	KYMRAMYPTK	20
368	ILLADHGMDQ	20
495	IFLAHGSPFK	20
624	LLYHREYVSG	20
630	YVSGFGKAMR	20
664	CLRADVVRPP	20
708	ALITSNLVPM	20

表 XXXVII-V1-HLA-A3-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
714	LVPMYEEFRK	20
26	IVLLALLVIM	19
32	LVIMSLGLGL	19
107	RLEASLCSCS	19
338	VIKALQVVDH	19
523	DLLRIQPAPN	19
538	SLNHLLKVPF	19
588	QVNQMLNLTQ	19
596	TQEEITATVK	19
609	PFGRPRVLQK	19
669	VRVPPSESQK	19
802	DVLPFIIPHR	19
5	LTLATEQPVK	18
30	ALLVIMSLGL	18
36	SLGLGLGLGL	18
160	PVILFSDMGF	18
173	YLYTWDTLMP	18
215	GLYPESHGII	18
260	MYQGLKAATY	18
364	CVNILLADH	18
426	NLSRCKPDQH	18
447	RLHYAKNVR	18
453	NVRIDKVHLF	18
697	ASNRTSDSQY	18
825	ALWVEERFTA	18
12	PVKKNTLKKY	17
41	LGLGLRKLEK	17
46	RKLEKQGSCR	17
121	QKQDCCADYK	17
233	LNKNFSLSSK	17
311	AERPRFYTMY	17
405	RIRAHNIPHD	17
458	KVHLFVDQQW	17
469	AVRSKSNNTC	17
524	LLRIQPAPNN	17
544	KVPFYEPSHA	17
637	AMRMPMWSSY	17
650	QLGDTSPLEP	17
670	RVPPESESQK	17
692	FLYPPASNRT	17
713	NLVPMYEEFR	17
742	GVNVVSGPIF	17
831	RFTAHARVR	17
22	KIACVLLAL	16
25	CIVLALLVI	16
67	ENCRCDVACK	16
113	CSCSDDCLQK	16
284	SIYMPYNGSV	16
295	FEERISTLLK	16
341	ALQVVDHAFG	16
423	IVRNLSRCKP	16
455	RIDKVHLFVD	16
549	EPHAEVSK	16
603	TVKVNLPFGR	16
614	RVLQKNVDHC	16
623	CLLYHREYVS	16

表 XXXVII-V1-HLA-A3-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
744	NVVS GPIFDY	16
758	HFDAPDEITK	16
775	PIPTHYFVVL	16
783	VLTSCKNKSH	16
806	FIIPHRPTNV	16
835	HIARVRDVEL	16
854	KVQPVSEILQ	16
861	ILQLKTYLPT	16
11	QPVKNTLKK	15
27	VLLALLVIMS	15
28	LLALLVIMSL	15
55	RKKCFDASFR	15
65	GLENCRODVA	15
131	SVCQGETSWL	15
157	DLPPVILFSM	15
161	VILFSDMGFR	15
162	ILFSDMGFRA	15
223	IIDNNMYDVN	15
232	NLNKNFSLSS	15
285	IYMPYNGSVP	15
307	DLPKAERPRF	15
331	GGPV SARVIK	15
343	QVVDHAFGML	15
367	IILLADHGMD	15
369	LLADHGMDQT	15
516	EVYNLMCDLL	15
526	RIQPAPNNGT	15
607	NLPFGRPRVL	15
660	TVPDCLRADV	15
668	DVRVPPSESQ	15
677	QKCSFYLADK	15
709	LITSNLVPMY	15
764	EITKHLANTD	15
844	LLTGLDFYQD	15
863	QLKTYLPTFE	15
17	TLKKYKIACI	14
263	GLKAATYFWP	14
292	SVPFEERIST	14
305	WLDLPKAERP	14
344	VVDHAFGMLM	14
348	AFGMLMEGLK	14
428	SCRKPDQHFK	14
439	YLTPDLPKRL	14
467	WLAVRSKSNT	14
555	EVSKFVSGGF	14
567	PLPTESLDCF	14
579	HLQNSTQLEQ	14
599	EITATVKVNL	14
619	NVDHCLLYHR	14
656	PLPPTVPDCL	14
807	IIPHRPTNVE	14
827	WVEERFAHI	14
847	GLDFYQDKVQ	14
857	PVSEILQLKT	14
44	GLRKLKQGS	13
72	DVACKDRGDC	13

10

20

30

40

【表 3 9】

表 XXXVII-V1-HLA-A3-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
91	ESTRIWMCNK	13
139	WLEENCDAQ	13
192	IHSKYMRAMY	13
226	NNMYDVNLNK	13
230	DVNLNKNFSL	13
267	ATYFWPGSEV	13
304	KWLDLPKAER	13
330	AGGPVSARVI	13
333	PVSARVIKAL	13
335	SARVIKALQV	13
446	KRLHYAKNVR	13
490	RSMEAIFLAH	13
508	EVEPFENIEV	13
527	IQPAPNNGTH	13
535	THGSLNHLLK	13
560	SVCGFANPLP	13
585	QLEQVNOMLN	13
627	HREYVSGFGK	13
647	TVPLQGDTSF	13
682	YLADKNITHG	13
726	DYFHSVLLIK	13
732	LLIKHATERN	13
749	PIFDYNYDGH	13
779	HYFVLTSCK	13
834	AHIARVRDVE	13

表 XXXVII-V2-HLA-A3-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
9	QRKDCCADYK	17
7	CLQRKDCCAD	14
2	SCSDDCLQRK	12
8	LQRKDCCADY	12
1	CSCSDDCLQR	10

表 XXXVII-V3-HLA-A3-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
4	NVESCPCGGKP	14
3	TNVESCPCGGK	13
10	GGKPEALWVE	8
9	PGGKPEALWV	7

表 XXXVII-V4-HLA-A3-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
1	KTYLPTFETP	12
2	TYLPTFETPI	6

Table XXXVIII-V1-HLA-A26-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
555	EVSKFSVCGF	32
178	DTLMPNINKL	29
744	NVSGPIFDY	29

表 XXXVIII-V1-HLA-A26-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
516	EVYNLMCDLL	28
841	DVELLTGLDF	28
230	DVNLNKNFSL	27
297	ERISLLKWL	27
12	PVKKNTLKKY	25
343	QVVDHAFGML	25
32	LVIMSLGLGL	24
154	EGFDLPPVIL	23
333	PVSARVIKAL	23
388	DYFPRINFFY	23
599	EITATVKVNL	23
795	ENCPGWLDVL	23
802	DVLPFIIPHR	23
160	PVILFSMDGF	22
453	NVRIDKVIHLF	22
508	EVEPFENIEV	22
719	EEFRKMWDYF	22
709	LITSNLVPY	21
131	SVCQGETSWL	20
275	EVAINGSFPS	20
293	VPFEERISTL	20
488	EFRSMEAIFL	20
853	DKVQPVSEIL	20
72	DVACKDRGDC	19
105	ETRLEASLCS	19
376	DQTYCNKMEY	19
421	EEIVRNLSR	19
571	ESLDCFCPHL	19
668	DVRVPPSESQ	19
685	DKNITHGFLY	19
742	GVNVVSGPIF	19
792	HTPENCPGWL	19
22	KIACIMLLAL	18
92	STRIWMCNKF	18
136	ETSWLEEND	18
312	ERPRFYTMYP	18
422	EIVRNLSRCK	18
494	AIFLAHGSPF	18
513	ENIEVYNLMC	18
587	EQVNOMLNLT	18
598	EEITATVKVN	18
621	DHCLLYHREY	18
659	PTVPDCLRAD	18
700	RTSDSQYDAL	18
771	NTDVPPIPTHY	18
773	DVPIPTHYFV	18
830	ERFTHAIARV	18
386	MTDYFPRINF	17
457	DKVHLFVDQK	17
629	EYVSGFGKAM	17
653	DTSPPLPPTVP	17
726	DYFHSVLLIK	17
760	DAPDEITKHL	17
838	RVRDVELLIG	17
87	DTCVESTRIW	16
89	CVESTRIWMC	16

表 XXXVIII-V1-HLA-A26-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
145	DTAQSQOCPE	16
210	YTIVTGLYPE	16
296	EERISTLLKW	16
307	DLPKAERPRF	16
510	EPFENIEVYN	16
534	GTHGSLNHLL	16
574	DCFCPHLQNS	16
602	ATVKVNLPPG	16
763	DEITKHLANT	16
764	EITKHLANTD	16
277	AINGSFPSY	15
280	GSFPSIYMPY	15
400	EGPAPRIRAH	15
493	EAIFLAHGPS	15
554	EEVSKFSVCG	15
646	YTVPLQGDTS	15
739	ERNGVNVVSG	15
820	EGKPEALWVE	15
858	VSEILQLKTY	15

Table XXXVIII-V2-HLA-A26-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
8	LQRKDCCADY	10
5	DDCLQRKDCC	8
6	DCLQRKDCCA	8
2	SCSDDCLQRK	6

表 XXXVIII-V3-HLA-A26-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
4	NVESCPCGGKP	14
6	ESPCGGKPEA	11
7	SCPCGGKPEAL	10
2	PTNVESCPCGG	8
3	TNVESCPCGGK	8

表 XXXVIII-V4-HLA-A26-10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
1	KTYLPTFETP	9

表 XXXIX-V1-HLA-B0702- 10マ- 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
431	KPDQHFQPYL	23
530	APNNGTHGSL	22
648	VPQLGDTSPL	22
577	CPHLQNSTQL	21
797	CPGWLDVLPF	21
152	CPEGFDLPPV	20
293	VPFEERISTL	20
776	IPHYFVVLTL	20
500	GPSFKEKTEV	19
761	APDEITKHLA	19

10

20

30

40

【表 4 0】

表 XXXIX-V1-HLA-B0702-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
246	NPAWWHGQPM	18
658	PPTVPDCLRA	18
672	PPSESQKCSF	18
715	VPMYEEFRKM	18
774	VPIPTHYFVW	18
332	GPVSARVIKA	17
804	LPFIIHRPT	17
22	KIACMLLAL	15
34	IMSLGLGLGL	15
549	EPShAEVSK	15
608	LPFGRPRVLO	15
11	QPVKNTLKK	14
30	ALLVIMSLGL	14
313	RPRFYTMFE	14
333	PVSARVIKAL	14
401	GPAPRIRAHN	14
403	APRIRAHNIP	14
437	KPYLTPDLPK	14
441	TPDLPKRLHY	14
488	EFRSMEAIFL	14
599	EITATVKVNL	14
612	RPRVLQKNVD	14
642	MWSSYTVPQL	14
700	RTSDSQYDAL	14
775	PIPTHYFVWL	14
836	IARVRDVELL	14
19	KKYKIACIVL	13
20	KYKIACIVLL	13
36	SLGLGLGLGL	13
154	EGFDLPPVIL	13
165	SMDGFRAEYL	13
224	IDNNMYDVNL	13
287	MPYNGSVPEF	13
299	ISTLLKWLDL	13
323	EPDSSGHAGG	13
390	FPRINFFYMY	13
418	FNSEIVRNL	13
435	HFKPYLTPDL	13
452	KNVRIDKVHL	13
510	EPFENIEVYN	13
528	QPAPNNGTHG	13
566	NPLPTESLDC	13
640	MPMWSSYTVP	13
655	SPLPPTVPDC	13
684	ADKNITHGFL	13
694	YPPASNRTSD	13
705	QYDALITSNL	13
724	MWDYFHSVLL	13
795	ENCPGWLDVL	13
808	IPHRPTNIVES	13
818	CPEGKPEALW	13
822	KPEALWWEER	13
835	HIARVRDVEL	13
23	IACIVLLALL	12
32	LVIMSLGLGL	12
39	LGLGLGLRKL	12

表 XXXIX-V1-HLA-B0702-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
57	KCFDASFRGL	12
171	AEVLYTWDTL	12
206	FPNHYTIVTG	12
207	PNHYTIVTGL	12
248	AWWHGQPMWL	12
282	FPSIYMPYNG	12
308	LPKAERPRFY	12
347	HAFGMLMEGL	12
352	LMEGLKQRNL	12
534	GTHGSLNHLL	12
564	FANPLPTESL	12
571	ESLDCFCPHL	12
586	LEQVNMQLNL	12
661	VPDCLRADVR	12
674	SESQKCSFYL	12
695	PPASNRTSDS	12
723	KMWDFYHSVL	12
811	RPTNIVESCP	12
839	VRDVELLGL	12
855	VQPVSEILQL	12
9	TEQPVKXNTL	11
28	LLALLVIMSL	11
76	KDRGDCCWDF	11
99	NKFRCGETRL	11
101	FRCGETRLEA	11
103	CGETRLEASL	11
131	SVCQGETSWL	11
158	LPPVILFSMD	11
201	YPTKTFPNHY	11
253	QPMWL TAMYQ	11
271	WPGSEVAING	11
294	PFEERISTLL	11
297	ERISTLLKWL	11
325	DSSGHAGGPV	11
330	AGGPVSARVI	11
343	QVVDHAFGML	11
411	IPHDFFSFNS	11
439	YLTDPKRL	11
444	LPKRLHYAKN	11
511	PFENIEVYNL	11
515	IEVYNLMCDL	11
516	EVYNLMCDLL	11
545	VFPYEPSHAE	11
555	EVSKFSVCGF	11
559	FSVCGFANPL	11
568	LPTESLDCFC	11
607	NLPFGRPRVL	11
615	VLQKNVDHCL	11
656	PLPPTVPDCL	11
688	ITHGFLYPPA	11
708	ALITSNLVPM	11
760	DAPDEITKHL	11
767	KHLANTDVPI	11
817	SCPEGKPEAL	11
859	SEILQLKTYL	11

表 XXXIX-V2-HLA-B0702-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
6	DCLQRKDCCA	6
8	LQRKDCCADY	4
1	CSCSDDCLQR	2
2	SCSDDCLQRK	2
4	SDDCLQRKDC	2
10	RKDCCADYKS	2
3	CSDDCLQRKD	1
7	CLQRKDCCAD	1

表 XXXIX-V3-HLA-B0702-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
8	CPGGKPEALW	14
7	SCPGGKPEAL	13
1	RPTNIVESCPG	12
9	PGGKPEALWV	10
6	ESCPGGKPEA	9

表 XXXIX-V4-HLA-B0702-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
2	TYLPTFETPI	9

表 XL-V1-HLA-B08-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XL-V2-HLA-B08-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XL-V3-HLA-B08-10マ- -161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XL-V4-HLA-B08-10マ- -161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XLI-V1-HLA-B1510-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XLI-V2-HLA-B1510-10マ- -161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

10

20

30

40

【表 4 1】

表 XLII-V3-HLA-B1510-10マー 161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XLII-V4-HLA-B1510-10マー 161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XLII-V1-HLA-B2705-10マー 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XLII-V2-HLA-B2705-10マー 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XLII-V3-HLA-B2705-10マー 161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XLII-V4-HLA-B2705-10マー 161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XLIII-V1-HLA-B2709-10マー 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XLIII-V2-HLA-B2709-10マー 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XLIII-V3-HLA-B2709-10マー 161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XLIII-V4-HLA-B2709-10マー 161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XLIV-V1-HLA-B4402-10マー 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
311	AERPRFYTMY	26
9	TEQPVKKNTL	25
171	AEYLYTWDTL	25
296	EERISTLLKW	25

表 XLIV-V1-HLA-B4402-10マー 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
509	VEPFENIEVY	25
719	EEFRKMWDYF	25
859	SEILQLKTYL	25
487	NEFRSMEAIF	24
842	VELLTGLDFY	23
674	SESQKCSFYL	22
586	LEQVNLNL	21
823	PEALWVEERF	21
153	PEGFDLPPVI	20
515	IEVYNLMCDL	20
598	EEITATVKVN	20
718	YEEFRKMWDY	20
297	ERISTLLKWL	18
333	PVSARVIKAL	18
154	EGFDLPPVIL	17
322	EEDSSGHAG	17
330	AGGPVSARVI	17
409	HNIPHDFFSF	17
795	ENCPGWLVDL	17
20	KYKIACIVL	16
57	KCFDASFRGL	16
178	DTLMPNINKL	16
293	VPFEERISTL	16
421	EEIVRNLSR	16
439	YLTDPKRL	16
494	AIFLAHGSPF	16
855	VQPVSEILQL	16
22	KIACIVLLAL	15
30	ALLVIMSLGL	15
39	LGLGLRKL	15
155	GFDLPPVILF	15
277	AINGSFPSY	15
280	GSFPSYMPY	15
312	ERPRFYTMYF	15
340	KALQVDHAF	15
361	LHNCVNIILL	15
388	DYFPRINFFY	15
399	YEGPAPRIRA	15
430	RKPDQHFQPY	15
553	AEVSKFSVC	15
607	NLPFGRPRVL	15
656	PLPPTVPDCL	15
697	ASNRTSDSQY	15
760	DAPDEITKHL	15
763	DEITKHLANT	15
772	TDVPIPTHYF	15
775	PIPTHYFVVL	15
817	SCPEGKPEAL	15
829	EERFTAHIAR	15
1	MESTLTLATE	14
12	PVKNTLKY	14
28	LLALLVIMSL	14
32	LVIMSLGLGL	14
74	ACKDRGDCCW	14
99	NKFRCGETRL	14
141	EENCDTAQQS	14

表 XLIV-V1-HLA-B4402-10マー 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
147	AQQSQCEPGF	14
160	PVILFSMDGF	14
165	SMDGFRAEYL	14
197	MRAMYPTKTF	14
208	NHYTIVTGLY	14
218	PESHGIIDNN	14
248	AWWHGQPMWL	14
269	YFWPGSEVAI	14
295	FEERISTLLK	14
353	MEGLKORNH	14
387	TDYFPRINFF	14
435	HFKPYLTPDL	14
441	TPDLPKRLHY	14
453	NVRIDKVHLF	14
488	EFRSMEAIFL	14
516	EVYNLMCDLL	14
530	APNNGTHGSL	14
555	EVSKFVCGF	14
564	FANPLPTESL	14
571	ESLDCFCPHL	14
684	ADKNITHGFL	14
700	RTSDSQYDAL	14
744	NVSGPIFDY	14
791	SHTPENCPGW	14
858	VSEILQLKTY	14
19	KKYKIACIVL	13
34	IMSLGLGLGL	13
36	SLGLGLGLGL	13
50	KQGSCRKCF	13
66	LENCRCDVAC	13
85	FEDTCVESTR	13
92	STRIWMCNKF	13
104	GETRLEASLC	13
140	LEENCDTAQQ	13
164	FSDMGFRAEY	13
228	MYDVNLNKNF	13
240	SSKEQNNPAW	13
242	KEQNNPAWWH	13
260	MYQGLKAATY	13
276	VAINGSFPSI	13
321	FEEPSSGH	13
347	HAFGMLMEGL	13
360	NLHNCVNIIL	13
381	NKMEYMTDYF	13
384	EYMTDYFPRI	13
386	MTDYFPRINF	13
418	FNSEEVRNL	13
452	KNVRIDKVHL	13
458	KVHLFVDCQW	13
533	NGTHGSLNHL	13
534	GTHGSLNHL	13
554	EEVSKFSVCG	13
567	PLPTESLDCF	13
570	TESLDCFCPH	13
597	QEEITATVKV	13
599	EITATVKVNL	13

10

20

30

40

【表 4 2】

表 XLIV-V1-HLA-B4402-10マ 161P2F10B		
Pos	1234567890	score
637	AMRMPMWSSY	13
642	MWSSYTPQL	13
683	LADKNITHGF	13
716	PMYEEFRKMW	13
723	KMWDYFHSVL	13
724	MWDYFHSVLL	13
738	TERNGVNVVS	13
746	VSGPFDYNY	13
771	NTDVPPIPTHY	13
815	VESCPGKPE	13
828	VEERFTAHIA	13
862	LQKTYLPTF	13
866	TYLPTFETTI	13
23	IACIVLALL	12
25	CIVLALLVI	12
48	LEKQGSCRKK	12
76	KDRGDCCWDF	12
87	DTCVESTRIW	12
90	VESTRIWMCN	12
131	SVCQGETSWL	12
168	GFRAEYLYTW	12
192	IHSKYMRAMY	12
201	YPTKTFPNHY	12
220	SHGIDNNMY	12
224	IDNNMYDVNL	12
241	SKEQNNPAWW	12
252	GQPMWLTAMY	12
255	MWLTAMYQGL	12
261	YQGLKAATYF	12
262	QGLKAATYFW	12
286	YMPYNGSVPF	12
299	ISTLLKWLDL	12
307	DLPKAERPRF	12
308	LPKAERPRFY	12
343	QVVDHAFGML	12
352	LMEGLKQRNL	12
370	LADHGMDQTY	12
402	PAPRIRAHNI	12
406	IRAHNIPHDF	12
420	SEEIVRNLSL	12
431	KPDQHFVKPYL	12
476	TNCGGGNHGY	12
492	MEAFIHLAHP	12
504	KEKTEVEPFE	12
511	PFENIEVYNL	12
512	FENIEVYNLM	12
538	SLNHLLKVPF	12
539	LNHLLKVPFY	12
548	YEPHAEVVS	12
550	PSHAEVVSF	12
559	FSVCGFANPL	12
577	CPHLQNSTQL	12
616	LQKNVDHCLL	12
617	QKNVDHCLLY	12
621	DHCLLYHREY	12
625	LYHREYVSGF	12

表 XLIV-V1-HLA-B4402-10マ 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
628	REYVSGFGKA	12
648	VPQLGDTSP	12
679	CSFYLADKNI	12
705	QYDALITSNL	12
712	SNLVPMYEEF	12
792	HTPENCPGWL	12
797	CPGWLDVLPF	12
818	CPEGKPEALW	12
819	PEGKPEALWW	12
835	HIARVRDVEL	12
836	IARVRDVELL	12
839	VRDVELLTGL	12
841	DVELLTGLDF	12

表 XLIV-V2-HLA-B4402-10マ 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
8	LQQRKCCADY	10
4	SDDCLQRKDC	5
2	SCSDDCLQRK	4
3	CSDDCLQRKD	4

表 XLIV-V3-HLA-B4402-10マ 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
7	SCPGGKPEAL	16
5	VESCPGGKPE	13
8	CPGGKPEALW	12

表 XLIV-V4-HLA-B4402-10マ 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
2	TYLPTFETPI	12

表 XLV-V1-HLA-B5101-10マ 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XLV-V2-HLA-B5101-10マ 161P2F10B		
Pos	1234567890	スコア
結果未検出		

表 XLV-V3-HLA-B5101-10マ 161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

表 XLV-V4-HLA-B5101-10マ 161P2F10B		
Pos	123456789	スコア
結果未検出		

【表 4 3】

表 XLVI-VI-DRB1-0101-15マ 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
207	PNHYTIVTGLYPESH	36
181	MPNINKLKTGCIHHSK	35
486	NNEFRSMEAIFLAHG	35
839	VRDVELLTGLDFYQD	33
703	DSQYDALITSNLVPM	32
42	GLGLRKLEKQGSCRK	31
740	RNGVNVVSGPIFDYN	31
28	LLALLVIMSLGLGLG	30
160	PVILFSMDGFRAEYL	30
797	CPGWLDVLPFIIPHR	30
858	VSEILQLKTYLPTFE	30
801	LDVLPFIIPHRPTNV	29
393	INFFYMYEGPAPRIR	28
421	EEIVRNLSCRKPDQH	28
627	HREYVSGFGKAMRMP	28
30	ALLVIMSLGLGLGLG	27
32	LVIMSLGLGLGLGLR	27
34	IMSLGLGLGLGLRKL	27
364	CYNIILLADHGMDQT	27
522	COLLRIOQPAPNNGTH	27
23	IACIVLLALLVIMSL	26
258	TAMYQGLKAATYFWP	26
273	GSEVAINGSFPSIYM	26
283	PSIYMPYNGSVPFEE	26
300	STLLKWLDPKAERP	26
545	VPFYEPSHAEVSKF	26
645	SYTVPQLGDTSPPLP	26
778	THYFVLTSCKNKSH	26
26	IVLLALLVIMSLGLG	25
230	DVNLNKNFSLSSKEQ	25
266	AATYFWPGSEVAING	25
292	SVPFEERISTLLKWL	25
303	LKWLDPKAERPRFY	25
350	GMLMEGLKQRNLHNC	25
433	DQHFKPYLTPDLPKR	25
459	VHLFVDQQWLAVRSK	25
492	MEAIFLAHGSPFKEK	25
509	VEPFENIEVYNLMCD	25
536	HGSLNHLLKVPFYEP	25
561	VCGFANPLPTESLDC	25
22	KIACIVLLALLVIMS	24
25	CIVLLALLVIMSLGL	24
163	LFSMDGFRAEYLYTW	24
174	LYTWDTLMPNINKLK	24
194	SKYMRAMYPTKTFPN	24
246	NPAWWHGQPMWLTAM	24
313	RPRFYTMYFEEDSS	24
316	FYTMFEEDSSGHA	24
333	PVSARVIKALQVVDH	24
342	LQVDHAFGMLMEGL	24
387	TDYFPRINFFYMYEG	24
392	RINFFYMYEGPAPRI	24
395	FFYMYEGPAPRIRAH	24
412	PHDFFSFNSEIIVRN	24
437	KPYLTPDLPKRLHYA	24
514	NIEVYNLMCDLLRIQ	24

表 XLVI-VI-DRB1-0101-15マ 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
518	YNLMCDLLRIQPAPN	24
539	LNHLLKVPFYEPSHA	24
542	LLKVPFYEPSHAEV	24
589	VNQMLNLTQEEITAT	24
605	KVNLPGFRPRVLQKN	24
722	RKMWDYFHSVLLIKH	24
798	PGWLDVLPFIIPHRP	24
45	LRKLEKQGSCRKCKF	23
84	DFEDTCVESTRIWMC	23
129	YKSVCOGETSWLEEN	23
191	GIHSKYMRAMYPTKT	23
210	YTVTGLYPESHGII	23
272	PGSEVAINGSFPSIY	23
284	SIYMPYNGSVPFEE	23
328	GHAGGPVSARVIKAL	23
464	DQQWLAVRSKSNNTNC	23
562	CGFANPLPTESLDCF	23
637	AMRMPMWSSYTPVQL	23
644	SSYTPVQLGDTSPPL	23
651	LGDTSPPLPPTVPDCL	23
687	NITHGFLYPPASNRT	23
804	LPIIPHRPTNVESC	23
1	MESTLTLATEQPVKK	22
18	LKKYKIACIVLLALL	22
20	KYKIACIVLLALLVI	22
145	DTAQSQSQCEGFDLP	22
152	CPEGFDLPPVILFSM	22
155	GFDLPPVILFSMDGF	22
171	AEYLYTWDTLMPNIN	22
380	CNKMEYMTDYFPRIN	22
400	EGPAPRIRAHNIPHD	22
434	QHFKPYLTPDLPKRL	22
575	CFCPHLQNSTQLEQV	22
648	VPQLGDTSPPLPPTVP	22
654	TSPPLPPTVPDCLRAD	22
777	PTHYFVLTSCKNKS	22
825	ALWVEERFTAHIARV	22
833	TAHIARVRDVELLTG	22
60	DASFRGLENCRCDDVA	21
142	ENCDTAQSQSQCEGF	21
186	KLKTCGIHSKYMRAM	21
451	AKNVRIDKVLHFVDQ	21
490	RSMEAIFLAHGSPFK	21
665	LRADVVRPPSESQKC	21
704	SQYDALITSNLVPMY	21
739	ERNGVNVVSGPIFDY	21
770	ANTDVPIPTHYFVWL	21
98	CNKFRCGETRLEASL	20
253	QPMWLTAMYQGLKAA	20
443	DLPKRLHYAKNVRID	20
521	MCDLLRIQPAPNNGT	20
553	AEEVSKFSVCGFANP	20
623	CLLYHREYVSGFGKA	20
631	VSGFGKAMRMPMWSS	20
718	YEEFRKMWDYFHSVL	20
729	HSVLLIKHATERNGV	20
750	IFDYNNDGHFDAPDE	20

10

20

30

40

【表 4 4】

表 XLVI-V1-DRB1-0101-15マ - 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
829	EERFTAHIARVRDVE	20
15	KNTLKKYKIACIVLL	19
37	LGLGLGLGRKLEKQ	19
153	PEGFDLPPVILFMSD	19
158	LPPVILFMSDGFRAE	19
170	RAEYLYTWDTLMPNI	19
226	NNMYDVNLNKNFSL	19
305	WLDLPKAERPRFYTM	19
340	KALQVVDHAFGMLME	19
346	DHAFGMLMEGLKORN	19
363	NCVNIILLADHGMDQ	19
413	HDFSFNSEEIVRNL	19
500	GPSFKEKTEVEPFEN	19
556	VSKFSVCGFANPLPT	19
603	TVKVNLPFGRPRVQ	19
691	GFLYPASNRTSDSQ	19
762	PDEITKHLANTDVPI	19
771	NTDVPIPTHYFVVL	19
817	SCPEGKPEALWVEER	19
2	ESTLTLATEQPVKKN	18
12	PVKKNTLKKYKIACI	18
29	LALLVIMSLGLGLGL	18
102	RCGETRLEASLCS	18
136	ETSWLENCDTAQQS	18
157	DLPPVILFMSDGFRA	18
183	NINKLKTGHIHSKYM	18
214	TGLYPESHGIIDNNM	18
228	MYDVNLNKNFSLSSK	18
255	MWLTAMYQGLKAATY	18
259	AMYQGLKAATYFWPG	18
267	ATYFWPGSEVAINGS	18
297	ERISTLLKWLDPKA	18
302	LLKWLDPKAERPRF	18
318	TMYFEEDSSGHAGG	18
322	EEDSSGHAGGPVSA	18
362	HNCVNIILLADHGMD	18
382	KMEYMTDYFPRINFF	18
515	IEVYNLMCDLLRIQP	18
595	LTQEEITATVKVNLP	18
613	PRVLQKNVDHCLLYH	18
640	MPMWSSYVPLQGD	18
662	PDCLRADVRVPPSES	18
681	FYLADKNITHGFLYP	18
689	THGFLYPASNRTSD	18
748	GPIFDYNYDGHFDAP	18
763	DEITKHLANTDVPIP	18
847	GLDFYQDKVQPVSEI	18
848	LDYFQDKVQPVSEIL	18
16	NTLKKYKIACIVLLA	17
21	YKIACIVLLALLVIM	17
24	ACIVLLALLVIMSLG	17
31	LLVIMSLGLGLGLGL	17
36	SLGLGLGLGRKLEK	17
80	DCCWDFEDTCVESTR	17
103	CGETRLEASLCS	17
126	CADYKSVCCQGETSWL	17
139	WLENCDTAQQS	17

表 XLVI-V1-DRB1-0101-15マ - 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
147	AQQSQCEGFDLPPV	17
189	TCGIHSKYMRAMYPT	17
209	HYTIVTGLYPESHGI	17
212	IVTGLYPESHGIIDN	17
227	NMYDVNLNKNFSLSS	17
236	NFSLSSKEQNNPAWW	17
261	YQGLKAATYFWPGSE	17
265	KAATYFWPGSEVAIN	17
282	FPSIYMPYNGSVPF	17
286	YMPYNGSVPFEEERIS	17
324	PDSSGHAGGPVSARV	17
331	GGPVSARVIKALQV	17
336	ARVIKALQVVDHAFG	17
341	ALQVVDHAFGMLME	17
347	HAFGMLMEGLKORN	17
372	DHGMDQTYCNKMEYM	17
394	NFFYMYEGPAPRIRA	17
396	FYMYEGPAPRIRAHN	17
491	SMEAIFLAHGSPFKE	17
493	EAIFLAHGSPFKEKT	17
506	KTEVEPFENIEVYNL	17
519	NLMCDLLRIQPAPNN	17
527	IQPAPNNGTHGSLNH	17
540	NHLLKVPFYEPHAE	17
557	SKFSVCGFANPLPTE	17
597	QEEITATVKVNLPFG	17
601	TATVKVNLPFGRPRV	17
602	ATVKVNLPFGRPRVL	17
629	EYVSGFGKAMRMPMW	17
677	QKCSFYLADKNITHG	17
685	DKNITHGFLYPASN	17
725	WDYFHSVLLIKHATE	17
726	DYFHSVLLIKHATER	17
734	IKHATERNGNVVSG	17
780	YFVLTSCKNKSHTP	17
812	PTNVESCPGKPEAL	17
823	PEALWVEERFTAHA	17
836	IARVRDVELLTGLDF	17
842	VELLTGLDFYQDKVQ	17

表 XLVI-V2-DRB1-0101-15マ - 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
2	EASLCS	16
7	SCSDDCLQRKCCAD	9
12	CLQRKCCADYKSV	9
13	LQRKCCADYKSV	9
14	QRKCCADYKSV	9
9	SDDCLQRKCCADY	8
10	DDCLQRKCCADY	8
8	CSDDCLQRKCCADY	7

表 XLVI-V3-HLA-DRB1-0101-15マ - 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
7	PTNVESCPGGKPEAL	25
12	SCPGGKPEALWVEER	19

10

20

30

40

【表 4 5】

表 XLVI-V3-HLA-DRB1-0101-15マ 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
4	PHRPTNVESCPCGGKP	14
10	VESCPCGGKPEALWVE	14

表 XLVI-V4-HLA-DRB1-0101-15マ 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
2	ILQLKTYLPTFETPI	16
1	EILQLKTYLPTFETP	10

表 XLVII-V1-HLA-DRB1-0301-15マ 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
437	KPYLTPDLPKRLHYA	31
451	AKNVRIDKVLHFVDQ	31
662	PDCLRADVRVPPSES	28
458	KVHLFVDQQWLAVRS	27
597	QEITATVKVNLPPFG	27
228	MYDVNLNKNFSLSSK	26
350	GMLMEGLKQRNLHNC	26
536	HGSLNHLLKVPFYEP	26
305	WLDLPAERPRFYTM	25
358	QRNLHNCVNIILLAD	24
30	ALLVIMSLGLGLG	22
366	NILLADHGMDQTYC	22
28	LLALLVIMSLGLGLG	21
32	LVIMSLGLGLGLR	21
34	IMSLGLGLGLRKL	21
158	LPPVILFSDGFRAE	21
161	VILFSDGFRAEYLY	21
517	VYNLMCDLLRIQPAP	21
707	DALITSNLVPMEEF	21
742	GVNVVSGPIFDYNYD	21
10	EQPVKKNTLKKYKIA	20
20	KYKIACIVLLALLVI	20
109	EASLCSDDCLQKK	20
118	DCLQKKDCCADYKSV	20
236	NFSLSSKEQNNPAWW	20
284	SIYMPYNGSVPFEER	20
408	AHNIPHDFFSFNSEE	20
467	WLAVRSKSNNTNCGGG	20
615	VLQKNVDHCLLYHRE	20
635	GKAMRMPMWSSYTVP	20
780	YFVLTSCCKNSHTP	20
839	VRDVELLTGLDFYQD	20
847	GLDFYQDKVQPVSEI	20
855	VQPVSEILQLKTYLP	20
2	ESTLTLATEQPVKKN	19
26	IVLLALLVIMSLGLG	19
38	GLGLGLGLRLEKQG	19
42	GLGLRLEKQGGSCRK	19
74	ACKDRGDCCWDFEDT	19
129	YKSVCQGETSWLEEN	19
153	PEGFDLPPVILFSD	19
257	LTAMYQGLKAATYFW	19
331	GGPV SARVIKALQVV	19
335	SARVIKALQVVDHAF	19
341	ALQVVDHAFGMLMEG	19

表 XLVII-V1-HLA-DRB1-0301-15マ 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
349	FGMLMEGLKQRNLHN	19
433	DQHFKPYPDLPKR	19
486	NNEFRSMEAIFLAHG	19
492	MEAIFLAHGSPFKEK	19
514	NIEVYNLMCDLLRIQ	19
524	LLRIQPAPNNGTHGS	19
553	AAEVSKFSVCGFANP	19
565	ANPLPTESLDCFCPH	19
654	TSPLPPTVPDCLRAD	19
679	CSFYLADKNITHGFL	19
697	ASNRTSDSQYDALIT	19
740	RNGVNVVSGPIFDYN	19
773	DVPIPTHYFVLTSC	19
781	FVLTSCCKNSHTPE	19
812	PTNVESCPEGKPEAL	19
833	TAHIARVRDVELLTG	19
835	HIARVRDVELLTGLD	19
852	QDKVQPVSEILQLKT	19
163	LFSMDGFRAEYLYTW	18
177	WDTLMPNINKLKTGG	18
178	DTLMPNINKLKTGGI	18
224	IDNNMYDVNLNKNFS	18
254	PMWLTAMYQGLKAAT	18
267	ATYFWPGSEVAINGS	18
275	EVAINGSFPSIYMPY	18
292	SVPFEERISTLLKWL	18
296	EERISTLLKWLDPK	18
445	PKRLHYAKNVRIDKV	18
465	QQWLAVRSKSNNTNCG	18
506	KTEVEPFENIEVYNL	18
509	VEPFENIEVYNLMCD	18
582	NSTQLEQVQNQLNLT	18
586	LEQVQNQLNLTQEEI	18
589	VNQLNLTQEEITAT	18
605	KVNLPPGPRVLQKN	18
613	PRVLQKNVDHCLLYH	18
621	DHCLLYHREYVSGFG	18
628	REYVSGFGKAMRMPM	18
658	PPTVPDCLRADVRVP	18
711	TSNLVPMYEEFRKMWD	18
712	SNLVPMYEEFRKMWD	18
721	FRKMWDYFHSVLLIK	18
731	VLLIKHATERNGVNV	18
7	LATEOPVKKNTLKKY	17
92	STRIMCNKFRGET	17
219	ESHGIIDNNMYDVNL	17
282	FPSIYMPYNGSVPFE	17
290	NGSVPFEERISTLLK	17
439	YLTPDLPKRLHYAKN	17
457	DKVHLFVDQQWLAVR	17
500	GPSFKEKTEVEPFEN	17
518	YNLMCDLLRIQPAPN	17
558	KFSVCGFANPLPTES	17
573	LDCFCPHLQNSTQLE	17
577	CPHLQNSTQLEQVNQ	17
583	STQLEQVQNQLNLTQ	17
590	NQMLNLTQEEITATV	17

10

20

30

40

【表 4 6】

表 XLVII-V1-HLA-DRB1-0301-15マ -
161P2F10B

Pos	123456789012345	スコア
714	LVPMYEEFRKMWDYF	17
746	VSGPIFDYNYDGHFD	17
823	PEALWVEERFATAHIA	17
857	PVSEILQLKTYLPTF	17
60	DASFRGLENCRCOVA	16
70	RCDVACKDRGDCCWD	16
78	RGDCCWDFEDTCVES	16
94	RIMMCNKFRCGETRL	16
101	FRCGETRLEASLCS	16
122	KKDCCADYKSVCOGE	16
226	NNMYDVNLNKNFSL	16
234	NKNFSLSSKEQNNPA	16
346	DHAFGMLMEGLKQRN	16
384	EYMTDYFPRINFFY	16
450	YAKNVRIDKVFHFD	16
532	NNGTHGSLNHLLKVP	16
599	EITATVKVNLFFGRP	16
678	KCSFYLDKNITHGF	16
748	GPIFDYNYDGHFDAP	16
24	ACIVLLALLVIMSLG	15
48	LEKQGSRCRKKCFDAS	15
56	KKCFDASFRGLENCR	15
97	MCNKFRCGETREAS	15
162	ILFSMDGFRAEYLYT	15
164	FSMDGFRAEYLYTWD	15
190	CGHSKYMRAMYPTK	15
218	PESHGIDNNMYDVN	15
374	GMDQTYCNKMEYMTD	15
386	MTDYFPRINFFYMYE	15
413	HDDFFSNSEEVRLN	15
474	SNTNCGGGNHGYNNE	15
478	CGGGNHGYNNEFRSM	15
485	YNNEFRSMEAIFLAH	15
670	RVPPSESQKCSFYLA	15
728	FHSVLLIKHATERNG	15
803	VLPFIHRPTNVES	15
821	GKPEALWVEERFATAH	15

表 XLVII-V2-DRB1-0301-15マ -
161P2F10B

Pos	123456789012345	スコア
2	EASLCSDDCLQRK	20
11	DCLQRKCCADYKSV	20
15	RKDCCADYKSVCOGE	16
4	SLCSCSDDCLQRKDC	12
5	LCSDDCLQRKDC	11
10	DDCLQRKCCADYKS	11

表 XLVII-V3-HLA-DRB1-0301-15マ -
161P2F10B

Pos	123456789012345	スコア
7	PTNVESCPGGKPEAL	13
10	VESCPGGKPEALWVE	10
11	ESCPGGKPEALWVEE	9
9	NVESCPGGKPEALWV	8
1	FIHRPTNVESCPG	7
3	IPHRPTNVESCPGGK	6

表 XLVII-V4-HLA-DRB1-0301-15マ -
161P2F10B

Pos	123456789012345	スコア
2	ILQLKTYLPTFETPI	12
1	EILQLKTYLPTFETP	10

表 XLVIII-V1-HLA-DRB1-0401-15マ -
161P2F10B

Pos	123456789012345	スコア
126	CADYKSVCCGETSWL	28
412	PHDFFSNSEEVRLN	28
464	DQQWLAVRSKSNNTNC	28
631	VSGFGKAMRMPMWSS	28
691	GFLYPPASNRTSDSQ	28
703	DSQYDALITSNLVP	28
722	RKMWDYFHSVLLIKH	28
750	IFDYNYDGHFDAPDE	28
777	PTHYFVLTSCNKKS	28
778	THYFVLTSCNKSH	28
28	LLALLVIMSLGLGLG	26
181	MPNINKLKTGHSK	26
213	VTGLYPESHGIDNN	26
290	NGSVPFEEIRSTLLK	26
350	GMLMEGLKQRNLHNC	26
445	PKRLHYAKNVRIDKV	26
458	KVHLFVDQQLAVRS	26
506	KTEVEPFENIEVYNL	26
524	LLRIQPAPNNGTHGS	26
583	STQLEQVNLNLTQ	26
589	VNQMLNLQEEITAT	26
823	PEALWVEERFATAHIA	26
855	VQPVSEILQLKTYLP	26
18	LKKYKIACIVLLALL	22
60	DASFRGLENCRCOVA	22
80	DCCWDFEDTCVESTR	22
136	ETSWLEENCDAQQS	22
172	EYLYTWDLMPNINK	22
174	LYTWDLMPNINKLK	22
193	HSKYMRAMYPTKTFP	22
203	TKTFPNHYTIVTGLY	22
253	QPMWLTAMYQGLKAA	22
266	AATYFWPGSEVAING	22
279	NGSFPSPYMPYNGSV	22
346	DHAFGMLMEGLKQRN	22
382	KMEYMTDYFPRINFF	22
387	TDYFPRINFFYMYEG	22
415	FFSNSEEVRLNSC	22
433	DQHFKPYLTPDLPKR	22
447	RLHYAKNVRIDKVHL	22
482	NHGYNNEFRSMEAIF	22
509	VEPFENIEVYNLMCD	22
573	LDCFCPLQNSTQLE	22
678	KCSFYLDKNITHGF	22
679	CSFYLDKNITHGFL	22
797	CPGWLDVLPFIHR	22
803	VLPFIHRPTNVES	22
847	GLDFYQDKVQPVSEI	22
2	ESTLTLATEQPVKKN	20
4	TLTLATEQPVKKNL	20

10

20

30

40

【表 4 7】

表 XLVIII-V1-HLA-DRB1-0401-15マ - - 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
20	KYKIACIVLALLVI	20
23	IACIVLALLVIMSL	20
24	ACIVLALLVIMSLG	20
25	CIVLALLVIMSLGL	20
26	IVLALLVIMSLGLG	20
42	GLGLRKLEKQGSCRK	20
45	LRKLEKQGSCRKQCF	20
129	YKSVCQGETSWLEEN	20
155	GFDLPPVILFSDMGF	20
163	LFSMDGFRAEYLYTW	20
177	WDTLMPNINKLKTG	20
178	DTLMPNINKLKTG	20
197	MRAMYPTKTFPNHYT	20
225	DNNMYDVNLNKNFSL	20
228	MYDVNLNKNFSLSSK	20
230	DVNLNKNFSLSSKEQ	20
254	PMWLTAMYQGLKAAT	20
273	GSEVAINGSFPSIYM	20
282	FPSIYMPYNGSVPFE	20
300	STLLKWLDPKAERP	20
305	WLDLPAERPRFYTM	20
316	FYTMYPFEEDSSGHA	20
335	SARVIKALQVVDHAF	20
339	IKALQVVDHAFGLM	20
342	LQVVDHAFGLMMEGL	20
358	QRNLHNCVNIILLAD	20
364	CVNIILLADHGMDQT	20
365	VNIILLADHGMDQTY	20
366	NIILLADHGMDQTYC	20
408	AHNIPHDFFSFNSEE	20
420	SEEIVRNLSKRKPDQ	20
437	KPYLTPDLPKRLHYA	20
514	NIEVYNLMCDLLRIQ	20
517	VYNLMCDLLRIQPAP	20
518	YNLMCDLLRIQPAPN	20
521	MCDLLRIQPAPNNGT	20
558	KFSVCGFANPLPTES	20
570	TESLDCFCPHLQNST	20
577	CPHLQNSTQLEQVNO	20
586	LEQVNOMLNLQEEI	20
592	MLNLQEEITATVKV	20
637	AMRMPMWSSYTPVQL	20
639	RMPMWSSYTPVQLGD	20
658	PPTVPDCLRADVRVP	20
662	PDCLRADVRVPPSES	20
666	RADVRVPPSESQKCS	20
690	HGFLYPPASNRSDS	20
714	LVPMYEEFRKMWDYF	20
721	FRKMWDYFHSVLLIK	20
728	FHSVLLIKHATERNG	20
730	SVLLIKHATERNGVN	20
771	NTDVPPIPTHYFVLT	20
833	TAHARVRDVELLTG	20
852	QDKVQPVSEILQLKT	20
858	VSEILQLKTYLPTFE	20
84	DFEDTCVESTRIWMC	18
99	NKFRCGETREASLC	18

表 XLVIII-V1-HLA-DRB1-0401-15マ - - 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
103	CGETREASLCSCSD	18
135	GETSWLEENCOTAQQ	18
168	GFRAEYLYTWDLMP	18
186	KLKTCGIHISKYMRAM	18
200	MYPTKTFPNHYTIVT	18
224	IDNNMYDVNLNKNFS	18
233	LNKNFSLSSKEQNNP	18
237	FSLSSKEQNNPAWWH	18
276	VAINGSFPSIYMPYN	18
293	VPFEEIRSTLLKWL	18
319	MYFEEDSSGHAGGP	18
355	GLKORNHNCVNIIL	18
370	LADHGMDQTYCNKME	18
397	YMYEGPAPRIRAHNI	18
409	HNIPHDFFSFNSEEI	18
417	SNSEIVRNLSKRK	18
457	DKVHLFVDQQWLAVR	18
463	VDQQWLAVRSKSNIN	18
483	HGYNNEFRSMEAIFL	18
491	SMEAIFLAHGSPFKE	18
533	NGTHGSLNHLLKVPF	18
549	EPShAEVSKFSVCG	18
562	CGFANPLPTESLDCF	18
574	DCFCPHLQNSTQLEQ	18
580	LQNSTQLEQVNOMLN	18
593	LNLTQEEITATVKVN	18
604	VKNLFPGRPRVLQK	18
609	PFGRPRVLQKNVDHC	18
614	RVLQKNVDHCLLYHR	18
669	VRVPPSESQKCSFYL	18
682	YLADKNITHGFLYPP	18
697	ASNRTSDSQYDALIT	18
704	SQYDALITSNLVPY	18
733	LIKHATERNGVNVVS	18
739	ERNGVNVVSGPIFDY	18
758	HFDAPDEITKHLANT	18
763	DEITKHLANTDVPIP	18
802	DVLPFIPIHRPTNVE	18
844	LLTGLDFYQDKVQPV	18
292	SVPFEEIRSTLLKWL	17
848	LDYQDKVQPVSEIL	17
56	KKCFDASFRGLENCR	16
82	CWFEDTCVESTRIW	16
98	CNKFRCGETREASL	16
161	VILFMDGFRAEYLY	16
166	MDGFRAEYLYTWDL	16
170	RAEYLYTWDLMPNI	16
207	PNHYTIVTGLYPESH	16
226	NNMYDVNLNKNFSLS	16
234	NKNFSLSSKEQNNPA	16
246	NPAWWHGQPMWLTAM	16
247	PAWWHGQPMWLTAMY	16
258	TAMYQGLKAATYFWP	16
267	ATYFWPGSEVAINGS	16
268	TYFWPGSEVAINGSF	16
302	LLKWLDPKAERPRF	16
317	YTMYPFEEDSSGHAG	16

10

20

30

40

【表 4 8】

表 XLVIII-V1-HLA-DRB1-0401-15マー 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
318	TMYFEEDSSGHAGG	16
392	RINFFYMYEGPAPRI	16
394	NFFYMYEGPAPRIRA	16
413	HOFFSFNSEIVRNL	16
459	VHLFVDQQWLAVRSK	16
486	NNEFRSMEAIFLAHG	16
493	EAIFLAHGSPFKEKT	16
544	KVPFYEPShAEVSK	16
545	VPFYEPShAEVSKF	16
561	VCGFANPLTESLDC	16
607	NLPFGRPRVLQKNVD	16
623	CLLYHREYVSGFGKA	16
627	HREYVSGFGKAMRMP	16
640	MPMWSSYTPQLGDT	16
643	WSSYTPQLGDTSP	16
715	VPMYEEFRKMWDYFH	16
724	MWDYFHSVLLIKHAT	16
725	WDYFHSVLLIKHATE	16
756	DGHFDAPDEITKHLA	16
824	EALWVEERFATAHAR	16
441	TPDLPKRLHYAKNVR	15
825	ALWVEERFATAHARV	15
15	KNTLKKYKIACIMLL	14
30	ALLVIMSLGLGLGLG	14
31	LLVIMSLGLGLGLGL	14
32	LVIMSLGLGLGLGLR	14
34	IMSLGLGLGLGLRKL	14
36	SLGLGLGLGLRKLK	14
38	GLGLGLGLRKLKQ	14
63	FRGLENCRCDVACKD	14
105	ETRLEASLCSDDDC	14
109	EASLCSDDCLQK	14
137	TSWLEENCDAQCSQ	14
158	LPPVILFSMDGFRAE	14
160	PVILFSMDGFRAEYL	14
171	AEYLYTWDLMPNIN	14
184	INKLKTGIIHISKYMR	14
194	SKYMRAMYPTKTFPN	14
209	HYTIVTGLYPESHGI	14
210	YTIVTGLYPESHGII	14
220	SHGIDNNMYDVNLN	14
221	HGIDNNMYDVNLNK	14
257	LTAMYQGLKAATYFW	14
261	YQGLKAATYFWPGSE	14
284	SIYMPYNGSVPFEEER	14
296	EERISTLLKWLDPK	14
299	ISTLLKWLDPKAER	14
336	ARVIKALQVVDHAFG	14
341	ALQVVDHAFGMLMEG	14
348	AFGMLMEGLKQRNLH	14
349	FGMLMEGLKQRNLHN	14
362	HNCVNIILLADHGMD	14
367	ILLADHGMDQTYCN	14
372	DHGMDQTYCNKMEYM	14
383	MEYMTDYFPRINFFY	14
390	FPRINFFYMYEGPAP	14
395	FFYMYEGPAPRIRAH	14

表 XLVIII-V1-HLA-DRB1-0401-15マー 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
421	EEIVRNLSCRKPDQH	14
451	AKNVRIDKVLHFVDQ	14
453	NVRIDKVLHFVDQQW	14
456	IDKVLHFVDQQWLA	14
489	FRSMEAIFLAHGSPF	14
492	MEAIFLAHGSPFKEK	14
494	AIFLAHGSPFKEKTE	14
522	CDLLRIQAPNNGTH	14
536	HGSLNHLLKVPFYEP	14
539	LNHLLKVPFYEPShA	14
540	NHLLKVPFYEPShAE	14
542	LLKVPFYEPShAEV	14
553	AAEVSKFVCGFANP	14
565	ANPLTESLDCFCPH	14
590	NQMLNLTQEITATV	14
597	QEEITATVKVNLPG	14
605	KVNLPGRPRVLQKN	14
613	PRVLQKNVDHCLLYH	14
621	DHCLLYHREYVSGFG	14
628	REYVSGFGKAMRMPM	14
645	SYTPQLGDTSP	14
654	TSPLPPTVPDCLRAD	14
668	DVRVPPSESKCSFY	14
706	YDALITSNLVPMYEE	14
712	SNLVPMYEEFRKMWD	14
731	VLLIKHATERNGVNV	14
740	RNGVNVVSGPIFDYN	14
743	VNVVSGPIFDYNYDG	14
773	DVPIPTHYFVLTSC	14
779	HYFVLTSCNKKSHT	14
780	YFVLTSCNKKSHTP	14
781	FVLTSCNKKSHTPE	14
798	PGWLDVLPFIIPHRP	14
800	WLDVLPFIIPHRPTN	14
801	LDVLPFIIPHRPTNV	14
804	LPFIIPHRPTNVESC	14
836	IARVRDVELLTGLDF	14
839	VRDVELLTGLDFYQD	14
841	DVELLTGLDFYQDKV	14
842	VELLTGLDFYQDKVQ	14
845	LTGLDFYQDKVQPV	14

表 XLVIII-V2-DR1-0401-15マー 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
2	EASLCSDDCLQRK	14
5	LCSCSDDCLQRKDC	12
7	SCSDDCLQRKDCAD	12
14	QRKDCADYKSVCCG	12
1	LEASLCSDDCLQR	6
3	ASLCSDDCLQRKD	6
4	SLCSDDCLQRKDC	6
6	CSCSDDCLQRKCCA	6
11	DCLQRKDCADYKSV	6
12	CLQRKDCADYKSV	6
13	LQRKDCADYKSVCC	6
15	RKDCADYKSVCCGE	6

10

20

30

40

【表 4 9】

表 XLIX-V1-HLA-DRB1-1101-15 マー - 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
339	IKALQVVDHAFGMLM	27
42	GLGLRKLEKQGSCKR	26
518	YNLMCDLLRIQPAPN	26
207	PNHYTIVTGLYPESH	24
302	LLKWLDPKAERPRF	24
750	IFDYNVDGHFDAPDE	24
392	RINFFYMYEGPAPRI	23
417	SFNSEEIVRNLSCKR	23
313	RPRFYTYMEEPDSS	22
662	PDCLRADVRVPPSES	22
160	PVILFSDMGFRAEYL	21
178	DTLMPNINKLTCGI	21
296	EERISTLLKWLDPK	21
759	FDAPDEITKHLANTD	21
780	YFVWLTSCKNKSHTP	21
823	PEALWVEERFATAIA	21
227	NMYDVNLNKNFSLSS	20
421	EEIVRNLSCKRPDQH	20
447	RLHYAKNVRIDKVLH	20
491	SMEAIFLAHGPFKE	20
536	HGSLNHLLKVPFYEP	20
728	FHSVLLIKHATERNG	20
798	PGWLDVLPFIIPHRP	20
801	LDVLPFIIPHRPTNV	20
29	LALLVIMSLGLGLGL	19
31	LLVIMSLGLGLGLGL	19
56	KKCFDASFRGLENCR	19
300	STLLKWLDPKAERP	19
678	KCSFYLADKNITGHF	19
848	LDYQDKVQPVSEIL	19
858	VSEILQKTYLPTFE	19
25	CIVLALLVIMSLGL	18
60	DASFRGLENCRCOVA	18
234	NKNFSLSSKEQNNPA	18
266	AATYFWPGSEVAING	18
380	CNKMEYMTDYFPRIN	18
482	NHGYNNEFRSMEAIF	18
489	FRSMEAIFLAHGPF	18
539	LNHLLKVPFYEPFSA	18
544	KVPFYEPFSAEEVSK	18
597	QEETATVKVNLPPG	18
631	VSGFGKAMRMPMWSS	18
645	SYTVPQLGDTSPPLP	18
715	VPMYEEFRKMWDYFH	18
777	PTHYFVWLTSCKNKS	18
778	THYFVWLTSCKNKSH	18
803	VLPIIPHRPTNVE	18
836	IARVRDVELLTGLDF	18
68	NCRCDVACKDRGDCC	17
93	TRIMMCNKFRCGETR	17
174	LYTWDTLMPNINKLK	17
283	PSIYMPYNGSVPFEE	17
317	YTYMEEPDSSGHAG	17
346	DHAFGMLMEGLKQRN	17
463	VDQQWLAVRSKSNIN	17
515	IEVYNLMCDLLRIQP	17

表 XLIX-V1-HLA-DRB1-1101-15 マー - 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
556	VSKFVCGFANPLPT	17
691	GFLYPPASNRTSDSQ	17
725	WDYFHSVLLIKHATE	17
797	CPGWLDVLPFIIPHR	17
92	STRIMMCNKFRCGET	16
126	CADYKSVCGGETSWL	16
136	ETSWLEENCDAQQS	16
258	TAMYQGLKAATYFWP	16
279	NGSFPSIYMPYNGSV	16
305	WLDLPAERPRFYTM	16
349	FGMLMEGLKQRNLHN	16
387	TDYFPRINFFYMYEG	16
393	INFFYMYEGPAPRIR	16
397	YMYEGPAPRIRAHNI	16
438	PYLTPDLPKRLHYAK	16
464	DQQWLAVRSKSNIN	16
486	NNEFRSMEAIFLAHG	16
500	GPSFKEKTEVEPFEN	16
509	VEPFENIEVYNLMCD	16
561	VCGFANPLPTESLDC	16
610	FGRPRVLQKNVDHCL	16
703	DSQYDALITSNLVPM	16
718	YEEFRKMWDYFHSVL	16
802	DVLPFIIPHRPTNVE	16
830	ERFATAIARVRDVEL	16
12	PVKKNTLKKYKIACI	15
38	GLGLGLGLRKLEKQG	15
213	VTGLYPESHGIIDNN	15
254	PMWLTAMYQGLKAAT	15
332	GPVSARVIALQVVD	15
401	GPAPRIRAHNIPHDF	15
427	LSCRKPDQHFKPYLT	15
458	KVHLFVDQQWLAVRS	15
465	QQWLAVRSKSNINCG	15
533	NGTHGSLNHLLKVPF	15
614	RVLQKNVDHCLLYHR	15
619	NVDHCLLYHREYVSG	15
721	FRKMWDYFHSVLLIK	15
846	TGLDFYQDKVQPVSE	15
7	LATEQPVKNTLKKY	14
20	KYKIACIALLVI	14
26	IVLALLVIMSLGLG	14
39	LGLGLGLRKLEKQGS	14
70	RCDVACKDRGDCCWD	14
94	RIMMCNKFRCGETRL	14
99	NKFRCGETRLEASLC	14
114	SCSDDCLOKQKDCAD	14
180	LMPNINKLKTGCIHS	14
196	YMRAMYPTKTFPNHY	14
210	YTVTGLYPESHGII	14
243	EQNNPAWVHGQPMWL	14
257	LTAMYQGLKAATYFW	14
290	NGSVPFEEERISTLLK	14
303	LKWLDPKAERPRFY	14
321	FEEPSSGHAGGPVS	14
365	VNILLADHGMDQTY	14
405	RIRAHNIPHDFFSFN	14

10

20

30

40

【表 5 0】

表 XLIX-V1-HLA-DRB1-1101-15マー . 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
441	TPDLPKRLHYAKNVR	14
450	YAKNVRIDKVLHFVD	14
550	PSHAEEVSKFVSGGF	14
602	ATVKVNLFPGRPRVL	14
628	REYVSGFGKAMRMPM	14
658	PPTVPDCLRADVRVP	14
682	YLADKNITHGFLYPP	14
685	DKNITHGFLYPPASN	14
714	LVPMYEEFRKMWDYF	14
724	MWDYFHSVLLIKHAT	14
727	YFHSVLLIKHATERN	14
740	RNGVNVVSGPIFDYN	14
771	NTDVPIPTHYFVLT	14
814	NVESCPEGKPEALWV	14
829	EERFTAHIARVRDVE	14
842	VELLTGLDFYQDKVQ	14
23	IACIVLALLVIMSL	13
27	VLLALLVIMSLGLGL	13
28	LLALLVIMSLGLGLG	13
33	VIMSLGLGLGLRLK	13
63	FRGLENCRCDVACKD	13
194	SKYMRAMYPTKTFPN	13
225	DNNMYDVNLNKNFSL	13
350	GMLMEGLKQRNLHNC	13
434	QHFKPYLTPDLPKRL	13
453	NVRIDKVLHFVDDQW	13
514	NIEVYNLMCDLLRIQ	13
540	NHLLKVPFYEPSHAE	13
558	KFSVCGFANPLPTES	13
583	STQLEQVNQMLNLTQ	13
598	EEITATVKVNLFPGR	13
621	DHCLLYHREYVSGFG	13
643	WSSYTPVQLGDTSP	13
651	LGDTSPLPPTVPDCL	13
726	DYFHSVLLIKHATER	13
731	VLLIKHATERNGVNV	13
766	TKHLANTDVPIPTHY	13
812	PTNVESCPEGKPEAL	13
852	QDKVQPVSEILQLKT	13
855	VQPVSEILQLKTYLP	13

表 XLVIII-V3-HLA-DR1-0401-15マー . 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
1	FIIPHRPTNVESCPG	12
4	PHRPTNVESCPGGKP	12
7	PTNVESCPGGKPEAL	8
5	HRPTNVESCPGGKPE	6
6	RPTNVESCPGGKPEA	6
9	NVESCPGGKPEALWV	6
10	VESCPGGKPEALWVE	6
12	SCPGGKPEALWVEER	6
13	CPGGKPEALWVEERF	6
14	PGGKPEALWVEERFT	6
15	GGKPEALWVEERFTA	6

表 XLVIII-V4-HLA-DR1-0401-15マー . 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
2	ILQLKTYLPTFETPI	8

表 XLIX-V2-DRB1-1101-15マー . 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
7	SCSDDCLQRKDCCAD	14
15	RKDCCADYKSVCGGE	9
8	CSDDCLQRKDCCADY	8
13	LQRKDCADYKSVCGQ	7
2	EASLCSDDCLQRK	6
9	SDDCLQRKDCCADYK	6
10	DDCLQRKDCCADYKS	6

表 XLIX-V3-HLA-DRB1-1101-15マー . 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
4	PHRPTNVESCPGGKP	14
9	NVESCPGGKPEALWV	14
7	PTNVESCPGGKPEAL	13
3	IPHRPTNVESCPGGK	8
5	HRPTNVESCPGGKPE	7
1	FIIPHRPTNVESCPG	6
15	GGKPEALWVEERFTA	6

表 XLIX-V4-HLA-DRB1-1101-15マー . 161P2F10B		
Pos	123456789012345	スコア
2	ILQLKTYLPTFETPI	6

10

20

30

40

【表 5 1】

表 L: 161P2F10B の特性

特徴	バイオインフォマティクスのプログラム	URL(ワールドワイドウェブ上のロケーション)	結果
ORF (停止コドンを含む)	ORF finder	.ncbi.nlm.nih.gov/	
アミノ酸の #			875
膜貫通領域	TM Pred	.ch.embnet.org/	1つの TM, aa 23-41
	HMMTop	.enzim.hu/hmmtop/	1つの TM, aa 23-45
	Sosui	.genome.ad.jp/SOSui/	1つの TM, aa 23-45
	TMHMM	.cbs.dtu.dk/services/TMHMM	1つの TM, aa 23-45
シグナルペプチド	Signal P	.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	なし
pI	pI/MW tool	.expasy.ch/tools/	6.12
分子量	pI/MW tool	.expasy.ch/tools/	100.09 kDa
局在	PSORT	psort.nibb.ac.jp/	形質膜 74% ゴルジ 30%
	PSORT II	psort.nibb.ac.jp/	内質 30.4% ゴルジ 21.7%
モチーフ	Pfam	.sanger.ac.uk/Pfam/	リトメジンB, I 型 ホスホジエステラーゼ/ ヌクレオチド ピロホスファターゼ
	Prints	.biochem.ucl.ac.uk/	細胞接着 RGD
	Blocks	.blocks.fhcrc.org/	リトメジンB, DNA/RNA 非特異的 エンドヌクレアーゼ
	Prosite	.genome.ad.jp/	リトメジンB

10

20

30

表LI. 転写 改変体 161P2F10B v. 6のヌクレオチド配列(配列番号91)

```

atacagtttc tctttgccag actagactaa agaaggagca ctactttatt ctgataaaac      60
aggctctatgc agctaccagg acaatggaat ctacgttgac tttagcaacg gaacaacctg      120
ttaagaagaa cactcttaag aaatataaaa tagcttgcat tgttcttctt gctttgctgg      180
tgatcatgtc acttggatta ggcctggggc ttggactcag gaaactggaa aagcaaggca      240
gctgcaggaa gaagtgcttt gatgcatcat ttagaggact ggagaactgc cgggtgtgatg      300
tggcatgtaa agaccgaggt gattgctgct gggatttga agacacctgt gtggaatcaa      360
ctogaatatg gatgtgcaat aaatttcggt gtggagagac cagattagag gccagccttt      420
gctcttgttc agatgactgt ttgcagagga aagattgctg tgctgactat aagagtgttt      480
gccaaggaga aacctcatgg ctggaagaaa actgtgacac agcccagcag tctcagtgcc      540
cagaagggtt tgacctgcca ccagttatct tgttttctat ggatggattt agagctgaat      600
atttatacac atgggatact ttaatgccaa atatcaataa actgaaaaca tgtggaattc      660
attcaaaata catgagagct atgtatccta ccaaaacctt cccaaatcat tacaccattg      720
tcacgggctt gtatccggag tcacatggca tcattgacaa taatatgtat gatgtaaatc      780
tcaacaagaa tttttcactt tcttcaaaag aacaaaataa tccagcctgg tggcatgggc      840
aaccaatgtg gctgacagca atgtatcaag gtttaaaagc cgctacctac ttttgcccgc      900
gatcagaagt ggcataaaat ggcctctttc cttccatata catgccttac aacggaagtg      960
tcccatttga agagaggatt tctacactgt taaaaaggct ggacctgccc aaagctgaga     1020
gaccagggtt ttataccatg ttttttgaag aacctgatcc ctctggacat gcagggtggac     1080
cagtcagtgc cagagtaatt aaagccttac aggtagtaga tcatgctttt gggatgttga     1140
tgggaaggcct gaagcagcgg aatttgcaca actgtgtcaa tatcatcctt ctggctgacc     1200

```

40

【 0 7 4 4 】

【表 5 2】

atggaatgga	ccagacttat	tgtaacaaga	tggaatacat	gactgattat	tttcccagaa	1260
taaacttctt	ctacatgtac	gaaggcctg	ccccccgct	ccgagctcat	aatataacct	1320
atgacttttt	tagttttaat	tctgaggaaa	ttgttagaaa	cctcagttgc	cgaaaacctg	1380
atcagcattt	caagccctat	ttgactcctg	atgtgccaaa	gcgactgcac	tatgccaaaga	1440
acgtcagaat	cgacaaagt	catctctttg	tggatcaaca	gtggctggct	gttaggagta	1500
aatcaaatac	aaattgtgga	ggaggcaacc	atggttataa	caatgagttt	aggagcatgg	1560
aggctatctt	tctggcacat	ggaccagtt	ttaaagagaa	gactgaagtt	gaaccatttg	1620
aaaatattga	agtctataac	ctaattgtgtg	atcttctacg	cattcaacca	gcaccaaaaca	1680
atggaaccca	tggtagttta	aaccatcttc	tgaagggtgc	tttttatgag	ccatcccctg	1740
cagaggaggt	gtcaaaagtt	tctgtttgtg	gctttgtctaa	tccatggccc	acagagtctc	1800
ttgactgttt	ctgccctcac	ctacaaaata	gtactcagct	ggaacaagtg	aatcagatgc	1860
taaatctcac	ccaagaagaa	ataacagcaa	cagtgaagt	aaatttgcca	tttgggaggg	1920
ctagggtact	gcagaagaac	gtggaccact	gtctccttta	ccacagggaa	tatgtcagtg	1980
gatttggaaa	agctatgagg	atgcccatgt	ggagttcata	cacagtcccc	cagttggggag	2040
acacatcgcc	tctgctccc	actgtcccag	actgtctgcg	ggctgatgtc	agggttcctc	2100
cttctgagag	ccaaaaatgt	tcttctctatt	tagcagacaa	gaatatcacc	cacggcttcc	2160
tctatctctc	tgcagcaat	agaacatcag	atagccaata	tgatgcttta	attactagca	2220
atgtgttacc	tatgtatgaa	gaattcagaa	aaatgtggga	ctactcccac	agtgttcttc	2280
ttataaaaaca	tgccacagaa	agaataggag	taaatgtggt	tagtggacca	atatttgatt	2340
ataattatga	tggccatttt	gatgtctccag	atgaaattac	caaacattta	gccaacactg	2400
atgttcccc	cccaacacac	tactttgtgg	tgctgaccag	ttgtaaaaac	aagagccaca	2460
caccggaaaa	ctgccctggg	tggtctggatg	tctaccctt	tatcatccct	caccgaccta	2520
ccaactgtgga	gagctgtcct	gaaggtaaac	cagaagctct	ttgggttgaa	gaaagattta	2580
cagctcacat	tgccogggtc	ogtgatgtag	aacttctcac	tgggcttgac	ttctatcagg	2640
ataaagtgca	gcctgtctct	gaaattttgc	aactaaagac	atatttacca	acatttgaaa	2700
ccactattta	acttaataat	gtctacttaa	tatataattt	actgtataaa	gtaattttgg	2760
caaaatataa	gtgatttttt	tctggagaat	tgtaaaataa	agttttctat	ttttccttaa	2820
gtcccctaaa	agccataatt	tttattatc	cttttctct	tttttcaatt	ctatgaatat	2880
gtattatttt	aaagttatat	ttttcacaca	gagatgatgc	tatattacac	cttccctttt	2940
ttgttggttt	cttaactct	aatctcatga	cagattatac	cttcccttatt	actgttttta	3000
tcttactcag	aatctttgaa	tatatttttc	tgcccagaat	tatctaaaca	aaaggggagaa	3060
caaaagaagt	atgtctcact	tgggaactga	atcaactcta	aatcagtttt	gtcacaaaac	3120
ttttgtatt	tgactggcaa	tgttgattaa	aattaaat	gcaca		3165

10

20

表LII. 161P2F10B v. 1 (配列番号92)および161P2F10B v. 6 (配列番号93)のヌクレオチド配列アラインメント
 スコア = 5301 ビット (2757), 期待値 = 0.0 同一性 = 2774/2780 (99%), ギャップ = 1/2780 (0%) 鎖 = +/+

v.1: 1	ctactttattctgataaaaacaggtctatgcagctaccaggacaatggaatctacgttgac	60
v.6: 41	ctactttattctgataaaaacaggtctatgcagctaccaggacaatggaatctacgttgac	100
v.1: 61	tttagcaacggaacaacctgttaagaagaacactcttaagaaatataaaatagcttgcat	120
v.6: 101	tttagcaacggaacaacctgttaagaagaacactcttaagaaatataaaatagcttgcat	160
v.1: 121	tgttcttcttgccttgcctggatcatgtcacttggattaggcctggggcttggactcag	180
v.6: 161	tgttcttcttgccttgcctggatcatgtcacttggattaggcctggggcttggactcag	220
v.1: 181	gaaactggaaaagcaaggcagctgcaggaagaagtgctttgatgcatcatttagaggact	240
v.6: 221	gaaactggaaaagcaaggcagctgcaggaagaagtgctttgatgcatcatttagaggact	280
v.1: 241	ggagaactgccggtgtgatgtggcatgtaagaccgaggtgatttgcctgctgggattttga	300
v.6: 281	ggagaactgccggtgtgatgtggcatgtaagaccgaggtgatttgcctgctgggattttga	340
v.1: 301	agacacctgtgtggaatcaactcgaatatggatgtgcaataaatttcgcttgtggagagac	360
v.6: 341	agacacctgtgtggaatcaactcgaatatggatgtgcaataaatttcgcttgtggagagac	400

30

40

【表 5 3】

v.1: 361 cagattagaggccagcctttgctcttggttcagatgactggttgacagaagaaagattgctg 420
 |||
 v.6: 401 cagattagaggccagcctttgctcttggttcagatgactggttgacagaggaaagattgctg 460

v.1: 421 tgctgactataagagtgtttgccaaggagaaacctcatggctggaagaaaactgtgacac 480
 |||
 v.6: 461 tgctgactataagagtgtttgccaaggagaaacctcatggctggaagaaaactgtgacac 520

v.1: 481 agcccagcagtcctcagtgccagaagggttgacctgccaccagttatcttgtttctat 540
 |||
 v.6: 521 agcccagcagtcctcagtgccagaagggttgacctgccaccagttatcttgtttctat 580

v.1: 541 ggatggatttagagctgaataattatacacatgggatactttaatgccaatatcaataa 600
 |||
 v.6: 581 ggatggatttagagctgaataattatacacatgggatactttaatgccaatatcaataa 640

v.1: 601 actgaaaacatgtggaattcattcaaaatcacatgagagctatgtatcctacaaaacctt 660
 |||
 v.6: 641 actgaaaacatgtggaattcattcaaaatcacatgagagctatgtatcctacaaaacctt 700

v.1: 661 cccaaatcattacaccattgtcacgggcttggatccagagtcacatggcatcattgacaa 720
 |||
 v.6: 701 cccaaatcattacaccattgtcacgggcttggatccagagtcacatggcatcattgacaa 760

v.1: 721 taatatgtatgatgtaaattctcaacaagaatttttcaactttcttcaaaggaacaaaataa 780
 |||
 v.6: 761 taatatgtatgatgtaaattctcaacaagaatttttcaactttcttcaaaggaacaaaataa 820

v.1: 781 tccagcctggatggcatgggcaaccaatgtggctgacagcaatgtatcaagggtttaaagc 840
 |||
 v.6: 821 tccagcctggatggcatgggcaaccaatgtggctgacagcaatgtatcaagggtttaaagc 880

v.1: 841 cgctacctacttttggcccggatcagaagtggtctataaatggctcctttccttccatata 900
 |||
 v.6: 881 cgctacctacttttggcccggatcagaagtggtctataaatggctcctttccttccatata 940

v.1: 901 catgccttacaacggaagtgtcccattgaagagaggatttctacactgttaaatggct 960
 |||
 v.6: 941 catgccttacaacggaagtgtcccattgaagagaggatttctacactgttaaatggct 1000

v.1: 961 ggacctgccccaaagctgaaagaccaggttttataccatgtattttgaagaacctgattc 1020
 |||
 v.6: 1001 ggacctgccccaaagctgagagaccaggttttataccatgtattttgaagaacctgattc 1060

v.1: 1021 ctctggacatgcaggaggaccagtcagtgccagagtaattaaagccttacaggtagtaga 1080
 |||
 v.6: 1061 ctctggacatgcaggaggaccagtcagtgccagagtaattaaagccttacaggtagtaga 1120

v.1: 1081 tcatgcttttgggatgttgatggaaggcctgaagcagcggaaatttgcaactgtgtcaa 1140
 |||
 v.6: 1121 tcatgcttttgggatgttgatggaaggcctgaagcagcggaaatttgcaactgtgtcaa 1180

v.1: 1141 tatcatccttctggctgaccatggaatggaccagacttattgtaacaagatggaatacat 1200
 |||
 v.6: 1181 tatcatccttctggctgaccatggaatggaccagacttattgtaacaagatggaatacat 1240

10

20

30

40

【 0 7 4 6 】

【表 5 4】

v.1: 1201 gactgattatlttcccagaataaaacttcttctacatgtacgaagggcctgccccccgcat 1260
 |||
 v.6: 1241 gactgattatlttcccagaataaaacttcttctacatgtacgaagggcctgccccccgct 1300

v.1: 1261 ccgagctcataatatacctcatgacttttttagttttaattctgaggaatgtttagaaa 1320
 |||
 v.6: 1301 ccgagctcataatatacctcatgacttttttagttttaattctgaggaatgtttagaaa 1360

v.1: 1321 cctcagttgccgaaaacctgatcagcatttcaagccctatttgactcctgatttgccaaa 1380
 |||
 v.6: 1361 cctcagttgccgaaaacctgatcagcatttcaagccctatttgactcctgatttgccaaa 1420

v.1: 1381 gcgactgcactatgccaagaacgtcagaatcgacaagttcatctctttgtggatcaaca 1440
 |||
 v.6: 1421 gcgactgcactatgccaagaacgtcagaatcgacaagttcatctctttgtggatcaaca 1480

v.1: 1441 gtggctggctgttaggagtaaatcaaatacaaattgtggaggaggcaaccatgggtataa 1500
 |||
 v.6: 1481 gtggctggctgttaggagtaaatcaaatacaaattgtggaggaggcaaccatgggtataa 1540

v.1: 1501 caatgagtttaggagcatggaggctatcttctggcacatggaccagttttaaagagaa 1560
 |||
 v.6: 1541 caatgagtttaggagcatggaggctatcttctggcacatggaccagttttaaagagaa 1600

v.1: 1561 gactgaagttgaaccatttgaaaatattgaagtctataacctaatgtgtgatcttctacg 1620
 |||
 v.6: 1601 gactgaagttgaaccatttgaaaatattgaagtctataacctaatgtgtgatcttctacg 1660

v.1: 1621 cattcaaccagcaccaaaacaatggaacccatggttagtttaaacctcttctgaagggtgcc 1680
 |||
 v.6: 1661 cattcaaccagcaccaaaacaatggaacccatggttagtttaaacctcttctgaagggtgcc 1720

v.1: 1681 tttttatgagccatcccatgcagaggagggtgcaaaagtttctgtttgtggctttgctaa 1740
 |||
 v.6: 1721 tttttatgagccatcccatgcagaggagggtgcaaaagtttctgtttgtggctttgctaa 1780

v.1: 1741 tccattgcccacagagtctcttgactgtttctgcctcacctacaaaatagtactcagct 1800
 |||
 v.6: 1781 tccattgcccacagagtctcttgactgtttctgcctcacctacaaaatagtactcagct 1840

v.1: 1801 ggaacaagtgaatcagatgctaatactcacccaagaagaataacagcaacagtgaagt 1860
 |||
 v.6: 1841 ggaacaagtgaatcagatgctaatactcacccaagaagaataacagcaacagtgaagt 1900

v.1: 1861 aaatttgccatttgggaggcctagggactgcagaagaacgtggaccactgtctccttta 1920
 |||
 v.6: 1901 aaatttgccatttgggaggcctagggactgcagaagaacgtggaccactgtctccttta 1960

v.1: 1921 ccacagggaaatgtcagtggtattggaaaagctatgaggatgcccattgtggagttcata 1980
 |||
 v.6: 1961 ccacagggaaatgtcagtggtattggaaaagctatgaggatgcccattgtggagttcata 2020

v.1: 1981 cacagtccccagttgggagacacatcgccctctgcctcccactgtcccagactgtctgcg 2040
 |||
 v.6: 2021 cacagtccccagttgggagacacatcgccctctgcctcccactgtcccagactgtctgcg 2080

10

20

30

40

【表 5 5】

v.1:	2041	ggctgatgtcagggttcctcctctgagagccaaaaatggtccttctatttagcagacaa	2100	
v.6:	2081	ggctgatgtcagggttcctcctctgagagccaaaaatggtccttctatttagcagacaa	2140	
v.1:	2101	gaatatcaccacaggttcctctatcctcctgccagcaatagaacatcagatagccaata	2160	
v.6:	2141	gaatatcaccacaggttcctctatcctcctgccagcaatagaacatcagatagccaata	2200	
v.1:	2161	tgatgctttaattactagcaatttgggtacctatgtatgaagaattcagaaaaatgtggga	2220	
v.6:	2201	tgatgctttaattactagcaatttgggtacctatgtatgaagaattcagaaaaatgtggga	2260	10
v.1:	2221	ctacttccacagtggttcttcttataaaaacatgccacagaaagaatggagtaaatgtggt	2280	
v.6:	2261	ctacttccacagtggttcttcttataaaaacatgccacagaaagaatggagtaaatgtggt	2320	
v.1:	2281	tagtggaccaatatttgattataattatgatggccattttgatgctccagatgaaattac	2340	
v.6:	2321	tagtggaccaatatttgattataattatgatggccattttgatgctccagatgaaattac	2380	
v.1:	2341	caaacatttagccaacactgatgttcccatcccaacacactactttgtggtgctgaccag	2400	
v.6:	2381	caaacatttagccaacactgatgttcccatcccaacacactactttgtggtgctgaccag	2440	20
v.1:	2401	ttgtaaaaaacaagagccacacaccggaaaactgccctgggtggctggatgtcctaccctt	2460	
v.6:	2441	ttgtaaaaaacaagagccacacaccggaaaactgccctgggtggctggatgtcctaccctt	2500	
v.1:	2461	tatcatcctcaccgacctaccaacgtggagagctgtcctgaaggtaaaccagaagctct	2520	
v.6:	2501	tatcatcctcaccgacctaccaacgtggagagctgtcctgaaggtaaaccagaagctct	2560	
v.1:	2521	ttgggtgaagaaagatttacagctcacattgcccggtccgtgatgtagaacttctcac	2580	
v.6:	2561	ttgggtgaagaaagatttacagctcacattgcccggtccgtgatgtagaacttctcac	2620	30
v.1:	2581	tgggcttgacttctatcaggataaagtgcagcctgtctctgaaattttgcaactaaagac	2640	
v.6:	2621	tgggcttgacttctatcaggataaagtgcagcctgtctctgaaattttgcaactaaagac	2680	
v.1:	2641	atatttaccacatttgaaccactatttaacttaataatgtctacttaatatataattt	2700	
v.6:	2681	atatttaccacatttgaaccactatttaacttaataatgtctacttaatatataattt	2740	
v.1:	2701	actgtataaagtaattttggcaaaatataagtga-tttttctggagaattgtaaaataa	2759	
v.6:	2741	actgtataaagtaattttggcaaaatataagtga-tttttctggagaattgtaaaataa	2800	40
v.1:	2760	agttttctatttttccttaa	2779	
v.6:	2801	agttttctatttttccttaa	2820	

表LIII. 161P2F10B v. 6(配列番号94)によってコードされるタンパク質のペプチド配列

MESTLTLATE QPVKNTLKK YKIACIVLLA LLVIMSLGLG LGLGLRKLEK QGSCRKKCFD	60
ASFRGLENCR CDVACKDRGD CCWDFEDTCV ESTRIWMCNK FROGETRLEA SLCSCSDDCL	120
QKKOCCADYK SVCQGETSWL EENCDTAQQS QCPEGFDLPP VILFSMDGFR AEYLYTWDTL	180

【表 5 6】

MPNINKLKTC	GIHSKYMRAM	YPTKTFPNHY	TIVTGLYPES	HGIIDNNMYD	VNLNKNFSL	240
SKEQNNPAWW	HGQPMWLTAM	YQGLKAATYF	WPGSEVAING	SFPSIYMPYN	GSVPFEERIS	300
TLLKWLDLPK	AERPRFYTM	FEEDSSGHA	GGPVSARVIK	ALQVVDHAFG	MLMEGLKQRN	360
LHNCVNIILL	ADHGMDQTYC	NKMEYMTDYF	PRINFFYMYE	GPAPRIRAHN	IPHDFFSFNS	420
EIVRNLSR	KPDQHFKPYL	TPDLPKRLHY	AKNVRIDKVH	LFVDQQLAV	RSKNTNCGG	480
GNHGYNNEFR	SMEAI FLAHG	PSFKEKTEVE	PFENIEVYNL	MCDLLRIQPA	PNNGTHGSLN	540
HLLKVPFYEP	SHAEVSKFS	VCGFANPLPT	ESLDCFCPHL	QNSTQLEQVN	QMLNLTQEEI	600
TATVKVNLPF	GRPRVLQKNV	DHCLLYHREY	VSGFGKAMRM	PMWSSYTPVQ	LGDTSPPLPT	660
VPDCLRADVR	VPPSESQKCS	FYLADKNITH	GFLYPPASNR	TSDSQYDALI	TSNLVPMYEE	720
FRKMWDYFHS	VLLIKHATER	NGVNVVSGPI	FDYNYDGHFD	APDEITKHLA	NTDVPIPTHY	780
FVVLTSCKNK	SHTPENCPGW	LDVLPFIIPH	RPTNVESCPE	GKPEALWVEE	RFTAHARVR	840
DVELLTGLDF	YQDKVQPVSE	ILQLKTYLPT	FETTI			875

10

表 LIV. 161P2F10Bv.1 v.1 (配列番号95)および161P2F10B v6 (配列番号96)のアミノ酸配列アライメント

スコア = 1855ビット(4804), 期待値 = 0.0 同一性 = 875/875 (100%), ポジティブ = 875/875 (100%)

161P2F10Bv.1: 1	MESTLTLATEQPVKNTLKKYKIACIVLLALLVIMSLGGLGLGLRKLKLEKQGS	CRKKCFD	60
161P2F10Bv.6: 1	MESTLTLATEQPVKNTLKKYKIACIVLLALLVIMSLGGLGLGLRKLKLEKQGS	CRKKCFD	60
161P2F10Bv.1: 61	ASFRGLENCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFR	CGETRLEASLCS	SCSDDCDCL 120
161P2F10Bv.6: 61	ASFRGLENCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFR	CGETRLEASLCS	SCSDDCDCL 120
161P2F10Bv.1: 121	QKKDCCADYKSVCOGETSWLEENCDTAQQSQCEGFDLPPVILF	SMDGFRAEYL	TYTWDTL 180
161P2F10Bv.6: 121	QKKDCCADYKSVCOGETSWLEENCDTAQQSQCEGFDLPPVILF	SMDGFRAEYL	TYTWDTL 180
161P2F10Bv.1: 181	MPNINKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGI	IDNNMYDVNLN	KNFSL 240
161P2F10Bv.6: 181	MPNINKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGI	IDNNMYDVNLN	KNFSL 240
161P2F10Bv.1: 241	SKEQNNPAWWHGQPMWLTAMYQGLKAATYFWPGSEVAINGSFPSI	YMPYNGSV	PFEERIS 300
161P2F10Bv.6: 241	SKEQNNPAWWHGQPMWLTAMYQGLKAATYFWPGSEVAINGSFPSI	YMPYNGSV	PFEERIS 300
161P2F10Bv.1: 301	TLLKWLDLPKAERPRFYTMFEEDSSGHAGGPVSARVIKALQVVD	HAFGMLMEGL	KQRN 360
161P2F10Bv.6: 301	TLLKWLDLPKAERPRFYTMFEEDSSGHAGGPVSARVIKALQVVD	HAFGMLMEGL	KQRN 360
161P2F10Bv.1: 361	LHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPRI	RAHNI PHDFF	SFNS 420
161P2F10Bv.6: 361	LHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPRI	RAHNI PHDFF	SFNS 420
161P2F10Bv.1: 421	EIVRNLSRKPQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVHLFVDQQLAV	RSKNTNCGG	480
161P2F10Bv.6: 421	EIVRNLSRKPQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVHLFVDQQLAV	RSKNTNCGG	480
161P2F10Bv.1: 481	GNHGYNNEFRSMEAI FLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRI	QPAPNNGTHG	SLN 540
161P2F10Bv.6: 481	GNHGYNNEFRSMEAI FLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRI	QPAPNNGTHG	SLN 540
161P2F10Bv.1: 541	HLLKVPFYEP SHAEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQLEQVN	QMLNLTQEEI	600
161P2F10Bv.6: 541	HLLKVPFYEP SHAEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQLEQVN	QMLNLTQEEI	600
161P2F10Bv.1: 601	TATVKVNLPFGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPM	WSSYTPVQLG	DTSPLPPT 660
161P2F10Bv.6: 601	TATVKVNLPFGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPM	WSSYTPVQLG	DTSPLPPT 660
161P2F10Bv.1: 661	VPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLDKNITHGFLYPPASNRTSDSQYDALI	TSNLVPMYEE	720
161P2F10Bv.6: 661	VPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLDKNITHGFLYPPASNRTSDSQYDALI	TSNLVPMYEE	720
161P2F10Bv.1: 721	FRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEIT	KHLANTDVPI	PTHY 780
161P2F10Bv.6: 721	FRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEIT	KHLANTDVPI	PTHY 780

20

30

40

【 0 7 4 9 】

【表 5 7】

161P2F10Bv.1: 781 FVVLTSCKNKSHTPENC PGWLDVLPFI IPHRPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVR 840
 FVVLTSCKNKSHTPENC PGWLDVLPFI IPHRPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVR
 161P2F10Bv.6: 781 FVVLTSCKNKSHTPENC PGWLDVLPFI IPHRPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVR 840
 161P2F10Bv.1: 841 DVELLTGLDFYQDKVQPVEILQLKTYLPTFETTI 875
 DVELLTGLDFYQDKVQPVEILQLKTYLPTFETTI
 161P2F10Bv.6: 841 DVELLTGLDFYQDKVQPVEILQLKTYLPTFETTI 875

表 LV. 転写改変体 161P2F10B v.7 (配列番号 NO: 97) のヌクレオチド配列

ctactttatt	ctgataaac	aggcttatgc	agctaccagg	acaatggaat	ctacgttgac	60
tttagcaacg	gaacaacctg	ttaagaagaa	cactcttaag	aaatataaaa	tagcttgcat	120
tacagggtct	ctctcctttg	ggatctcacc	tcaccacaac	ctctgtttcc	caggctcaag	180
tgatcctcct	gcctcagcct	cctgagtagc	ttggaccaca	ggcacatgcc	acaaggctca	240
gctaagtttt	tgctcttctt	gctttgctgg	tgatcatgtc	acttgatta	ggcctggggc	300
ttggactcag	gaaactggaa	aagcaaggca	gctgcaggaa	gaagtgcttt	gatgcatcat	360
ttagaggact	ggagaactgc	cggtgtgatg	tggcatgtaa	agaccgaggt	gattgtctgt	420
gggattttga	agacacctgt	gtggaatcaa	ctcgaatagt	gatgtgcaat	aaatttcggt	480
gtggagagac	cagattagag	gccagccttt	gctctgtttc	agatgactgt	ttgcagaaga	540
aagattgctg	tgctgactat	aagagtgttt	gcccaaggaga	aacctcatgg	ctggaagaaa	600
actgtgacac	agcccagcag	tctcagtgcc	cagaagggtt	tgacctgcca	ccagttatct	660
tgttttctat	ggatggattt	agagctgaat	atctatacac	atgggatact	ttaatgccaa	720
atatcaataa	actgaaaaca	tgtggaatcc	attcaaaaata	catgagagct	atgtatccta	780
ccaaaacctt	cccaaatcat	tacaccattg	tcacgggctt	gtatccagag	tcacatggca	840
tcattgacaa	taatatgtat	gatgtaaatc	tcaacaagaa	tttttcaact	tcttcaaagg	900
aacaaaataa	tcagcctggg	tggcatgggc	aaccaatgtg	gctgacagca	atgtatcaag	960
gtttaaaagc	cgctacctac	ttttggcccc	gatcagaagt	ggctataaat	ggctcctttc	1020
cttccatata	catgccttac	aacggaagtg	tcccatttga	agagaggatt	tctacactgt	1080
taaaatggct	ggacctgccc	aaagctgaaa	gacccaggtt	ttataccatg	tattttgaag	1140
aacctgattc	ctctggacat	gcaggtggac	cagtcagtgc	cagagtaatt	aaagccttac	1200
aggtagtaga	tcatgctttt	gggatgttga	tggaaaggct	gaagcagcgg	aatttgcaac	1260
actgtgtcaa	tatcatcctt	ctggctgacc	atggaatgga	ccagacttat	tgtaacaaga	1320
tggatatacat	gactgattat	tttcccagaa	taaactctct	ctacatgtac	gaagggcctg	1380
ccccccgcat	ccgagctcat	aataacctc	atgacttttt	tagttttta	tctgaggaaa	1440
ttgttagaaa	cctcagttgc	cgaaaacctg	atcagcattt	caagccctat	ttgactcctg	1500
atttgcaaaa	gcgactgcac	tatgccaaga	acgtcagaat	cgacaaagt	catctctttg	1560
tggatcaaca	gtggctggct	gttaggagta	aatcaaatc	aaattgtgga	ggaggcaacc	1620
atgggtataa	caatgagttt	aggagcatgg	aggctatctt	tctggcacat	ggaccaggtt	1680
ttaaagagaa	gactgaagtt	gaaccatttg	aaaatatgga	agtctataac	ctaattgtgtg	1740
atcttctacg	cattcaacca	gcaccaaaca	atggaacca	tggtagttta	aacctcttc	1800
tgaaggtgcc	tttttatgag	ccatcccctg	cagaggaggt	gtcaaaagt	tctgtttgtg	1860
gctttgctaa	tccattgccc	acagagctct	ttgactgttt	ctgcccctac	ctacaaaata	1920
gtactcagct	ggaacaagtg	aatcagatgc	taaatctcac	ccaagaagaa	ataacagcaa	1980
cagtgaaagt	aaatttgcca	tttgggaggc	ctagggtact	gcagaagaac	gtggaccact	2040
gtctccttta	ccacagggaa	tatgtcagtg	gatttggaaa	agctatgagg	atgcccattg	2100
ggagttcata	cacagtcccc	cagttgggag	acacatcgcc	tctgcctccc	actgtcccag	2160
actgtctgcg	ggctgatgtc	agggttctct	ctctctgagc	ccaaaaatgt	tccttctatt	2220
tagcagacaa	gaatatcacc	cacggcttcc	tctatctctc	tgccagcaat	agaacatcag	2280
atagccaata	tgatgcttta	attactagca	atgtgtacc	tatgtatgaa	gaattcagaa	2340
aaatgtggga	ctacttccac	agtgttcttc	ttataaaaaca	tgccacagaa	agaatggag	2400
taaatgtggt	tagtggacca	atatttgatt	ataatgatga	tggccatttt	gatgtcccag	2460
atgaaattac	caaacattta	gccaacactg	atgttcccat	cccaacacac	tactttgtgg	2520
tgctgaccag	ttgtaaaaac	aagagccaca	caccggaaaa	ctgcccctggg	tggctggatg	2580
tcttaccctt	tatcatccct	caccgaccta	ccaactgtga	gagctgtcct	gaaggtaaac	2640
cagaagctct	ttgggttgaa	gaaagattta	cagctcacat	tgcccgggtc	cgatgatgag	2700
aacttctcac	tgggcttgac	ttctatcagg	ataaagtgca	gcctgtctct	gaaattttgc	2760
aactaaagac	atatttacca	acatttgaaa	ccactattta	acttaataat	gtctacttaa	2820
tataataatt	actgtataaa	gtaattttgg	caaaatataa	gtgatttttt	ctggagaatt	2880
gtaaaataaa	gttttctatt	tttctttaa	aaaaaacccg	gaattccggg	cttgggaggc	2940
tgaggcagga	gactcgcttg	aacccgggag	gcagaggttg	cagtgagcca	agattgcgcc	3000
attgcaactc	agagcctggg	tgacagagca	agactacatc	tcaaaaaata	aataaataaa	3060
ataaaaagtaa	caataaaaaat	aaaaagaaca	gcagagagaa	tgagcaagga	gaaatgtcac	3120
aaactattgc	aaaataactg	tacactgggt	tggctctcca	agaagatact	ggaatctctt	3180
cagccatttg	cttttcagaa	gtagaaacca	gcaaacacc	tctaagcggg	gaacatacga	3240
ttctttatta	agtagctctg	gggaaggaaa	gaataaaagt	tgatagctcc	ctgattggga	3300
aaaaatgcac	aattaataaa	gaatgaagat	gaaagaaagc	atgcttatgt	tgtaacacaa	3360
aaaaaattca	caaacgttgg	tggaaggaaa	acagtataga	aaacattact	ttaactaaaa	3420
gctggaaaaa	ttttcagttg	ggatgcgact	gacaaaaaga	acgggatttc	caggcataaa	3480
gttggcgtga	gctacagagg	gcaccatgtg	gctcagtgga	agacccttca	agattcaaa	3540

【表 5 8】

```

ttccatttga cagagcaaag gcacttcgca aggagaaggg tttaaattat gggtcacaaa 3600
gccaaagtgt aaagcgagca atttgcagca taactgcttc tcttagacag ggctgagtgg 3660
gcaaaatacg acagtacaca cagtgactat tagccactgc cagaaacagg ctgaacagcc 3720
ctgggagaca aggaagagca ggtggtggga gttgttcatt gagagaaagg agagttttag 3780
aaccagcaca tccactggag atgctggggc accagacccc tcccagtcaa taaagtctgg 3840
tgcctcattt gatctcagc tcatcatgac cctggagaga ccctgatacc atctgccagt 3900
ccccgacagc ttaggcactc cttgccatca acctgacccc ccgagtgggt ctccaggctc 3960
cctgccccac ccattcaggc cggaatcc 3988

```

表 LVI. 161P2F10B v.1 (配列番号 NO:98)および 161P2F10B v.7 (配列番号 NO: 99)の
ヌクレオチド 配列アライメント

スコア = 233ビット (121), 期待値 = 2e-57 同一性 = 121/121 (100%) 鎖 = プラス / プラス

10

```

v.1: 1 ctactttattctgataaaaacaggtctatgcagctaccaggacaatggaatctacgttgac 60
|||||
v.7: 1 ctactttattctgataaaaacaggtctatgcagctaccaggacaatggaatctacgttgac 60

```

```

v.1: 61 tttagcaacggaacaacacctgtaagaagaacactcttaagaaatataaaatagcttgcat 120
|||||
v.7: 61 tttagcaacggaacaacacctgtaagaagaacactcttaagaaatataaaatagcttgcat 120

```

```

v.1: 121 t 121
|
v.7: 121 t 121

```

20

スコア = 7189ビット (3739), 期待値 = 0.0 同一性 = 3739/3739 (100%) 鎖 = プラス / プラス

```

v.1: 120 ttgttcttcttgccttgctgggatcatgtcacttggattaggcctggggcttgactca 179
|||||
v.7: 250 ttgttcttcttgccttgctgggatcatgtcacttggattaggcctggggcttgactca 309

```

```

v.1: 180 ggaaactggaaaagcaaggcagctgcaggaagaagtgcctttgatgcatcatttagaggac 239
|||||
v.7: 310 ggaaactggaaaagcaaggcagctgcaggaagaagtgcctttgatgcatcatttagaggac 369

```

```

v.1: 240 tggagaactgccggtgtgatgtggcatgtaaaagaccgaggtgattgctgctgggattttg 299
|||||
v.7: 370 tggagaactgccggtgtgatgtggcatgtaaaagaccgaggtgattgctgctgggattttg 429

```

30

```

v.1: 300 aagacacctgtgtggaatcaactcgaatatggatgtgcaataaatttcgttgtggagaga 359
|||||
v.7: 430 aagacacctgtgtggaatcaactcgaatatggatgtgcaataaatttcgttgtggagaga 489

```

```

v.1: 360 ccagattagaggccagcctttgctcttgctcagatgactggttgacagaagaagattgct 419
|||||
v.7: 490 ccagattagaggccagcctttgctcttgctcagatgactggttgacagaagaagattgct 549

```

```

v.1: 420 gtgctgactataagagtgtttgccaggagaaacctcatggctggaagaaaactgtgaca 479
|||||
v.7: 550 gtgctgactataagagtgtttgccaggagaaacctcatggctggaagaaaactgtgaca 609

```

40

```

v.1: 480 cagcccagcagctctcagtgcccagaaggggttgacctgccaccagttatcttgttttcta 539
|||||
v.7: 610 cagcccagcagctctcagtgcccagaaggggttgacctgccaccagttatcttgttttcta 669

```

```

v.1: 540 tggatggatttagagctgaatatttatcacatgggatactttaatgccaaatatcaata 599
|||||
v.7: 670 tggatggatttagagctgaatatttatcacatgggatactttaatgccaaatatcaata 729

```

【 0 7 5 1】

【表 5 9】

v.1: 600 aactgaaaacatgtggaattcattcaaaaatacatgagagctatgtatcctacaaaacct 659
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 730 aactgaaaacatgtggaattcattcaaaaatacatgagagctatgtatcctacaaaacct 789

v.1: 660 tcccaaatcattacaccattgtcacgggcttgatccagagtcacatggcatcattgaca 719
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 790 tcccaaatcattacaccattgtcacgggcttgatccagagtcacatggcatcattgaca 849

v.1: 720 ataatatgtatgatgtaaatctcaacaagaatcttcaactttcttcaaaggaacaaaata 779
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 850 ataatatgtatgatgtaaatctcaacaagaatcttcaactttcttcaaaggaacaaaata 909

10

v.1: 780 atccagcctggtggcatgggcaaccaatgtggctgacagcaatgtatcaaggtttaaag 839
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 910 atccagcctggtggcatgggcaaccaatgtggctgacagcaatgtatcaaggtttaaag 969

v.1: 840 ccgctacctactttggcccggatcagaagtggctataaatggctccttccctccat 899
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 970 ccgctacctactttggcccggatcagaagtggctataaatggctccttccctccat 1029

v.1: 900 acatgccttacaacggaagtgtccatttgaagagaggatttctacactgttaaaatggc 959
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1030 acatgccttacaacggaagtgtccatttgaagagaggatttctacactgttaaaatggc 1089

20

v.1: 960 tggacctgccc aaagctgaaagaccagggtttataccatgtat tttgagaacctgatt 1019
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1090 tggacctgccc aaagctgaaagaccagggtttataccatgtat tttgagaacctgatt 1149

v.1: 1020 cctctggacatgcaggtggaccagtcagtgccagagtaattaagccttacaggtagtag 1079
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1150 cctctggacatgcaggtggaccagtcagtgccagagtaattaagccttacaggtagtag 1209

v.1: 1080 atcatgcttttgggatgtgatggaaggcctgaagcagcgaat ttcacaaactgtgtca 1139
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1210 atcatgcttttgggatgtgatggaaggcctgaagcagcgaat ttcacaaactgtgtca 1269

30

v.1: 1140 atatcatccttctggctgaccatggaatggaccagacttattgtaacaagatggaataca 1199
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1270 atatcatccttctggctgaccatggaatggaccagacttattgtaacaagatggaataca 1329

v.1: 1200 tgactgattat tttcccagaataaaacttcttctacatgtacgaaggcctgcccccgca 1259
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1330 tgactgattat tttcccagaataaaacttcttctacatgtacgaaggcctgcccccgca 1389

v.1: 1260 tccgagctcataatatacctcatgacttttttagtttaattctgaggaaatggttagaa 1319
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1390 tccgagctcataatatacctcatgacttttttagtttaattctgaggaaatggttagaa 1449

40

v.1: 1320 acctcagttgccgaaaacctgatcagcatttcaagccctatttgactcctgatttgccaa 1379
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1450 acctcagttgccgaaaacctgatcagcatttcaagccctatttgactcctgatttgccaa 1509

v.1: 1380 agcgactgcactatgccaagaacgtcagaatcgacaaagttcatctctttgtggatcaac 1439
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 v.7: 1510 agcgactgcactatgccaagaacgtcagaatcgacaaagttcatctctttgtggatcaac 1569

【 0 7 5 2 】

【表 6 1】

v.1: 2280 ttagtggaccaatatttgattataaattatgatggccatTTTgatgctccagatgaaatta 2339
 |||||
 v.7: 2410 ttagtggaccaatatttgattataaattatgatggccatTTTgatgctccagatgaaatta 2469

v.1: 2340 ccaaacatttagccaacactgatgttcccatcccaacacactactTTtgTggtgctgacca 2399
 |||||
 v.7: 2470 ccaaacatttagccaacactgatgttcccatcccaacacactactTTtgTggtgctgacca 2529

v.1: 2400 gttgtaaaaacaagagccacacaccgaaaactgCccctgggtggctggatgtcctaccct 2459
 |||||
 v.7: 2530 gttgtaaaaacaagagccacacaccgaaaactgCccctgggtggctggatgtcctaccct 2589

v.1: 2460 ttatcatccctcaccgacctaccaacgtggagagctgtcctgaaggtaaaccagaagctc 2519
 |||||
 v.7: 2590 ttatcatccctcaccgacctaccaacgtggagagctgtcctgaaggtaaaccagaagctc 2649

v.1: 2520 tttgggttgaagaagatttacagctcacattgcccgggtccgtgatgtagaacttctca 2579
 |||||
 v.7: 2650 tttgggttgaagaagatttacagctcacattgcccgggtccgtgatgtagaacttctca 2709

v.1: 2580 ctgggcttgacttctatcaggataaagtgcagcctgtctctgaaattttgcaactaaaga 2639
 |||||
 v.7: 2710 ctgggcttgacttctatcaggataaagtgcagcctgtctctgaaattttgcaactaaaga 2769

v.1: 2640 catattaccaacatttgaaaccactatTTaacttaataatgtctacttaatatataatt 2699
 |||||
 v.7: 2770 catattaccaacatttgaaaccactatTTaacttaataatgtctacttaatatataatt 2829

v.1: 2700 tactgtataaagtaattttggcaaaatataagtgatttttctggagaattgtaaaataa 2759
 |||||
 v.7: 2830 tactgtataaagtaattttggcaaaatataagtgatttttctggagaattgtaaaataa 2889

v.1: 2760 agttttctatttttcccttaaaaaaaaaaacCGgaattccgggcttgggaggctgaggcagg 2819
 |||||
 v.7: 2890 agttttctatttttcccttaaaaaaaaaaacCGgaattccgggcttgggaggctgaggcagg 2949

v.1: 2820 agactcgcttgaaccgggaggcagaggttgCagtgagccaagattgcgccattgcactc 2879
 |||||
 v.7: 2950 agactcgcttgaaccgggaggcagaggttgCagtgagccaagattgcgccattgcactc 3009

v.1: 2880 cagagcctgggtgacagagcaagactacatctcaaaaaataaataaataaaaataaaagta 2939
 |||||
 v.7: 3010 cagagcctgggtgacagagcaagactacatctcaaaaaataaataaataaaaataaaagta 3069

v.1: 2940 acaataaaaaataaaaagaacagcagagagaatgagcaaggagaaatgtcacaactattg 2999
 |||||
 v.7: 3070 acaataaaaaataaaaagaacagcagagagaatgagcaaggagaaatgtcacaactattg 3129

v.1: 3000 caaaatactgttacactgggttggctctccaagaagatactggaatctcttcagccattt 3059
 |||||
 v.7: 3130 caaaatactgttacactgggttggctctccaagaagatactggaatctcttcagccattt 3189

v.1: 3060 gcttttcagaagtagaaaccagcaaaccacctctaagcggagaacatacgattctttatt 3119
 |||||
 v.7: 3190 gcttttcagaagtagaaaccagcaaaccacctctaagcggagaacatacgattctttatt 3249

10

20

30

40

【表 6 2】

v.1: 3120 aagtagctctggggaaggaaagaataaaaagttgatagctccctgattgggaaaaaatgca 3179
 |||
 v.7: 3250 aagtagctctggggaaggaaagaataaaaagttgatagctccctgattgggaaaaaatgca 3309

v.1: 3180 caattaataaagaatgaagatgaaagaaagcatgcttatggttgtaacacaaaaaaattc 3239
 |||
 v.7: 3310 caattaataaagaatgaagatgaaagaaagcatgcttatggttgtaacacaaaaaaattc 3369

v.1: 3240 acaaacggtggggaaggaaaacagtatagaaaacattactttaactaaaagctggaaaa 3299
 |||
 v.7: 3370 acaaacggtggggaaggaaaacagtatagaaaacattactttaactaaaagctggaaaa 3429

v.1: 3300 attttcagttgggatgcgactgacaaaaagaacgggatttccaggcataaagtggcgctg 3359
 |||
 v.7: 3430 attttcagttgggatgcgactgacaaaaagaacgggatttccaggcataaagtggcgctg 3489

v.1: 3360 agctacagagggcaccatgtggctcagtggaagaccctcaagattcaaagttccatttg 3419
 |||
 v.7: 3490 agctacagagggcaccatgtggctcagtggaagaccctcaagattcaaagttccatttg 3549

v.1: 3420 acagagcaaaggcacttcgcaaggagaagggtttaaattatgggtccaaaagccaagtgg 3479
 |||
 v.7: 3550 acagagcaaaggcacttcgcaaggagaagggtttaaattatgggtccaaaagccaagtgg 3609

v.1: 3480 taaagcgagcaatttgcagcataactgcttctcctagacagggctgagtgggcaaaatac 3539
 |||
 v.7: 3610 taaagcgagcaatttgcagcataactgcttctcctagacagggctgagtgggcaaaatac 3669

v.1: 3540 gacagtacacacagtgactattagccactgccagaaacaggctgaacagccctgggagac 3599
 |||
 v.7: 3670 gacagtacacacagtgactattagccactgccagaaacaggctgaacagccctgggagac 3729

v.1: 3600 aagggaaaggcaggtgggagggtggttcattgagagaaaggagagttttagaaccagcac 3659
 |||
 v.7: 3730 aagggaaaggcaggtgggagggtggttcattgagagaaaggagagttttagaaccagcac 3789

v.1: 3660 atccactggagatgctgggccaccagaccctcccagtcaataaagtctgggtgcctcatt 3719
 |||
 v.7: 3790 atccactggagatgctgggccaccagaccctcccagtcaataaagtctgggtgcctcatt 3849

v.1: 3720 tgatctcagcctcatcatgaccctggagagaccctgataccatctgccagtccccgacag 3779
 |||
 v.7: 3850 tgatctcagcctcatcatgaccctggagagaccctgataccatctgccagtccccgacag 3909

v.1: 3780 cttagggcactccttgccatcaacctgacccccgagtggttctccaggctccctgcccc 3839
 |||
 v.7: 3910 cttagggcactccttgccatcaacctgacccccgagtggttctccaggctccctgcccc 3969

v.1: 3840 cccattcaggccggaattc 3858
 |||
 v.7: 3970 cccattcaggccggaattc 3988

10

20

30

40

表 LVII. 161P2F10B v.7 (配列番号 NO: 100)によってコードされるタンパク質のペプチド配列

MSLGLGLGLG LRKLEKQGSC RKKCFDASFR GLENCRCDDVA CKDRGDCCWD FEDTCVESTRE	60
IWMCNKFRCG ETRLEASLCS CSDDCLQRKD CCADYKSVCQ GETSWLEENC DTAQQSQCPD	120
GFDLPPVILF SMDGFRAEYL YTWDTLMPNI NKLKTCGIHS KYMRAMYPTK TFPNHYTIVT	180

【 0 7 5 5 】

【表 6 3】

GLYPESHGII	DNNMYDVNLN	KNFSLSSKEQ	MNPWWHGQP	MWLTAMYQGL	KAATYFWPGS	240
EVAINGSFPS	IYMPYNGSVP	FEERISTLLK	WLDLPAERP	RFYTMFFEEP	DSSGHAGGPV	300
SARVIKALQV	VDHAFGLME	GLKQRNLHNC	VNIILLADHG	MDQTYCNKME	YMTDYFPRIN	360
FFYMYEGPAP	RVRAHNIPHD	FFSFNSEIIV	RNLSCRKPDQ	HFKPYLTPDL	PKRLHYAKNV	420
RIDKVHLFVD	QQWLAVRSKS	NTNCGGNHG	YNNEFRSMEA	IFLAHGPSFK	EKTEVEPFEN	480
IEVYNLMCDL	LRIQPAPNNG	THGSLNHLLK	VPFYEPSHAE	EVSFKFSVCGF	ANPLPTESLD	540
CFCPHLQNST	QLEQVNQMLN	LTQEEITATV	KVNLPFGRPR	VLQKNVDHCL	LYHREYVSGF	600
GKAMRMPMWS	SYTVPQLGDT	SPLPPTVPDC	LRADVRVPPS	ESQKCSFYLA	DKNITHGFLY	660
PPASNRSDS	QYDALITSNL	VPMYEEFRKM	WDYFHSVLLI	KHATERNGVN	VVSGPIFDYN	720
YDGHFDAPDE	ITKHLANTDV	PIPTHYFVVL	TSCKNKSHTP	ENCPGWLDVL	PFIIPHRPTN	780
VESCEPGKPE	ALWVEERFTA	HIARVRDVEL	LTGLDFYQDK	VQPVSEILQL	KTYLPTFETT	840
I						841

10

表 LVIII. 161P2F10Bv.1 v.1 (配列番号 101)および 161P2F10B v.7 (配列番号 102)の
アミノ酸配列アライメント

スコア = 1789ビット(4634), 期待値 = 0.0 同一性 = 838/841 (99%), ポジティブ = 841/841 (99%)

161P2F10Bv.1: 35	MSLGLGLGLRLKLEKQGS	CRKCCFDASFR	GLENCRCDVAC	KDRGDC	CWDFEDTC	VESTR 94
	MSLGLGLGLRLKLEKQGS	CRKCCFDASFR	GLENCRCDVAC	KDRGDC	CWDFEDTC	VESTR 94
161P2F10Bv.7: 1	MSLGLGLGLRLKLEKQGS	CRKCCFDASFR	GLENCRCDVAC	KDRGDC	CWDFEDTC	VESTR 60
161P2F10Bv.1: 95	IWMCNKFRCGETRLEAS	LCSCSDDCLQK	KDCCADYKSV	CQGETSWLE	ENCDTAQ	SQCPE 154
	IWMCNKFRCGETRLEAS	LCSCSDDCLQ+	KDCCADYKSV	CQGETSWLE	ENCDTAQ	SQCPE 154
161P2F10Bv.7: 61	IWMCNKFRCGETRLEAS	LCSCSDDCLQR	KDCCADYKSV	CQGETSWLE	ENCDTAQ	SQCPE 120
161P2F10Bv.1: 155	GFDLPPVILFSDMGFRAE	YLYTWDITLMP	NINKLKT	CGIHSKY	MRAMYPT	KTFPNHYTIVT 214
	GFDLPPVILFSDMGFRAE	YLYTWDITLMP	NINKLKT	CGIHSKY	MRAMYPT	KTFPNHYTIVT 214
161P2F10Bv.7: 121	GFDLPPVILFSDMGFRAE	YLYTWDITLMP	NINKLKT	CGIHSKY	MRAMYPT	KTFPNHYTIVT 180
161P2F10Bv.1: 215	GLYPESHGII	DNNMYDVNLN	KNFSLSSKEQ	MNPWWHGQP	MWLTAMYQGL	KAATYFWPGS 274
	GLYPESHGII	DNNMYDVNLN	KNFSLSSKEQ	MNPWWHGQP	MWLTAMYQGL	KAATYFWPGS 274
161P2F10Bv.7: 181	GLYPESHGII	DNNMYDVNLN	KNFSLSSKEQ	MNPWWHGQP	MWLTAMYQGL	KAATYFWPGS 240
161P2F10Bv.1: 275	EVAINGSFPS	IYMPYNGSVP	FEERISTLLK	WLDLPAERP	RFYTMFFEEP	DSSGHAGGPV 334
	EVAINGSFPS	IYMPYNGSVP	FEERISTLLK	WLDLPAERP	RFYTM+FEEP	DSSGHAGGPV 334
161P2F10Bv.7: 241	EVAINGSFPS	IYMPYNGSVP	FEERISTLLK	WLDLPAERP	RFYTMFFEEP	DSSGHAGGPV 300
161P2F10Bv.1: 335	SARVIKALQV	VDHAFGLME	GLKQRNLHNC	VNIILLADHG	MDQTYCNKME	YMTDYFPRIN 394
	SARVIKALQV	VDHAFGLME	GLKQRNLHNC	VNIILLADHG	MDQTYCNKME	YMTDYFPRIN 394
161P2F10Bv.7: 301	SARVIKALQV	VDHAFGLME	GLKQRNLHNC	VNIILLADHG	MDQTYCNKME	YMTDYFPRIN 360
161P2F10Bv.1: 395	FFYMYEGPAPRI	RAHNIPHD	FFSFNSEIIV	RNLSCRKPDQ	HFKPYLTPDL	PKRLHYAKNV 454
	FFYMYEGPAPR+	RAHNIPHD	FFSFNSEIIV	RNLSCRKPDQ	HFKPYLTPDL	PKRLHYAKNV 454
161P2F10Bv.7: 361	FFYMYEGPAPR	RAHNIPHD	FFSFNSEIIV	RNLSCRKPDQ	HFKPYLTPDL	PKRLHYAKNV 420
161P2F10Bv.1: 455	RIDKVHLFVD	QQWLAVRSKS	NTNCGGNHG	YNNEFRSMEA	IFLAHGPSFK	EKTEVEPFEN 514
	RIDKVHLFVD	QQWLAVRSKS	NTNCGGNHG	YNNEFRSMEA	IFLAHGPSFK	EKTEVEPFEN 514
161P2F10Bv.7: 421	RIDKVHLFVD	QQWLAVRSKS	NTNCGGNHG	YNNEFRSMEA	IFLAHGPSFK	EKTEVEPFEN 480
161P2F10Bv.1: 515	IEVYNLMCDLL	LRIQPAPNNG	THGSLNHLLK	VPFYEPSHAE	EVSFKFSV	CGFANPLPTESLD 574
	IEVYNLMCDLL	LRIQPAPNNG	THGSLNHLLK	VPFYEPSHAE	EVSFKFSV	CGFANPLPTESLD 574
161P2F10Bv.7: 481	IEVYNLMCDLL	LRIQPAPNNG	THGSLNHLLK	VPFYEPSHAE	EVSFKFSV	CGFANPLPTESLD 540
161P2F10Bv.1: 575	CFCPHLQNST	QLEQVNQMLN	LTQEEITATV	KVNLPFGRPR	VLQKNVDHCL	LYHREYVSGF 634
	CFCPHLQNST	QLEQVNQMLN	LTQEEITATV	KVNLPFGRPR	VLQKNVDHCL	LYHREYVSGF 634
161P2F10Bv.7: 541	CFCPHLQNST	QLEQVNQMLN	LTQEEITATV	KVNLPFGRPR	VLQKNVDHCL	LYHREYVSGF 600
161P2F10Bv.1: 635	GKAMRMPMWS	SYTVPQLGDT	SPLPPTVPDC	LRADVRVPPS	ESQKCSFY	LADKNITHGFLY 694
	GKAMRMPMWS	SYTVPQLGDT	SPLPPTVPDC	LRADVRVPPS	ESQKCSFY	LADKNITHGFLY 694
161P2F10Bv.7: 601	GKAMRMPMWS	SYTVPQLGDT	SPLPPTVPDC	LRADVRVPPS	ESQKCSFY	LADKNITHGFLY 660
161P2F10Bv.1: 695	PPASNRSDS	QYDALITSNL	VPMYEEFRKM	WDYFHSVLLI	KHATERNGVN	VVSGPIFDYN 754
	PPASNRSDS	QYDALITSNL	VPMYEEFRKM	WDYFHSVLLI	KHATERNGVN	VVSGPIFDYN 754
161P2F10Bv.7: 661	PPASNRSDS	QYDALITSNL	VPMYEEFRKM	WDYFHSVLLI	KHATERNGVN	VVSGPIFDYN 720
161P2F10Bv.1: 755	YDGHFDAPDE	ITKHLANTDV	PIPTHYFVVL	TSCKNKSHTP	ENCPGWLDVL	PFIIPHRPTN 814
	YDGHFDAPDE	ITKHLANTDV	PIPTHYFVVL	TSCKNKSHTP	ENCPGWLDVL	PFIIPHRPTN 814

20

30

40

【表 6 4】

161P2F10Bv.7: 721 YDGHFDAPDEITKHLANTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHSTPENCPGWLVDVLPFIIPHRPTN 780
 161P2F10Bv.1: 815 VESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVVELLTGLDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETT 874
 VESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVVELLTGLDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETT
 161P2F10Bv.7: 781 VESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVVELLTGLDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETT 840
 161P2F10Bv.1: 875 I 875
 I
 161P2F10Bv.7: 841 I 841

表 LIX: 腎臓癌における 161P2F10B の発現

10

RNA

分析:

明細胞	乳頭状色素嫌性移行膨大細胞腫			
	e	l		
33/34 (97%)	16/19 (84%)	2/3 (67%)	3/7 (42%)	0/3 (0%)

タンパク質

分析:

明細胞	乳頭状色素嫌性移行膨大細胞腫			
	e	l		
12/12 (100%)	5/5 (100%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)

20

表 LX: 正常組織における 161P2F10B タンパク質発現

組織	頻度
腎臓	5/5
前立腺	4/8
膀胱	1/4*
結腸	2/5*
肺	1/4*
脳	0/1
胸部	0/2
心臓	0/1
肝臓	0/3
卵巣	0/1
膵臓	0/2
胎盤	0/1
皮膚	0/1
脾臓	0/1
精巣	0/4
胸腺	0/1
子宮	0/1

30

【図面の簡単な説明】

40

【0757】

【図1】182ヌクレオチドの161P2F10B SSH配列。

【図2A-1】161P2F10B 改変体1 (「161P2F10B v.1」または「161P2F10B 改変体1」とも呼ばれる)のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Aに示す。開始メチオニンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44~2671にまたがる。

【図2A-2】161P2F10B 改変体1 (「161P2F10B v.1」または「161P2F10B 改変体1」とも呼ばれる)のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Aに示す。開始メチオニンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44~2671にまたがる。

50

【図2A-3】161P2F10B 改変体1（「161P2F10B v.1」または「161P2F10B 改変体1」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Aに示す。開始メチオニンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

【図2A-4】161P2F10B 改変体1（「161P2F10B v.1」または「161P2F10B 改変体1」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Aに示す。開始メチオニンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

【図2B-1】161P2F10B 改変体2（「161P2F10B v.2」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Bに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

10

【図2B-2】161P2F10B 改変体2（「161P2F10B v.2」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Bに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

【図2B-3】161P2F10B 改変体2（「161P2F10B v.2」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Bに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

20

【図2C-1】161P2F10B 改変体3（「161P2F10B v.3」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Cに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

【図2C-2】161P2F10B 改変体3（「161P2F10B v.3」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Cに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

【図2C-3】161P2F10B 改変体3（「161P2F10B v.3」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Cに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

30

【図2D-1】161P2F10B 改変体4（「161P2F10B v.4」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Dに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

【図2D-2】161P2F10B 改変体4（「161P2F10B v.4」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Dに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

40

【図2D-3】161P2F10B 改変体4（「161P2F10B v.4」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Dに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

【図2E-1】161P2F10B 改変体5（「161P2F10B v.5」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Eに示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸44～2671にまたがる。

【図2E-2】161P2F10B 改変体5（「161P2F10B v.5」とも呼ばれる）のcDNA配列およびアミノ酸配列を、図2Eに示す。開始メチオニンに対するコ

50

ドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸 4 4 ~ 2 6 7 1 にまたがる。

【図 2 E - 3】1 6 1 P 2 F 1 0 B 改変体 5 (「1 6 1 P 2 F 1 0 B v . 5」とも呼ばれる)の c D N A 配列およびアミノ酸配列を、図 2 E に示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸 4 4 ~ 2 6 7 1 にまたがる。

【図 2 F - 1】1 6 1 P 2 F 1 0 B 改変体 6 (「1 6 1 P 2 F 1 0 B v . 6」とも呼ばれる)の c D N A 配列およびアミノ酸配列を、図 2 F に示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸 8 4 ~ 2 7 1 1 にまたがる。

10

【図 2 F - 2】1 6 1 P 2 F 1 0 B 改変体 6 (「1 6 1 P 2 F 1 0 B v . 6」とも呼ばれる)の c D N A 配列およびアミノ酸配列を、図 2 F に示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸 8 4 ~ 2 7 1 1 にまたがる。

【図 2 F - 3】1 6 1 P 2 F 1 0 B 改変体 6 (「1 6 1 P 2 F 1 0 B v . 6」とも呼ばれる)の c D N A 配列およびアミノ酸配列を、図 2 F に示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸 8 4 ~ 2 7 1 1 にまたがる。

【図 2 G - 1】1 6 1 P 2 F 1 0 B 改変体 7 (「1 6 1 P 2 F 1 0 B v . 7」とも呼ばれる)の c D N A 配列およびアミノ酸配列を、図 2 F に示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸 2 7 6 ~ 2 8 0 1 にまたがる。

20

【図 2 G - 2】1 6 1 P 2 F 1 0 B 改変体 7 (「1 6 1 P 2 F 1 0 B v . 7」とも呼ばれる)の c D N A 配列およびアミノ酸配列を、図 2 F に示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸 2 7 6 ~ 2 8 0 1 にまたがる。

【図 2 G - 3】1 6 1 P 2 F 1 0 B 改変体 7 (「1 6 1 P 2 F 1 0 B v . 7」とも呼ばれる)の c D N A 配列およびアミノ酸配列を、図 2 F に示す。開始メチオニンに対するコドンに下線を付す。このオープンリーディングフレームは、停止コドンを含め、核酸 2 7 6 ~ 2 8 0 1 にまたがる。

30

【図 3 A】1 6 1 P 2 F 1 0 B V . 1 のアミノ酸配列が図 3 A に示される；これは 8 7 5 アミノ酸を有する。

【図 3 B】1 6 1 P 2 F 1 0 B V . 2 のアミノ酸配列が図 3 B に示される；これは 8 7 5 アミノ酸を有する。

【図 3 C】1 6 1 P 2 F 1 0 B V . 3 のアミノ酸配列が図 3 C に示される；これは 8 7 5 アミノ酸を有する。

【図 3 D】1 6 1 P 2 F 1 0 B V . 4 のアミノ酸配列が図 3 D に示される；これは 8 7 5 アミノ酸を有する。

【図 3 E】1 6 1 P 2 F 1 0 B V . 7 のアミノ酸配列が図 3 E に示される；これは 8 4 1 アミノ酸を有する。本明細書中で使用される場合、1 6 1 P 2 F 1 0 B に対する参照は、その全ての改変体を含み、これは、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、図 2、図 3、図 1 0、および図 1 1 に示される改変体を含む。

40

【図 4 A】図 4 A：K から R の変異を保有する改変体 1 を有する 1 6 1 P 2 F 1 0 のアライメント。

【図 4 B】図 4 B：T から P の変異を保有する 1 6 1 P 2 F 1 0 B 改変体および S N P 改変体のアライメント。

【図 5】E x P a s y 分子生物学サーバを通したワールドワイドウェブ(. e x p a s y . c h / c g i - b i n / p r o t s c a l e . p l) に位置する P r o t S c a l e ウェブサイト上でアクセスされる H o p p および W o o d s の方法 (H o p p T . P . , W o o d s K . R . , 1 9 8 1 . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A

50

. 78 : 3824 - 3828) を用いてコンピュータアルゴリズム配列分析によって決定した、161P2F10Bの親水性アミノ酸プロフィール。

【図6】ExPasy分子生物学サーバを通してワールドワイドウェブ(.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)に位置するProtScaleウェブサイトでアクセスされるKyteおよびDoolittleの方法(Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132)を用いたコンピュータアルゴリズム配列分析によって決定した、161P2F10Bのヒドロパシーアミノ酸プロフィール。

【図7】ExPasy分子生物学サーバを通してワールドワイドウェブ(.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)に位置するProtScaleウェブサイトでアクセスされるJaninの方法(Janin J., 1979 Nature 277:491-492)を用いてコンピュータアルゴリズム配列分析によって決定した、161P2F10Bのパーセント接触可能残基アミノ酸プロフィール。

【図8】ExPasy分子生物学サーバを通してワールドワイドウェブ(.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)に位置するProtScaleウェブサイトでアクセスされるBhaskaranおよびPonnuswamyの方法(Bhaskaran R., およびPonnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255)を用いてコンピュータアルゴリズム配列分析によって決定した、161P2F10Bの平均可焼性アミノ酸プロフィール。

【図9】ExPasy分子生物学サーバを通してワールドワイドウェブ(.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)に位置するProtScaleウェブサイトでアクセスしたDeleageおよびRouxの方法(Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1:289-294)を用いてコンピュータアルゴリズム配列分析によって決定した、161P2F10Bの - ターンアミノ酸プロフィール。

【図10】改変体161P2F10Bv. 2~改変体161P2F10Bv. 5は、単一のヌクレオチド差を有する改変体である。これらのSNP改変体を別々に示すが、それらはまた、その塩基対を含む任意の組み合わせおよび任意の転写改変体において生じ得る。改変体161P2F10Bv. 6および改変体161P2F10Bv. 7は、転写改変体である。改変体161P2F10Bv. 6は、5'末端に余分の40塩基を有し、異なる3'末端部分を有し、一方、改変体161P2F10Bv. 7は、161P2F10Bv. 1の121位と122位との間に130塩基対の挿入を有する。「(白四角)」の数字は、161P2F10Bv. 1の数字に対応する。黒四角は、161P2F10Bv. 1と同じ配列を示す。SNPは、四角で上に示される。

【図11】タンパク質改変体は、ヌクレオチド改変体に対応する。図10におけるヌクレオチド改変体161P2F10Bv. 5および161P2F10Bv. 6は、161P2F10Bv. 1と同じタンパク質をコードする。ヌクレオチド改変体161P2F10Bv. 6およびヌクレオチド改変体161P2F10Bv. 7は、図12に示されるv. 1のsprays改変体である。単一のアミノ酸差は、四角で上に示した。黒四角は、161P2F10Bv. 1と同じ配列を示す。四角の下の数字は、161P2F10Bv. 1に対応する。

【図12】タンパク質改変体は、ヌクレオチド改変体に対応する。図10におけるヌクレオチド改変体161P2F10Bv. 5および161P2F10Bv. 6は、161P2F10Bv. 1と同じタンパク質をコードする。ヌクレオチド改変体161P2F10Bv. 6およびヌクレオチド改変体161P2F10Bv. 7は、v. 1のsprays改変体である(図中省略する)。単一のアミノ酸差は、四角で上に示した。黒四角は、161P2F10Bv. 1と同じ配列を示す。四角の下の数字は、161P2F10Bv. 1に対応する。

【図13A】161P2F10Bの二次構造(配列番号103)、すなわちヘリックス

10

20

30

40

50

、伸長ストランド、およびランダムコイルの推定された存在および位置を、(ワールドワイドウェブの .expasy.ch/tools/) の ExPasy 分子生物学サーバからアクセスした、HNN-Hierarchical Neural Network 法 (Guermeur, 1997, http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa__automat.pl?page=npsa_nn.html のワールドワイドウェブ上) を用いて一次アミノ酸配列から推定した。この分析は、161P2F10B が、31.31% のヘリックス、11.31% の伸長ストランド、および 57.37% のランダムコイルで構成することを示す (図 13)。膜貫通ドメインの位置を示す TMpred (図 13) 推定プログラムおよび TMHMM (図 13C) 推定プログラムを用いた分析の結果は、図 13 のパネル B および C に示される。

10

【図 13 B】161P2F10B の二次構造 (配列番号 103)、すなわちヘリックス、伸長ストランド、およびランダムコイルの推定された存在および位置を、(ワールドワイドウェブの .expasy.ch/tools/) の ExPasy 分子生物学サーバからアクセスした、HNN-Hierarchical Neural Network 法 (Guermeur, 1997, http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa__automat.pl?page=npsa_nn.html のワールドワイドウェブ上) を用いて一次アミノ酸配列から推定した。この分析は、161P2F10B が、31.31% のヘリックス、11.31% の伸長ストランド、および 57.37% のランダムコイルで構成することを示す (図 13)。膜貫通ドメインの位置を示す TMpred (図 13) 推定プログラムおよび TMHMM (図 13C) 推定プログラムを用いた分析の結果は、図 13 のパネル B および C に示される。

20

【図 13 C】161P2F10B の二次構造 (配列番号 103)、すなわちヘリックス、伸長ストランド、およびランダムコイルの推定された存在および位置を、(ワールドワイドウェブの .expasy.ch/tools/) の ExPasy 分子生物学サーバからアクセスした、HNN-Hierarchical Neural Network 法 (Guermeur, 1997, http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa__automat.pl?page=npsa_nn.html のワールドワイドウェブ上) を用いて一次アミノ酸配列から推定した。この分析は、161P2F10B が、31.31% のヘリックス、11.31% の伸長ストランド、および 57.37% のランダムコイルで構成することを示す (図 13)。膜貫通ドメインの位置を示す TMpred (図 13) 推定プログラムおよび TMHMM (図 13C) 推定プログラムを用いた分析の結果は、図 13 のパネル B および C に示される。

30

【図 14】第一鎖 cDNA を、正常な胃、正常な脳、正常な心臓、正常な肝臓、正常な骨格筋、正常な精巣、正常な前立腺、正常な膀胱、正常な腎臓、正常な結腸、正常な肺、正常な膵臓、および前立腺癌患者、膀胱癌患者、腎臓癌患者、結腸癌患者、肺癌患者、膵臓癌患者からの癌種のプール、前立腺癌異種移植片 (LAPC-4AD、LAPC-4AI、LAPC-9AD および LAPC-9AI) のプール、ならびに 2 人の患者のリンパ節への前立腺癌転移物のプールから作製した。標準化をアクチンに対するプライマーを用いる PCR によって実施した。161P2F10B に対するプライマーを用いる半定量的 PCR を、26 および 30 の増幅サイクルで実施した。サンプルをアガロースゲル上に走らせ、PCR 産物を AlphaImager ソフトウェアを用いて定量した。結果は、試験した全ての正常な組織と比較して、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、結腸癌、肺癌、膵臓癌、骨癌、リンパ腫癌、卵巣癌において強い発現を示した。強い発現をまた、異種移植片プールおよびリンパ節への前立腺癌転移物試料において検出した。

40

【図 15】第 1 鎖 cDNA を、明瞭な腎臓癌細胞癌試料のパネル (A)、腎臓癌乳頭状癌試料のパネル (B) から、および子宮癌患者癌試料のパネル (C) において調製した。アクチンに対するプライマーを用いた PCR によって、標準化を行った。161P2F10B に対するプライマーを用いた半定量的 PCR を、増幅の 26 サイクル目および 30 サイクル目で行った。サンプルをアガロースゲル上に走らせ、PCR 産物を AlphaImager ソフトウェアを用いて定量した。発現を、無、低、中または強として記録した。結果

50

は、94.7%の透明な細胞腎臓癌腫、62.5%の乳頭状腎臓細胞癌腫、および61.5%の子宮癌において161P2F10Bの発現を示す。

【図16】図16は、3T3-161P2F10B安定細胞のホスホジエステラーゼ活性を示す。細胞表面ホスホジエステラーゼ活性を、基質p-ニトロフェニルチミジン-5'-L-モノホスフェートを用いて3T3および3T3-161P2F10Bに対してアッセイする。

【図17】図17は、161P2F10Bによるアポトーシスからの保護を示す。

【図18】図18は、161P2F10Bがアポトーシスシグナルから保護することを示す。

【図19】図19は、161P2F10Bが、スタウロスポリンおよびUV誘導性アポトーシスから保護することを示す。

【図20】図20は、161P2F10B発現が、薬物およびUV誘導性アポトーシスから細胞を保護することを示す。NIH 3T3細胞を、スタウロスポリンまたはUVで処理し、Annexin V-FITCおよびヨウ化プロピジウムにて染色し、そしてFACSにより分析した。

【図21】図21は、161P2F10Bが、化学療法剤によるアポトーシスから保護することを示す。

【図22】図22は、インビトロ浸潤に対する161P2F10Bの効果を示す。浸潤を、全体の細胞集団に対する低チャンパーにおける細胞の蛍光を測定することにより決定した。

【図23】図23は、161P2F10B MA bが、SCIDマウスにおけるヒト腎臓癌異種移植片の増殖を弱めることを示す。

【図24】腎臓癌患者種における免疫組織化学による161P2F10Bタンパク質の検出。2つの腎臓の明瞭な細胞癌腫組織試料および1つの腎臓乳頭状細胞癌腫を、3人の異なる腎臓癌患者から得た。凍結した組織を、4ミクロンの切片に切り、そして10分間アセトンで固定した。次いで、この切片をマウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)を用いて3時間インキュベートした。スライドを緩衝液で3回洗浄し、さらにDAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)で1時間インキュベートした。次いで、この切片を緩衝液で洗浄し、DABキット(Sigma Chemicals)を用いて現像し、ヘマトキシリンを用いて対比染色し、そして明視野顕微鏡により分析した。結果は、3人の患者の腎臓癌腫組織の全てにおいて161P2F10Bの強い発現を示した(図24パネルA~C)。この発現は、明瞭な腎細胞癌腫試料中の大部分の丸い細胞膜を検出し、このことは、161P2F10Bは、この腎臓癌において、および細胞末梢に向かって明らかな素因を有する乳頭状細胞癌腫中の細胞全体にわたって膜に結合していることを示す。

【図25】前立腺癌患者試料における免疫組織化学による161P2F10Bタンパク質の検出。前立腺癌の組織試料を、8人の異なる前立腺癌患者から得た。凍結した組織を、4ミクロンの切片に切り、そして10分間アセトンで固定した。次いで、この切片をマウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)を用いて3時間インキュベートした。スライドを緩衝液で3回洗浄し、さらにDAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)で1時間インキュベートした。次いで、この切片を緩衝液で洗浄し、DABキット(SIGMA Chemicals)を用いて現像し、ヘマトキシリンを用いて対比染色し、そして明視野顕微鏡により分析した。結果は、8人のうちの6人の患者の前立腺癌腫組織において161P2F10Bの発現を示した(このうちの1つを、この図25において示す)。161P2F10Bを、明らかな管腔細胞表面に向かう傾向を有する腫瘍細胞上で発現した。

10

20

30

40

50

【図26】結腸癌患者試料における免疫組織化学による161P2F10Bタンパク質の検出。結腸腺癌の組織試料を、9人の異なる結腸癌患者から得た。凍結した組織を、4ミクロンの切片に切り、そして10分間アセトンで固定した。次いで、この切片をマウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)を用いて3時間インキュベートした。スライドを緩衝液で3回洗浄し、さらにDAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)で1時間インキュベートした。次いで、この切片を緩衝液で洗浄し、DABキット(SIGMA Chemicals)を用いて現像し、ヘマトキシリンを用いて対比染色し、そして明視野顕微鏡により分析した。結果は、9人のうちの2人の患者の結腸癌腫組織において161P2F10Bの強い発現を示した(このうちの1つを、この図26において示す)。161P2F10Bは、管腔細胞表面を有する腫瘍細胞上で最も強く発現したが、また、全ての腫瘍組織全体で発現した。

10

【図27】マウスモノクローナル抗体の特異的結合による、明瞭な腎臓癌患者試料における161P2F10Bタンパク質発現の免疫組織化学による検出。明瞭な腎臓細胞癌腫組織およびその適合した正常隣接組織を、腎臓癌患者から得た。凍結した組織を、4ミクロンの切片に切り、そして10分間アセトンで固定した。次いで、この切片をマウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)(図27パネルA、D)、またはマウスモノクローナル抗体X41(3)50(図27パネルB、E)あるいはマウスモノクローナル抗体X41(3)37(図27パネルC、F)のいずれかを用いて3時間インキュベートした。スライドを緩衝液で3回洗浄し、さらにDAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)で1時間インキュベートした。次いで、この切片を緩衝液で洗浄し、DABキット(Sigma Chemicals)を用いて現像し、ヘマトキシリンを用いて対比染色し、そして明視野顕微鏡により分析した(図27パネルA~F)。結果は、腎臓明細胞癌腫患者組織において161P2F10Bの強い発現を示したが(図27パネルA~C)、正常腎臓では弱い(図27パネルD~F)ことを示した。この発現は、主に末梢細胞周辺で優先的であり、このことは、161P2F10Bは、腎臓癌組織において膜に結合していることを示す。正常腎臓において検出された弱い発現は、腎臓近位管に局在化していた。

20

30

【図28】組換え細胞株における161P2F10bの発現。16P2F10bまたはコントロールベクター(neo)のいずれかを安定に発現するラット1細胞、NIH3T3細胞、NSO細胞、および300.19細胞を、PE結合体化抗CD203cMAbにて染色し、そしてフローサイトメトリーにより試験した。(明るい破線:コントロールneo細胞。暗い線:161P2F10細胞。)ラット1細胞、NIH3T3細胞、NSO細胞、300.19細胞、およびUT7細胞を、PE結合体化抗CD203cMAbまたはコントロールIgG1-PE Abのいずれかにて染色し、そしてフローサイトメトリーにより試験した。(明るい破線:コントロールMAb。暗い線:97A6(CD203c)MAb。)コントロールおよび161P2F10b細胞の染色の平均蛍光およびその値の比を示す。これを使用して、161P2F10bの比発現レベルについての細胞をランク付けする。組換え細胞の相対的細胞表面ホスホジエステラーゼ酵素活性を、p-ニトロフェニルチミジン-5'-L-モノホスフェート(p-nTMP)ホスホジエステラーゼ基質の付加により測定した。フローサイトメトリーにより決定された発現レベルと表面酵素活性との間には相関がある。

40

【図29】161P2F10bの表面発現およびホスホジエステラーゼ活性。161P2F10bトランスフェクト293T細胞を、市販の(Coulter-Immunotech)PE結合体化抗CD203cMAb、市販の抗ENPP3(161P2F10b)MAbを用いて染色し、そして蛍光顕微鏡により試験した。161P2F10bの表面発現およびホスホジエステラーゼ活性。161P2F10bトランスフェクト293T細胞およびベクタートランスフェクト293T細胞を、ホスホジエステラーゼ-1比色基質p

50

- ニトロフェニルチミジン - 5' - L - モノホスフェート (p - n T M P) を含むアッセイ緩衝液中でインキュベートし、そして光学密度 (O . D .) を 405 nm で得た。

【図30】組換え C a k i 腎臓癌細胞における 161P2F10b 変異体の相対発現および酵素活性。C a k i 腎臓癌細胞を、野生型 161P2F120b c D N A、またはアミノ酸 205 におけるトレオニンからセリンへの変異 (T / S)、アミノ酸 205 におけるトレオニンからアラニンへの変異 (T / A)、もしくはアミノ酸 80 におけるアスパラギン酸からグルタミン酸への変異 (D / E) のいずれかをコードする点変異体 c D N A のいずれかを含有レトロウイルスに感染させた。安定発現細胞株を、161P2F10b 発現について 97A6 (C D 203c) M A b (A) を用いたフローサイトメトリーによって、そして酵素活性について p - n T M P 基質 (B) を用いたフローサイトメトリーによって分析した。トレオニン 205 からアスパラギン酸またはアラニンへの変異は、この基質を切断する能力をなくし、このことは、トレオニン 205 が、161P2F10b の酵素活性にとって重要であることを実証する。

10

【図31】161P2F10b の細胞外ドメイン (E C D) をコードする組換えタンパク質の精製。293T細胞を、161P2F10b (アミノ酸 46 ~ 875) の E C D をコードする T a g 5 分泌発現ベクターでトランスフェクトした。この組換えタンパク質を、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (示さず) または抗 161P2F10b M A b X 41.6 を含む免疫アフィニティークラム (示す) のいずれかを用いて、馴化培地から精製した。2 μ l の 2 つの別個の精製ロットを、S D S - P A G E およびクーマシー染色によって分析した。B S A タンパク質もまた、定量標準として分析した。

20

【図32】P - ニトロフェニル - チミジンモノホスフェート (p - n T M P) を利用する 161P2F10b 酵素アッセイ。A . 可溶性黄色産物を生成する p - n T M P 基質の酵素的切断を示す、比色酵素アッセイの模式図。B . p - n T M P (2 . 5 m M) に対する、精製された T a g 5 - E C D 161P2F10b タンパク質の酵素作用の速度および用量応答。反応物の光学密度 (O D) を、405 nm で決定した。C . 161P2F10b 発現 R a t 1 細胞の細胞表面酵素アッセイ。示された数の R a t 1 - 161P2F10b 細胞を p - n T M P 基質とともにインキュベートし、そしてこのウェルの O D を決定した。D . A T P および N A D (示さず) は、p - n T M P の 161P2F10b 切断の競合的インヒビターとして作用した。精製された T a g 5 - E C D タンパク質 (20 n g) を、示した量の A T P の非存在下または存在下で p - n T M P 基質とともにインキュベートした。反応物の O D を、405 nm にて得た。

30

【図33】抗 161P2F10b M A b X 41.6 のインターナリゼーションの分析。パネル A . このプロトコルの模式図。R a t 1 - 161P2F10b 細胞を、抗 161P2F10b M A b とともに 4 C でインキュベートし、洗浄し、次いで 4 C で保持してから抗マウス I g G 二次 P E 結合体化 A b で 4 C にて染色する (B、総表面染色) か、または 37 C に種々の時間にわたって移し、次いで二次 A b で 4 C にて染色する (C、残りの表面染色) かのいずれかとする。パネル B およびパネル C は、表面 161P2F10b の M A b X 41.6 係合が、平均蛍光強度 (M F I) における徐々の減少によって示される、37 C での複合体のインターナリゼーションを引き起こすことを実証する。

【図34】選択された抗 161P2F10b マウス M A b のインターナリゼーション。フローサイトメトリーによる選択された抗 161P2F10b M A b のインターナリゼーションを示す。インターナリゼーションを、4 C で染色した細胞に対する、37 C に移した細胞の平均蛍光強度 (M F I) における減少によって示す。

40

【図35】161P2F10b の抗体係合は、そのインターナリゼーションをもたらす。市販の M A b 97A6、抗 C D 203c のインターナリゼーションは、R a t 1 - 161P2F10b 細胞の染色後の蛍光顕微鏡法によって示される。この細胞を C D 203c - P E 結合体化 M A b とともに 4 C でインキュベートし、洗浄し、次いで示した時間にわたって 37 C に移し、次いで蛍光顕微鏡法によって検査した。4 C では、この細胞の染色は、細胞表面 (個々の細胞の周囲の蛍光の明るい八口) である。37 C に移すと、表面上の点状の領域への M A b のキャッピングに付随した表面蛍光の徐々の減少、続いて点状で

50

かつ拡散した細胞内蛍光の出現および表面蛍光の全体的減少が存在する。

【図36】Caki-161P2F10b細胞に対するX41.50 MA b - サポリン毒素結合体の影響。示すのは、示した濃度のインターナライズ抗161P2F10b MA bおよび抗マウスIgG - サポリン毒素二次Ab (2 μg/ml)で処理したかまたは処理していない、Caki-161P2F10b細胞の形態である。サポリンは、それ自体では、細胞に効率的に入ることができず、その毒性機構(タンパク質合成阻害)が作用するにはインターナライズされなければならない。細胞を、4Cにて、X41.50 MA bとともに最初にインキュベートして表面に結合させ、次いで、培地またはサポリン結合体化二次Abのいずれかを添加し、そしてこれらの細胞を37Cにて72時間にわたってインキュベートした。培地単独、X41.50単独、または二次サポリンAb単独のいずれかとともにインキュベートした細胞は、生存可能なコンフルエントの単層によって例示されるように、Caki-161P2F10bの増殖および形態に対して影響を有さなかった。しかし、X41.50 MA b (2 μg/mlおよび0.5 μg/ml)および二次サポリン結合体とともにインキュベートした細胞は、増殖阻害の兆候(コンフルエンスに達しなかった)およびアポトーシスの兆候(付着した細胞層上の小さな丸い浮遊アポトーシス細胞)を示した。このことは、抗161P2F10b MA b s薬物/毒素結合体の、161P2F10bを発現する癌および罹病組織についての治療アプローチとしての有用性を実証する。

10

【図37】MA b X41.50による161P2F10タンパク質のインターナライゼーション媒介ダウンレギュレーション。Rat1-161P2F10b細胞を、10 μg/mlのMA b X41.50を伴って、または伴わずに、72時間にわたってインキュベートした。細胞を洗浄し、固定し、透過性にし、そしてPE結合体化CD203c MA bで染色して、総161P2F10bタンパク質発現をモニタリングした。このデータは、この細胞をX41.50で処理した後の、染色における顕著な減少を示し、このことは、161P2F10bタンパク質のダウンレギュレーションを実証する。

20

【図38】抗161P2F10b MA bは、表面161P2F10b酵素活性をダウンレギュレートする。Rat1-161P2F10b細胞を、種々の濃度の示したMA bを用いて、および用いずに48時間にわたって処理し、次いでp-n-TMB基質を用いて表面酵素活性についてアッセイした。このデータは、MA bによる表面161P2F10bの係合およびインターナライゼーションが、表面161P2F10b酵素活性の付随した減少をもたらすことを実証する。

30

【図39】マウス161P2F10b MA bの特徴付け。示すのは、161P2F10bを認識するMA bの種々の特徴のまとめである。MA bの相対親和性を、組換えTag5-EC Dタンパク質を用いた飽和結合ELISAによって決定した。結合反応のKdを、データの1部位結合非線形回帰分析を用い、GraphPad Prismソフトウェアバージョン3.02 (Graphpad Software, San Diego, CA)を用いて決定した。相対表面染色を、RAT1-161P2F10b細胞に対して、10 μg/mlの各MA bを用いて決定した。4Cでの10 μg/mlのMA bを用いた染色と、37Cにて30分間のインキュベーション後の残りの染色とを比較する、相対インターナライズ能力もまた、Rat1-161P2F10b細胞について行った。MA bが表面酵素活性をダウンレギュレートする能力を、72時間にわたる10 μg/mlの各MA bを用いたRat1-161P2F10b細胞のインキュベーション、次いでp-nTMP基質を用いた表面酵素活性のアッセイによって決定した。相対特異的免疫組織化学的染色(IHC)を、161P2F10bを発現する凍結切片の腎臓明細胞癌腫サンプルに対して、10 μg/mlの各MA bを用いて決定した。このエピトープファミリーを、Tag5-EC Dタンパク質を標的として用いる競合結合ELISAによって決定した。Tag5-EC D ELISAでコーティングしたウェルを、10 μg/mlの競合物MA bとともに、またはこれを伴わずに、最初にインキュベートし、洗浄し、次いで1 μg/mlのHRP標識試験MA bとともにインキュベートした。結合について競合するMA b (競合物とのインキュベーション前と比較した、試験MA bのシグナルの低下)は

40

50

、同じかまたは重複するエピトープを共有しなければならず、従って、エピトープファミリーに割り当てられる。列挙したMAbのうち、少なくとも2つのエピトープファミリーが規定される。

【図40】選択された抗161P2F10b MAbの表面染色。細胞表面161P2F10bの特異的結合を、10 μ g/mlの各MAbを4Cにて1.5時間にわたる、Rat1-161P2F10(太線)およびRat1-neoコントロール細胞(細い点線)のインキュベーションによって決定した。細胞を洗浄し、ヤギ-抗マウス-PE結合体化二次Abとともにインキュベートし、再度洗浄し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。示したのは、ECD(X41.6、X41.15、X41.17、X41.29、X41.37、X41.50)のFC融合物でのマウスの、DNAベースの免疫から誘導されたMAbの例であり、さらに、Tag5-ECDおよびRat1-161P2F10b細胞を用いたDNAベースの免疫(最後のデータを、1:50希釈でのそれぞれのハイブリドーマ上清を用いて作成した)を行った。

10

【図41】抗161P2F10b MAb X41.6および97A6(CD203c)は、ENPP1と交差反応しない。Tag5-161P2F10bまたはENPP1 Hisタグ化ベクターのいずれかでトランスフェクトした293T細胞由来の馴化培地を、5 μ gのMAb X41.6、MAb 97A6(CD203c)、または抗His pAbを用いた免疫沈降分析に供した。免疫複体の洗浄後、ホスホジエステラーゼ活性を、p-nTMP基質の添加によって決定した。酵素活性は、両方のタンパク質におけるHisエピトープの存在に起因して、Tag5-161P2F10b培地に由来する抗His免疫複体およびTag5-ENPP1培地に由来する抗His免疫複体の両方において見られる。しかし、酵素活性は、Tag5-161P2F10b馴化培地由来のX41.6および97A6の免疫複体においてのみ見られ、Tag5-ENPP1培地については見られない。これらのデータは、MAb X41.6および97A6(CD203c)が、相同なエクトヌクレオチド(ectonucleotide)ピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼファミリーのメンバーENPP1と交差反応しないことを実証する。

20

【図42】161P2F10b発現細胞の馴化培地中の161P2F10bの検出。示した161P2F20b発現細胞株および非発現細胞株の上清を、捕捉ELISAによる161P2F10bタンパク質の脱落/分泌について分析した。捕捉ELISAを、161P2F10b特異的MAbを下の捕捉MAb(1 μ g/ウェル)として、そしてX41.29を上を検出MAb(2 μ g/ml)として、そして抗マウスIgG2a-HRP二次およびテトラメチルベンズアミジンを発色のための基質として使用して行った。組換え161P2F10b Tag5-ECDタンパク質を、標準として用いた。161P2F10bタンパク質は、161P2F10bを発現するように操作された769およびCaki腎臓癌細胞由来の培地中で検出されたが、親細胞株では検出されなかった。このことは、161P2F10bタンパク質が、脱落または分泌されることを示す。脱落/分泌された161P2F10bは、その活性をオートクライン/パラクリン様式で細胞に対して発揮し得る。さらに、脱落/分泌された161P2F10bは、161P2F10b発現癌および/または他の161P2F10b発現罹病組織についての診断マーカーとして有用である。

30

40

【図43】UGK3ヒト腎臓癌異種移植片を保有するマウスの血清中の、分泌された161P2F10Bの検出。UGK3腎臓癌細胞を皮下に接種したSCIDマウスを、示した期間にわたって腫瘍増殖(1次元腫瘍測定)および161P2F10b血清レベル(捕捉ELISAによる)についてモニタリングした。このデータは、腫瘍のサイズが増大するにつれて161P2F10b血清レベルが上昇することを実証する。このことは、161P2F10bが、161P2F10b発現組織からインピボで脱落/分泌されることを実証し、そして161P2F10bを診断マーカーとしてモニタリングするELISAの有用性をさらに実証する。

【図44】腎臓癌患者標本における免疫組織化学による、161P2F10Bタンパク質

50

の検出。腎臓明細胞癌組織およびその一致した正常隣接組織、ならびにリンパ節への転移癌を、腎臓癌患者から得た。凍結組織を切断して4ミクロンの切片にし、そしてアセトン中で10分間固定した。次いで、これらの切片をPE標識マウスモノクローナル抗ENPP3抗体(Coulter-Immunotech, Marseilles, France)(図44のパネルA~F)、またはアイソタイプコントロール抗体(図44、パネルG~I)とともに3時間にわたってインキュベートした。スライドを緩衝液中で3回洗浄し、そして蛍光顕微鏡によって分析した(図44のパネルA、BおよびC)か、またはDAKO EnVision+TMペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗マウス二次抗体(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)とともに1時間にわたってさらにインキュベートした(図44のパネルD、E、およびF)。次いで、これらの切片を緩衝液中で洗浄し、DABキット(SIGMA Chemicals)を用いて発色させ、ヘマトキシリンを用いて対比染色し、そして明視野顕微鏡によって分析した(図44のパネルD、EおよびF)。これらの結果は、腎臓癌腫患者組織(図44のパネルAおよびD)およびリンパ節組織への腎臓癌転移物(図44のパネルCおよびF)における161P2F10Bの強固な発現を示したが、正常腎臓においては弱い発現を示した(図44のBおよびE)。この発現は、たいてい、細胞膜周辺で検出された。このことは、161P2F10Bが、腎臓癌組織において膜に結合していることを示す。正常な腎臓において検出された弱い発現は、腎臓の細管に局在していた。アイソタイプコントロール抗体で染色された切片は、ネガティブであった。このことは、抗ENPP3抗体の特異性を示す(図44のパネルG~I)。

【図45】ウェスタンブロットによる、ヒト患者癌における161P2F10Bの発現。腎臓癌組織(KiCa)由来の細胞溶解産物、リンパ節への腎臓癌転移物(KiCa Met)由来の細胞溶解産物、ならびに正常腎臓(NK)由来の細胞溶解産物を、抗161P2F10Bマウスモノクローナル抗体を用いたウェスタン分析に供した。手短に述べると、組織(約25μgの総タンパク質)を、SDS-PAGEサンプル緩衝液中で可溶化し、そして10~20% SDS-PAGEゲルで分離し、そしてニトロセルロースに転写した。ブロットをTris緩衝化生理食塩水(TBS)+3%脱脂乳中でブロッキングし、次いでTBS+0.15% Tween-20+1%乳中の精製された抗161P2F10B抗体を用いてプローブした。次いで、ブロットを洗浄し、そして1:4,000希釈の抗マウスIgG-HRP結合体化二次抗体とともにインキュベートした。洗浄後、抗161P2F10B免疫反応性バンドを進展させ、そして強化化学発光によって可視化し、そしてオートラジオグラフィフィルムに曝露した。この特異的抗161P2F10B免疫反応性バンドは、モノマー形態の161P2F10Bタンパク質を表し、これは、約130kDaに泳動する。これらの結果は、161P2F10Bが、腎臓癌、転移癌、および表Iに列挙した他のこのような癌、ならびに161P2F10Bを発現する他のヒトの癌についての診断標的および治療標的として有用であることを示す。

【図46】ウェスタンブロットによる、ヒト異種移植片組織における161P2F10Bの発現。腎臓癌異種移植片(KiCa Xen)由来の細胞溶解産物、リンパ節異種移植片への腎臓癌転移物(Met Xen)由来の細胞溶解産物、ならびに正常な腎臓(NK)由来の細胞溶解産物を、抗161P2F10Bマウスモノクローナル抗体を用いたウェスタン分析に供した。手短に述べると、組織(約25μgの総タンパク質)を、SDS-PAGEサンプル緩衝液中で可溶化し、そして10~20% SDS-PAGEゲルで分離し、そしてニトロセルロースに転写した。ブロットをTris緩衝化生理食塩水(TBS)+3%脱脂乳中でブロッキングし、次いでTBS+0.15% Tween-20+1%乳中の精製された抗161P2F10B抗体を用いてプローブした。次いで、ブロットを洗浄し、そして1:4,000希釈の抗マウスIgG-HRP結合体化二次抗体とともにインキュベートした。洗浄後、抗161P2F10B免疫反応性バンドを発達させ、そして強化化学発光によって可視化し、そしてオートラジオグラフィフィルムに曝露した。特異的抗161P2F10B免疫反応性バンドは、約130kDaに泳動するモノマー形態の161P2F10Bタンパク質、および約260kDaのマルチマーを表す

10

20

30

40

50

。これらの結果は、ヒト癌異種移植片マウスモデルを用いて、161P2F10Bの診断効果および治療効果を研究し得ることを実証する。

【図1】

Figure 1: 182ヌクレオチドの161P2F10B SSH配列 (配列番号1)

```

1 GATCACACAT TAGGTTATNG ACTTCAATAT TTTCAAATGG TTCAACTTCA GTCTTCTCTT
61 TAAAACCTGGG TCCATGTGCC AAGAAAGATA GCCTCCATGC TCCTAAACTC ATTGTTATAA
121 CCATGGTTCG CTCCTCCACA ATTTGTATTT GATTTACTCC TAACAGCCAG CCACTGTTGA
181 TC

```

【図2A-1】

Figure 2:

Figure 2A. 161P2F10B 変異体1のcDNA配列 (配列番号2) およびアミノ酸配列 (配列番号3)

161P2F10B変異体1の3858ヌクレオチド配列が示される。
 オープンリーディングフレームは、停止コドンを含め核酸44~2671
 にわたる。

```

1 M E S T L T
1 ctactttattctgataaaaacaggtctatgcagctaccaggacaATGGAATCTACGTTGAC
7 L A T E Q P V K K N T L K K Y K I A C I
61 TTTAGCAACGGAAACCTGTTAAGAAGAACACTCTTAAGAAATATAAAATAGCTTGCA
27 V L L A L L V I M S L G L G L G L G L R
121 TGTCTTCTTGCTTTGCTGGTGATCATGTCACTTGGATTAGGCTGGGGCTGGACTCAG
47 K L E K Q G S C R K K C F D A S F R G L
181 GAAACTGGAAGCAAGGCAGCTGCAGGAAGAAGTGCCTTGATGCATCATTTAGAGGACT
67 E N C R C D V A C K D R G D C C W D F E
241 GGAGAACTGCCGGTGTGATGTGGCATGTAAGACCGAGGTGATGCTGCTGGGATTTGA
87 D T C V E S T R I W M C N K F R C G E T
301 AGACACCTGTGTGGAATCAACTCGAATATGGATGTGCAATAAATTCGTTGTGGAGAGAC
107 R L E A S L C S C S D D C L Q K K D C C
361 CAGATTAGAGGCCAGCCTTGTCTTGTTCAGATGACTGTTTCAGAAAGAAAGATTGCTG
127 A D Y K S V C Q G E T S W L E E N C D T
421 TGCTGACTATAAGAGTGTGGCCAGGAGAAACCTCATGGCTGGAAGAAACTGTGACAC
147 A Q Q S Q C P E G F D L P P V I L F S M
481 AGCCAGCAGTCTCAGTGCCAGAGGGTTGACCTGCCACCGATTATCTTGTTTCTAT
167 D G F R A E Y L Y T W D T L M P N I N K
541 GGATGGATTTAGAGCTGAATATTTATACACATGGGATACTTAAATGCCAAATATCAATAA
187 L K T C G I H S K Y M R A M Y P T K T F
601 ACTGAAACATGTGAAATTCATTCAAAATACATGAGAGCTATGATCCTACCAAAACCTT
207 P N H Y T I V T G L Y P E S H G I I D N
661 CCCAAATCATACACCATTTGTACGGGCTTGTATCCAGAGTCACATGGCATCATGACAA
227 N M Y D V H L N K N F S L S S K E Q N N
721 TAATATGTATGATGTAATCTCAACAAGAATTTTCACTTCTTCAAAGGAACAAATAA
247 P A W W H G Q P M W L T A M Y Q G L K A
781 TCCAGCTGGTGGCATGGCAACCAATGTGGCTGACAGCAATGTATCAAGGTTAAAGC
267 A T Y F W P G S E V A I N G S F P S I Y
841 CGCTACCTACTTTTGGCCCGATCAGAAGTGGCTATAAATGGCTCCTTTCCTCCATATA
287 M P Y N G S V P F E E R I S T L L K W L
901 CATGCCTFACACCGAAGTGTCCATTTGAAGAGAGGATTTCTACACTGTAAATGGCT
307 D L P K A E R P R F Y T M Y F E E P D S

```

Figure 2A-1

【 2 A - 2 】

961 GGACCTGCCAAGCTGAAAGACCCAGGTTTATACCATGATTTTGAAGAACCTGATTC
327 S G H A G G P V S A R V I K A L Q V V D
1021 CTCTGGACATCGAGGTGGACCGAGCTGAGCGAGAAATTAAGCCCTACAGGTAGTAGA
347 H A F G H L M E G L K R N L H N C V N
1081 TCATGCTTTGGGATGTGATGGAGGCGTGAAGCAGCGGAATTTGCACACTGTGTCAA
367 I I L L A D H G M D Q T Y C N K H E Y M
1141 TATCATCCTTGGCTGACATGGAATGGACAGACTTATTGTAAACAAGTAATACAT
387 T D Y F P R I N F F Y M Y E G P A P R I
1201 GACTGATTTTCCCAAGTAATCTCTCATGTAGCAAGGCGTCCGCCCGCAT
407 R A H N I P H D F F S F N S E E I V R N
1261 CGAGCTCATATACCTCATGCTTTTATGTTTAACTCTGAGAAATGTAGAAA
427 L S C R K P D Q H E F R P Y L T P D L P K
1321 COTCAGTTGCCAAGCTGATCAGCATTTCAAGCCCTATTGACTCTGATTTGCCAAA
447 R L H Y A K K V R I D K V H L F V D Q Q
1381 GCGACTGCATATGCCAAGAGCTCAGAATGACAAATTCATCTCTTTGTGATCAACA
467 W L A V R S K S N T N C G G G N H G Y N
1441 GTGGCTGGCTTTAGGAGTAAATCAATCAAAATTTGGAGGAGGCAACATGTTATAA
487 N E F R S M E A I F L A H G P S F K E K
1501 CAATGAGTTAGGAGCATGGAGGCTATCTTCTGACATGACCCAGTTTAAAGAAA
507 T E V E P F E N I E V Y N L M C D L L R
1561 GACTGAGTTGAACTTTGAAAATGATGACTATAACTTAATGTGATCTCTACG
527 I Q P A P N N G T H G S L N H L K V P
1621 CATTCAACGAGCCCAACATGAGACCTGAGCTGATTAACCATCTCTGAGGCTGCC
547 F Y E P S H A E E V S X F S V C G F A N
1681 TTTTATGACCTCCATCCAGAGAGGTTCTCAAAATTTCTGTTTGGCTTTGCTAA
567 P L P T E S L D C F C P H L Q N S T Q L
1741 TCCATTGCCACAGACTCTCTGACTTTTCTGCCCTCAGCTACAAAATGACTCAGCT
587 E Q V N Q M L N L T Q E E I T A T V K V
1801 GGAACAAGTGAATCAGATGAACTCACCAAGAAAGAAATACGCAACAGTAAAGT
607 N L P F G R P R V L Q K N V D H C L L Y
1861 AAATTTGCCATTGGAGGCTGAGGTAAGTCTGAGAGAACTGGACACTGCTCTTTA
627 H R E Y V S G F G K A H R M P H W S S Y
1921 CCACGGAATATGATGATTTGAAAAGCTATGAGGATGCCATGCGATGAGTCATA
647 T V P Q L G D T S P L P T V P D C L R
1981 CACAGTCCCGAGTGGAGACACATCGCTCTGCTCCACCTGTCGCCAGCTGTCTGG
667 A D V R V P P S E S Q K C S F Y L A D K
2041 GGCTGATGTCAGGCTCTCTCTGAGAGCAAAAATGCTCTCTATTAGCAGACAA
687 N I T H G F L Y F P A S N R T S D S Q Y

Figure 2A-2

【 2 A - 3 】

2101 GAATATCACCCAGGCTCTCTATCTCTGCCAAGTAAAGATCAGATGCCAATA
707 D A L I T S N L V P M Y E E F R K M W D
2161 TGATGCTTTAATACAGAAATTTGGTACTATGATGAAGATTCAGAAAATGGGGA
727 Y F H S V L L I K H A T E R N G V N V V
2221 CTACTTCCAGCTGTCTCTTATAAATGCCACAGAAAGTGAAGTAAATGGT
747 S G P I F D Y N Y D G H F D A P D E I T
2281 TAGTGACCAATTTGATATATAATGATGGCAATTTGATGCTCCAGATGAATAC
767 K H L A N T D V P I P T H Y F V V L T S
2341 CAAACATTTAGCAACACTGATGTTCCATCCCAACACTACTTTGGTGTCCAGCAG
787 C K N K S H T P E N C P G W L D V L P F
2401 TTGTAACAAGAGCCACACACCGGAAACTGCCCTGGTGGTGTCTCCTACCTT
807 I I P H R P T N V E S C P E G K P E A L
2461 TATCATCCTTGGCTGACATGGAATGGACAGACTTATTGTAAACAAGTAATACAT
827 W V E E R F T A H I A R V R D V E L L T
2521 TTGGCTGAGAAAGATTTACAGCTCAGCTGCGCCGCTGCTGATGTAGAACTCTCAC
847 G L D F Y Q D K V Q P V S E I L Q L K T
2581 TGGCTGACTCTATCAGGATAAGTGACGCTCTCTGAAATTTGCAACTAAGAC
867 Y L P T F E T T I *
2641 ATATTTACCAACTTTGAAACCACTTTTAACTtaataatgtctacttaataataatc
2701 actgataaagtaatttggcaaaataaagatgttttctggagaaatgtaaaataa
2761 gttttctattttcttaaaaaaacggatccgggttggggagctggcgagga
2821 gaactcctgaacccggagagagaggtgagtgagcagaatggcctgactcctc
2881 agagcctgggtagcagcagcaagctcctcaaaaataaataaataaagaa
2941 caataaataaataaagcagcagagagagagagagagagagagagagagagag
3001 aaaaactgttactcgtgggtgctcccaagaagactggactcctcctcagcattg
3061 ctttcagagtagaaccagcaaccactcaagggagaacatcagctcttata
3121 agtgcctcctgggaggaagataaaggtgtagactcctcctgaggaataatgac
3181 aatataaagagtagatgaagaagatgctatgtgtaacaaaataaataatca
3241 caaacctgggtagaagcaacagtagaagaactccttaactaaaagctggaaaa
3301 tttctcagttggagctgacacaaaagagagagagagagagagagagagagag
3361 gctacagagggcactcctgagcagtagaagagagagagagagagagagagag
3421 cagagcaagagcactcagcaagagagagagagagagagagagagagagagag
3481 aagcag
3541 acagtagacacagtagacttagcactcagcagagagagagagagagagagagag
3601 agggag
3661 tccactggag
3721 gactcagcctcactcagcctggagagagagagagagagagagagagagagagag

Figure 2A-3

【 2 A - 4 】

3781 ttaggactccttgcactcaactgacccccagtggtctccagagctccctgccac
3841 ccaatcagggcgaattc

Figure 2A-4

【 2 B - 1 】

Figure 2B: 161P2F10B 改造体 2 の cDNA 配列 (配列番号 4) およびアミノ酸配列
161P2F10B改造体2の3958ヌクレオチド配列が示される。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含め塩基44~2671
にわたる。

1 M E S T L T
1 ctactttatctgataaacaggtctatgcagctaccaggacaATGGAATCTACGTTGAC
7 L A T E C T G T P V K K N T L K K Y K I A C I
61 TTTAGCAAGGCAACACTGTTAAGAGAACACTCTTAAGAAATATAAAATAGCTTGCAT
27 V L L A L L V I M S L G L G L G L G L R
121 TGTCTCTCTGCTTTGCTGGTATGATGCTCACTTGTAGCTGAGGCTGGACTCAG
47 K L E K Q G S C R K K C F D A S F R G L
181 GAACTGGAAAGCAAGGCACTGCAAGGAGAGTGTCTTATGATCATTTAGAGGACT
67 E N C R C D V A C K D R G D C C W D F E
241 GGAGACTCGCGTGTGATGTGGCATGTAAGACAGGCGGATGTTGCTGCTGGATTTGA
87 D T C V E S T R I W M C N K F R C G E T
301 AGACACTGTGTGGAACTCACTGCAATATGATGTGCAATAAATTTGTTGGAGAGAC
167 D G F R A E Y L Y T W D T L M P N I N K
541 GGATGGATTAGAGTGAATTTATACACATGGGATCTTAAATGCCAAATATCAATAA
187 L K T C G I H S K Y M R A M Y P T K T F
601 ACTGAAACATGTGGAATTCATTCAAAATACATGAGAGCTATGATCTACCAAAACCTT
207 P N H Y T I V T G L Y P E S H G I I D N
661 CCCAAATCATTAGCAACTTGTCCAGGGCTGTATCCAGAGTCACATGGCATCATTGACAA
227 N M Y D V N L N K N F S L S S K E Q N N
721 TAATATGTATGATGTAATCTCAACAGAAATTTTCACTTCTTCAAGGACAAAATAA
247 P A W H G Q P M W L T A M Y Q G L K A
781 TCCAGCTGGTGGCATGGCAACCAATGTGGTCAGCAAGTATGATCAAGTTTAAAGC
267 A T Y F W P G S E V A I N G S F P S I Y
841 CGCTACTACTTTTGGCCGATCAGAAGTGGCTATAAATGGCTCTTCTTCCATATA
287 M P Y N G S V P F E E R I S T L L K W L
901 CATGCCCTTACACGGAAGTGTCCCAATTTGAGAGAGGATTTCTACACTTTAAAATGGCT
307 D L P K A E R P R F Y T M Y F E E P D S
961 GGACCTGCCAAGCTGAAAGACCCAGGTTTATACCATGATTTTGAAGAACCTGATTC

Figure 2B-1

【 2 B - 2 】

327 S G H A G G P V S A R V I K A L Q V V D
1021 CTCTGGACATCGAGGTGGACCGAGCTGAGCGAGAAATTAAGCCCTACAGGTAGTAGA
347 H A F G H L M E G L K R N L H N C V N
1081 TCATGCTTTGGGATGTGATGGAGGCGTGAAGCAGCGGAATTTGCACACTGTGTCAA
367 I I L L A D H G M D Q T Y C N K H E Y M
1141 TATCATCCTTGGCTGACATGGAATGGACAGACTTATTGTAAACAAGTAATACAT
387 T D Y F P R I N F F Y M Y E G P A P R I
1201 GACTGATTTTCCCAAGTAATCTCTCATGTAGCAAGGCGTCCGCCCGCAT
407 R A H N I P H D F F S F N S E E I V R N
1261 CGAGCTCATATACCTCATGCTTTTATGTTTAACTCTGAGAAATGTAGAAA
427 L S C R K P D Q H E F R P Y L T P D L P K
1321 COTCAGTTGCCAAGCTGATCAGCATTTCAAGCCCTATTGACTCTGATTTGCCAAA
447 R L H Y A K K V R I D K V H L F V D Q Q
1381 GCGACTGCATATGCCAAGAGCTCAGAATGCAAAATTCATCTCTTTGTGATCAACA
467 W L A V R S K S N T N C G G G N H G Y N
1441 GTGGCTGGCTTTAGGAGTAAATCAATCAAAATTTGGAGGAGGCAACATGTTATAA
487 N E F R S M E A I F L A H G P S F K E K
1501 CAATGAGTTAGGAGCATGGAGGCTATCTTCTGACATGACCCAGTTTAAAGAAA
507 T E V E P F E N I E V Y N L M C D L L R
1561 GACTGAGTTGAACTTTGAAAATGATGACTATAACTTAATGTGATCTCTACG
527 I Q P A P N N G T H G S L N H L K V P
1621 CATTCAACGAGCCCAACATGAGACCTGAGCTGATTAACCATCTCTGAGGCTGCC
547 F Y E P S H A E E V S X F S V C G F A N
1681 TTTTATGACCTCCATCCAGAGAGGTTCTCAAAATTTCTGTTTGGCTTTGCTAA
567 P L P T E S L D C F C P H L Q N S T Q L
1741 TCCATTGCCACAGACTCTCTGACTTTTCTGCCCTCAGCTACAAAATGACTCAGCT
587 E Q V N Q M L N L T Q E E I T A T V K V
1801 GGAACAAGTGAATCAGATGAACTCACCAAGAAAGAAATACGCAACAGTAAAGT
607 N L P F G R P R V L Q K N V D H C L L Y
1861 AAATTTGCCATTGGAGGCTGAGGTAAGTCTGAGAGAACTGGACACTGCTCTTTA
627 H R E Y V S G F G K A H R M P H W S S Y
1921 CCACGGAATATGATGATTTGAAAAGCTATGAGGATGCCATGCGATGAGTCATA
647 T V P Q L G D T S P L P T V P D C L R
1981 CACAGTCCCGAGTGGAGACACATCGCTCTGCTCCACCTGTCGCCAGCTGTCTGG
667 A D V R V P P S E S Q K C S F Y L A D K
2041 GGCTGATGTCAGGCTCTCTCTGAGAGCAAAAATGCTCTCTATTAGCAGACAA
687 N I T H G F L Y F P A S N R T S D S Q Y
2101 GAATATCACCCAGGCTCTCTATCTCTGCCAAGTAAAGATCAGATGCCAATA
707 D A L I T S N L V P M Y E E F R K M W D
2161 TGATGCTTTAATACAGAAATTTGGTACTATGATGAAGATTCAGAAAATGGGGA
727 Y F H S V L L I K H A T E R N G V N V V
2221 CTACTTCCAGCTGTCTCTTATAAATGCCACAGAAAGTGAAGTAAATGGT

Figure 2B-2

【 2 D - 2 】

367 I I L L A D H G M D Q T Y C N K M E Y M
1141 TATCATCTCTGGCTGACATGGATGGACAGATTTATGTACACAGATGGAAATACAT
387 T D Y F P R I N F F Y M Y E G P A P R I
1201 GACTGATATTTCCGAGATAAATCTTCTACATGTACGAAAGGCTGCCCCCGCAT
407 R A H N I P H D F F S F N S E E I V R N
1261 CCGAGCTCAATAATACCTCATGACTTTTAAATTTAATCTGAGAAATTTAGAAA
427 L S C R K P D Q H F K P Y L T P D L P K
1321 CCTCAGTTGCCGAAACCTGATCAGCATTTCAAGCCATTTGACTCTGATTTGCCAAA
447 R L H Y A K N V R I D K V H L F V D Q Q
1381 GCGACTGCACTATGCCAAGACCTCAGAAATGACAAAATCTATCTCTTTGGATCAACA
467 W L A V R S K S N T N C G G G N H G Y N
1441 GTGGCTGGCTGTTAGAGTAATAAATAAATAAATTTGGAGAGGCAACCATGGTTATAA
487 N E F R S M E A I F L A H G P S F K E K
1501 CAATGAGTTAGGAGCATGGAGCTATCTTTGGACATGGACCCAGTTTAAAGAGAA
507 T E V E P F E N I E V Y N L M C D L L R
1561 GACTCAGTTGAACCATTTGAAATTTAGAACTATAACCTAATGTGTGATCTTACG
527 I Q P A P N N G T H G S L N H L L K V P
1621 CATTCAACGAGCAACAAATGAAACCCATGGTAGTTAAACATCTTCTGAAGTGCC
547 F Y E P S H A E E V S K F S V C G F A N
1681 TTTTATGAGCCATCCCATGAGAGAGGTCGCAAGTTTCTGTTTGGCTTTGCTAA
567 P L P T E S L D C F C P H L Q N S T Q L
1741 TCCATTGCCACAGAGTCTCTGACTGTTCTGCCCTCACAAATAGTACTCAGCT
587 E Q V N Q M L N L T Q E E I T A T V K V
1801 GGAACAAGTGAATCAGATGCTAAATCTCAGCAAGAAATTAACAGCAAGTAAAGT
607 N L P F G R P R V L Q K N V D H C L L Y
1861 AAATTTGCCATTTGGAGGCTAGGCTAGCAGAAAGCAAGCTGACCACTGCTCCTTTA
627 H R E Y V S G F G K A M R M P M S S Y
1921 CCACGGAATATGCTAGTGAATTTGAAAGCTATGAGGATGCCATTTGGAGTTCATA
647 T V P Q L G D T S P L P P T V P D C L R
1981 CACAGTCCCGAGTTGGAGACACATGCGCTGCTGCCACTGTCACAGACTGCTCGG
667 A D V R V P P S E S Q K C S F Y L A D K
2041 GGCTGATGTCAGGTTCTCCTCTGAGAGCCAAAATGTTCTCTATTAGCAGACAA
687 N I T H G F L Y P P A S N R T S D S Q Y
2101 GAATATCACCCAGGCTCTCTCTCTCCTGCCAGCAATGAACATCAGATGACCAATA
707 D A L I T S N L V P M Y E E F R K M W D
2161 TGATGCTTAAATTAAGCAATTTGGTACTATGATGAAGAATTCAGAAAATTTGGGA
727 Y F H S V L L I K H A T E R N G V N V V
2221 CTACTTCCACAGTGTCTTCTTATAAACATGCCACGAAAGAAATGGAGTAAATGTGT

Figure 2D-2

【 2 D - 3 】

747 S G P I F D Y N Y D G H F D A P D E I T
2281 TGTGGACCAATATTTGATATAATATGATGGCCATTTGAGCTCCGAGATTAATAC
767 K H L A N T D V P I P T H Y F V V L T S
2341 CAAAGATTAGCCACACTGATGTTCCCATCCCAACACTACTTTGTGTGCTGACCAG
787 C K N K S H T P E N C P G W L D V L P F
2401 TTGTAAAACAGAGGACACACCGGAAAATCGCCCTGGTGGCTGATGCTACCTT
807 I I P H R P T N V E S C P E G K P E A L
2461 TATCATCCCTCAGGACCTACCAACCTGGAGACTGCTCCTGAAAGTAAACAGAGCTC
827 W V E E R F T A H I A R V R D V E L L T
2521 TTGGGTGAAGAAATTTACAGCTCAGATTTGCCGGTCCGATGTAGAACCTCTCAC
847 G L D F Y Q D K V Q P V S E I L Q L K T
2581 TGGGCTGACTTCTATCAGATTAAGTCCAGGCTGCTCTGAAATTTGCAACTAAGAC
867 Y L P T F E T P I *
2641 ATATTTACCAACATTTGAAACCCCTATTAACTtaataatgctacttaataataatt
2701 actgataaagttaatttggcaaatataaagtgttttctggagactgttaaatataa
2761 gtttctatttttcttaaaaaaaacoggaattccggctggggagctgagcagga
2821 gactgcttgaacccgggagcagaggttgcagtgagcgaagatgpcactgcaactcc
2881 agagcctgggtgacagcagcagcactacatccaaaaataaataaataaataaagataa
2941 caataaaaaataaaagacagcagagaaatgagcaagaggaatgtccaaactattgc
3001 aaaaactgttacactgggttggctcccaagaagatacgaactcttccagcaatttg
3061 ctttccagaatgagaacagcaaacacccctcaagcggagaaatcagatcttctatta
3121 agtagctctggggaagaagataaagattgctagctccctgattgggaaaaatgca
3181 aataaataaagaatgagaatgaaagaagcagctgcttctgtaacacaaaaaaatca
3241 caacgctggggaagaacagatgagaacacatcttaactaaagctggaaasa
3301 tttcagctgggagcagcaaaaaagcgggattccagcgaagaagctggcgtga
3361 gctcagagagcactgpcagctgagagacctcaagatcaaaagtccatctga
3421 cagagcaagcactgcagagagagaggtttaaattatggtccaaagcgaaggtgt
3481 aaagcgaagattgcagcactgctctcctcagcagagcctgagggcaaatatg
3541 acagcagcagctgactatgacactgcaagacagcagcagcagcggggagca
3601 agggagagcagctgggaggttctcatgagagagagagagatttgaacacagca
3661 tccactgagagctgggacacagcaccctccagcaataaagtctggtgctcatt
3721 gatctcagcctcatcagcctggagagcctgataccatcgcagctccagcagc
3781 tttagcactctgcatcaactgaccccccaggtggtctccagcctccctgcccac
3841 ccattcagcgggaattc

Figure 2D-3

【 2 E - 1 】

Figure 2E-1: 161P2F10B変異体のcDNA配列 (配列番号10) およびアミノ酸配列 (配列番号11)

161P2F10B変異体の3858ヌクレオチド配列が示される。
オープンリーディングフレームは、停止コドンを含め核酸44-2671
にわたる。
1 M E S T L T
1 ctactttatctgataaaacaggtctatgcagctaccaggacaATGGAATCTAGTTGAC
7 L A T E Q P V K K N T L K K Y K I A C I
61 TTTAGCAACGAAACCTGTTAAGAAACACTCTTAAGAAATATAAAATAGCTTGCAT
27 V L L A L L V I M S L G L G L G L G L R
121 TGTCTTCTGCTTGTGGTGGATCATGCTATGGATTAGGCTGGGGCTTGGACTCAG
47 K L E K Q G S C R K K C F D A S F R G L
181 GAAACTGGAARACAGGACCTGCGAGGAAGTGTCTTGTGATCATTTAGAGGACT
67 E N C R C D V A C K D R G D C C W D F E
241 GGAGAACTGCGGTTGATGGCAGTGAAGACCTGATGCTGCTGGGATTTGA
87 D T C V E S T R I W H C N K F R C G E T
301 AGACACCTGTGGAAATCAATCGAATGGATGCAATAAATTCGTTGGAGAGAC
107 R L E A S L C S C S D D C L Q K K D C C
361 CAGATTAGAGCCAGCTTGTCTTGTTCAGATGACTGTTGCGAAGAAAGATTCGCTG
127 A D Y K S V C Q G E T S W L E E N C D T
421 TGCTGACTATAAGAGTGTTCGCAAGGAAACCTATGGCTGGAAGAAACCTGACAC
147 A Q Q S Q C P E G F D L P P V I L F S M
481 AGCCACAGCTCAGTCCGCAAGAGGTTTGGCTGACACAGTATCTGTTTCTTAT
167 D G F R A E Y L Y T W D T L M P N I N K
541 GGATGGATTAGAGCTGAATATTTATACACATGGGATACTTTAATGCCAAATATCAATAA
187 L K T C G I H S K Y M R A M Y P T K T F
601 ACTGAAACATGTTGGAATCATCAAAATCATAGAGCTATGATCTTACCAAAACCTT
207 P N H Y T I V T G L Y P E S H G I I D N
661 CCCAAATCATACACATGTCAGGCTGTTATCCAGAGTACATGGCATCATTGACAA
227 N M Y D V N L N K N F S L S S K E Q N N
721 TAAATGATGATGATAAATCTCAACAAGAAATTTTCACTTCTCAAAAGAAACAAAATAA
247 P A W H G Q P M W L T A M Y Q G L K A
781 TCCAGCTGGTGCATGGCAACCAATGGCTGACAGCAATGATCAAGSPTTAAAGC
267 A T Y F W P G S E V A I N G S F P S I Y
841 CGCTACTACTTTGGCCGGATCAGAAAGTGGCTATAAATGGCTCCTTCTTCCATATA
287 M P Y N G S V P F E E E R I S T L L K W L
901 CATGCCCTTACACGGAAGTGTCCCAATGGAAGAGAGGATTTCTACACTGTTAAATGGCT
307 D L P K A E R P R F Y T M Y F E E P D S
961 GGACCTGCCAAAGCTGAAAGACCCAGGTTTATACCATGATTTTGAAGAACCTGATTC
327 S G H A G G P V S A R V I K A L Q V V D
1021 CTCTGGACATGACAGTGGACAGTCAAGTCCAGAGTAAATTAAGCCTTACAGGTAGTAGA
347 H A F G M L M E G L K Q R N L H N C V N
1081 TCACTGTTTGGGATGTTGATGGAAGGCTGGAAGCAGCGAATTTGCACAACTGTGCAA

Figure 2E-1

【 2 E - 2 】

367 I I L L A D H G M D Q T Y C N K M E Y M
1141 TATCATCTCTGGCTGACATGGATGGACAGATTTATGTACACAGATGGAAATACAT
387 T D Y F P R I N F F Y M Y E G P A P R I
1201 GACTGATATTTCCGAGATAAATCTTCTACATGTACGAAAGGCTGCCCCCGCAT
407 R A H N I P H D F F S F N S E E I V R N
1261 CCGAGCTCAATAATACCTCATGACTTTTAAATTTAATCTGAGAAATTTAGAAA
427 L S C R K P D Q H F K P Y L T P D L P K
1321 CCTCAGTTGCCGAAACCTGATCAGCATTTCAAGCCATTTGACTCTGATTTGCCAAA
447 R L H Y A K N V R I D K V H L F V D Q Q
1381 GCGACTGCACTATGCCAAGACCTCAGAAATGACAAAATCTATCTCTTTGGATCAACA
467 W L A V R S K S N T N C G G G N H G Y N
1441 GTGGCTGGCTGTTAGAGTAATAAATAAATAAATTTGGAGAGGCAACCATGGTTATAA
487 N E F R S M E A I F L A H G P S F K E K
1501 CAATGAGTTAGGAGCATGGAGCTATCTTTGGACATGGACCCAGTTTAAAGAGAA
507 T E V E P F E N I E V Y N L M C D L L R
1561 GACTCAGTTGAACCATTTGAAATTTAGAACTATAACCTAATGTGTGATCTTACG
527 I Q P A P N N G T H G S L N H L L K V P
1621 CATTCAACGAGCAACAAATGAAACCCATGGTAGTTAAACATCTTCTGAAGTGCC
547 F Y E P S H A E E V S K F S V C G F A N
1681 TTTTATGAGCCATCCCATGAGAGAGGTCGCAAGTTTCTGTTTGGCTTTGCTAA
567 P L P T E S L D C F C P H L Q N S T Q L
1741 TCCATTGCCACAGAGTCTCTGACTGTTCTGCCCTCACAAATAGTACTCAGCT
587 E Q V N Q M L N L T Q E E I T A T V K V
1801 GGAACAAGTGAATCAGATGCTAAATCTCAGCAAGAAATTAACAGCAAGTAAAGT
607 N L P F G R P R V L Q K N V D H C L L Y
1861 AAATTTGCCATTTGGAGGCTAGGCTAGCAGAAAGCAAGCTGACCACTGCTCCTTTA
627 H R E Y V S G F G K A M R M P M S S Y
1921 CCACGGAATATGCTAGTGAATTTGAAAGCTATAACCTAATGTGTGATCTTACG
547 T V P Q L G D T S P L P P T V P D C L R
1981 CACAGTCCCGAGTTGGAGACACATGCGCTGCTGCCACTGTCACAGACTGCTCGG
667 A D V R V P P S E S Q K C S F Y L A D K
2041 GGCTGATGTCAGGTTCTCCTCTGAGAGCCAAAATGTTCTCTATTAGCAGACAA
687 N I T H G F L Y P P A S N R T S D S Q Y
2101 GAATATCACCCAGGCTCTCTCTCTCCTGCCAGCAATGAACATCAGATGACCAATA
707 D A L I T S N L V P M Y E E F R K M W D
2161 TGATGCTTAAATTAAGCAATTTGGTACTATGATGAAGAATTCAGAAAATTTGGGA
727 Y F H S V L L I K H A T E R N G V N V V
2221 CTACTTCCACAGTGTCTTCTTATAAACATGCCACGAAAGAAATGGAGTAAATGTGT

Figure 2E-2

【 図 4 A 】

Figure 4: 既知の遺伝子と 161P2F10B との比較:161P2F10B についての2つの変異体の同定

A) K→P変異体を保有する変異体1 (配列番号22) との161P2F10 (配列番号21) のアライメント

```

161P2: 1  MESTLTLATEQPVKNTLKKYKIACIVLLALLVINSGLGLGLRLEKQSCRKCFD 60
Sbjct: 1  MESTLTLATEQPVKNTLKKYKIACIVLLALLVINSGLGLGLRLEKQSCRKCFD 60
Query: 61  ASFRGLENCRDCAKDRGDCNDFFEDTVCVSTRIMWKNKFCGETREASLCSGSDCL 120
Sbjct: 61  ASFRGLENCRDCAKDRGDCNDFFEDTVCVSTRIMWKNKFCGETREASLCSGSDCL 120
Query: 121  QKDDCADYKSVCGQGETSMLLENCDTAQSQCPEGFDLPPVILFSDMGFRAEVLTYNDTL 180
Sbjct: 121  QKDDCADYKSVCGQGETSMLLENCDTAQSQCPEGFDLPPVILFSDMGFRAEVLTYNDTL 180
Query: 181  MNINLKLTCGTHSKYRMYPTKTFPNHYTIVTGLVPSHGIIIDNNYDNLNKNFSL 240
Sbjct: 181  MNINLKLTCGTHSKYRMYPTKTFPNHYTIVTGLVPSHGIIIDNNYDNLNKNFSL 240
Query: 241  SKEQNFANWGHQPMMLTAMYQGLKATYFMPGSEVAINGSFPIYMPYNGSVFPERIS 300
Sbjct: 241  SKEQNFANWGHQPMMLTAMYQGLKATYFMPGSEVAINGSFPIYMPYNGSVFPERIS 300
Query: 301  TLLKMLDLKAEPRFPTMYFEPDSSGHAGGVSARVICALQVVDHAFGLMEGLKQRN 360
Sbjct: 301  TLLKMLDLKAEPRFPTMYFEPDSSGHAGGVSARVICALQVVDHAFGLMEGLKQRN 360
Query: 361  LHNCVNIILLADHMDQTYCNMJEYTDYFPRINFFYMEGPAIRIRAHNIPHDFSFNS 420
Sbjct: 361  LHNCVNIILLADHMDQTYCNMJEYTDYFPRINFFYMEGPAIRIRAHNIPHDFSFNS 420
Query: 421  EEIVRNLSCKRPDQHFKPYLTFDLPKRLHYAKNVRIDKVLFDQQLAVRSKNTNCGG 480
Sbjct: 421  EEIVRNLSCKRPDQHFKPYLTFDLPKRLHYAKNVRIDKVLFDQQLAVRSKNTNCGG 480
Query: 481  GNHGYNNEFRSMEAI FLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQAPNNGTHGSLN 540
Sbjct: 481  GNHGYNNEFRSMEAI FLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQAPNNGTHGSLN 540
Query: 541  HLLKVPFYEPSHAEBVSKFVCGFANPLPTESLDCCFPHLQNSTLQEQVNMMLTQEEI 600
Sbjct: 541  HLLKVPFYEPSHAEBVSKFVCGFANPLPTESLDCCFPHLQNSTLQEQVNMMLTQEEI 600
Query: 601  TATVKVNLFPGRPRVLQKVDHCLLYHREYVSGFKAMRMPMSSYTVPLQDTSPLPPT 660
Sbjct: 601  TATVKVNLFPGRPRVLQKVDHCLLYHREYVSGFKAMRMPMSSYTVPLQDTSPLPPT 660
Query: 661  VPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLDKNI THGFLYPPASNRSTSQYDALITSNLVPMYEE 720
Sbjct: 661  VPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLDKNI THGFLYPPASNRSTSQYDALITSNLVPMYEE 720
Query: 721  FRKMDYFHSVLLIKHATERNGVNVSGPIFDYNYDGHFADPEITKHLANTDVP IPTHY 780
Sbjct: 721  FRKMDYFHSVLLIKHATERNGVNVSGPIFDYNYDGHFADPEITKHLANTDVP IPTHY 780
Query: 781  FVVLTSCKNKSHTPENCQGLDVLPII PHRPTNVESCPEKPEALMVEERFATAHARVR 840
Sbjct: 781  FVVLTSCKNKSHTPENCQGLDVLPII PHRPTNVESCPEKPEALMVEERFATAHARVR 840
Query: 841  DVELLTGLDFYQDKVQVSEIILQKTYLPTFETI 875
Sbjct: 841  DVELLTGLDFYQDKVQVSEIILQKTYLPTFETI 875

```

Figure 4A

【 図 4 B 】

B) T→P変異体を保有する161P2F10B (配列番号23) および SNP変異体 (配列番号24) のアライメント

```

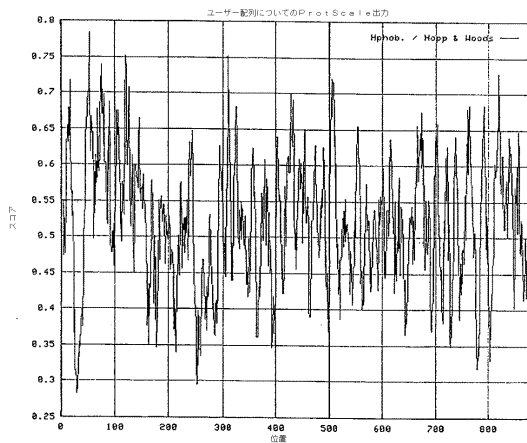
161P2: 492  MEATFLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQAPNNGTHGSLNHLKVPFYEPS 551
Sbjct: 1  MEATFLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQAPNNGTHGSLNHLKVPFYEPS 60
Query: 552  HAEVSKFVCGFANPLPTESLDCCFPHLQNSTLQEQVNMMLTQEEITATVKVNLFP 611
Sbjct: 61  HAEVSKFVCGFANPLPTESLDCCFPHLQNSTLQEQVNMMLTQEEITATVKVNLFP 120
Query: 612  RPRVLQKVDHCLLYHREYVSGFKAMRMPMSSYTVPLQDTSPLPPTVPCDLRADVRV 671
Sbjct: 121  RPRVLQKVDHCLLYHREYVSGFKAMRMPMSSYTVPLQDTSPLPPTVPCDLRADVRV 180
Query: 672  PPSESQKCSFYLDKNI THGFLYPPASNRSTSQYDALITSNLVPMYEEFRKMDYFHSV 731
Sbjct: 181  PPSESQKCSFYLDKNI THGFLYPPASNRSTSQYDALITSNLVPMYEEFRKMDYFHSV 240
Query: 732  LLIKHATERNGVNVSGPIFDYNYDGHFADPEITKHLANTDVP IPTHYVVLTSCKNKS 791
Sbjct: 241  LLIKHATERNGVNVSGPIFDYNYDGHFADPEITKHLANTDVP IPTHYVVLTSCKNKS 300
Query: 792  HTFENCQGLDVLPII PHRPTNVESCPEKPEALMVEERFATAHARVDVLLTGLDFY 851
Sbjct: 301  HTFENCQGLDVLPII PHRPTNVESCPEKPEALMVEERFATAHARVDVLLTGLDFY 360
Query: 852  QDKVQVSEIILQKTYLPTFETI 875
Sbjct: 361  QDKVQVSEIILQKTYLPTFETI 384

```

Figure 4B

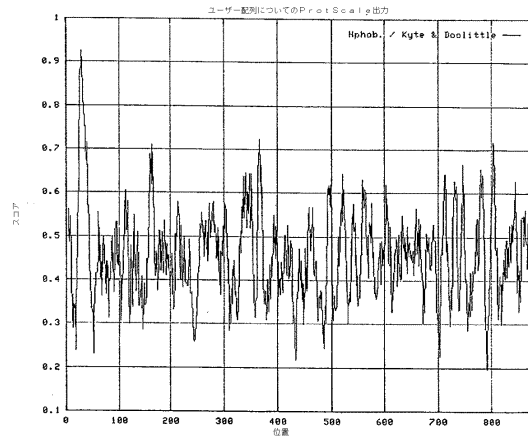
【 図 5 】

Figure 5: 161P2F10B 親水性プロファイル (Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828)



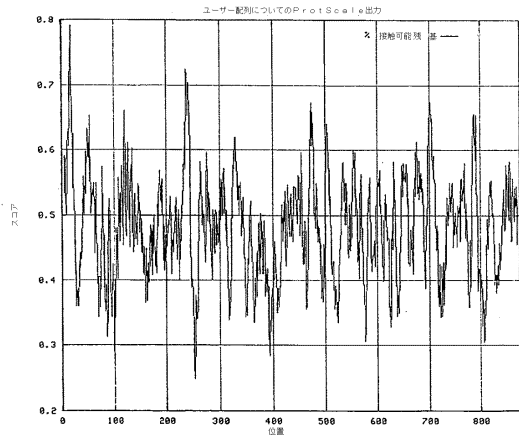
【 図 6 】

Figure 6: 161P2F10B ハイドロパシープロファイル (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132)



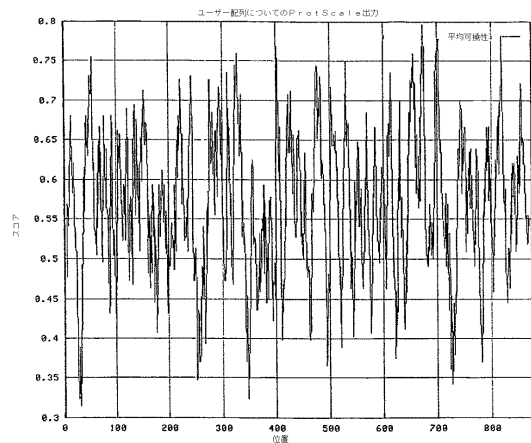
【 図 7 】

Figure 7: 161P2F10B %接触可能残基プロファイル
(Janin J., 1979. Nature 277:491-492)



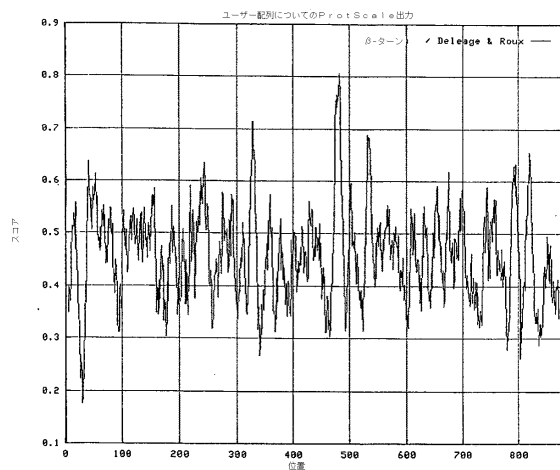
【 図 8 】

Figure 8: 161P2F10B 平均可撓性プロファイル
(Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255)



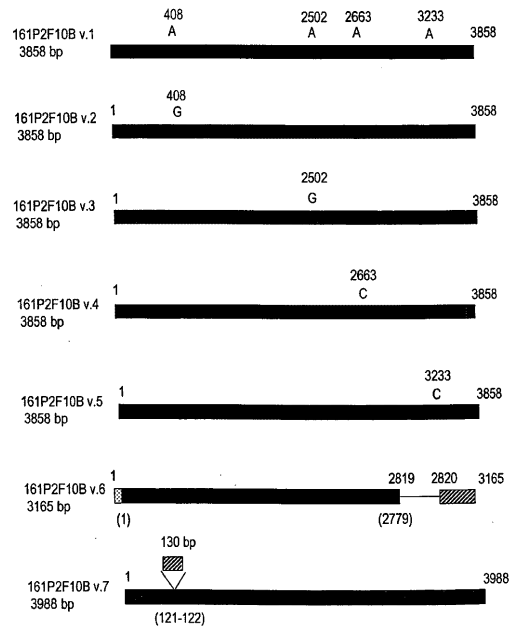
【 図 9 】

Figure 9: 161P2F10B β -ターンプロファイル
(Deleage, G., Roux B. 1987. Protein Engineering 1:289-294)



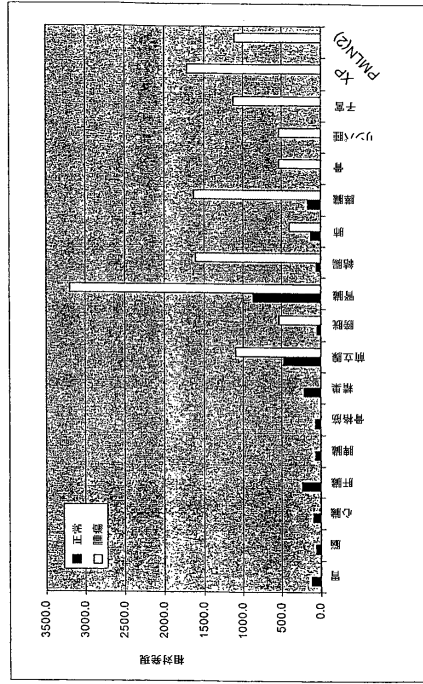
【 図 10 】

Figure 10



【 図 1 4 】

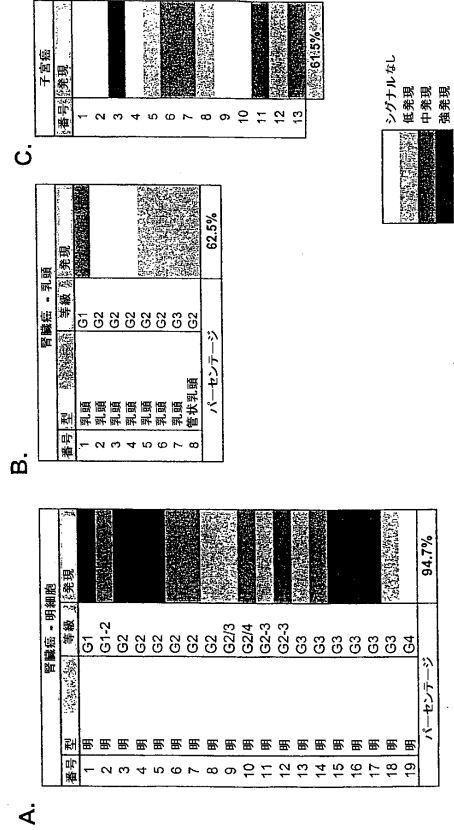
Figure 14 正常および患者癌組織における 161P2F10B 発現



XP = 前立腺異種移植片
PMLN(2) = リンパ管への2前立腺転移のグループ

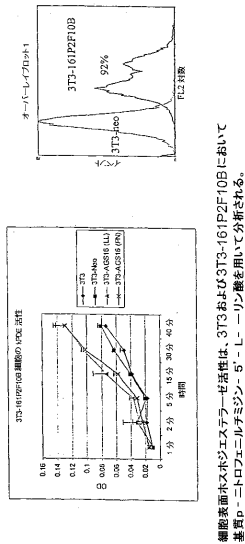
【 図 1 5 】

Figure 15 腎臓および子宮癌患者癌検体における 161P2F10B 発現



【 図 1 6 】

Figure 16: 3T3-161P2F10B 安定細胞のホスホステラセ活性



【 図 1 7 】

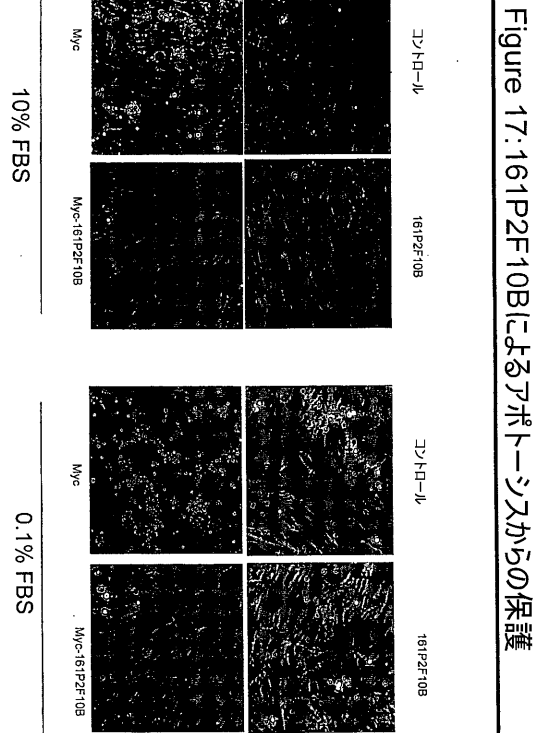
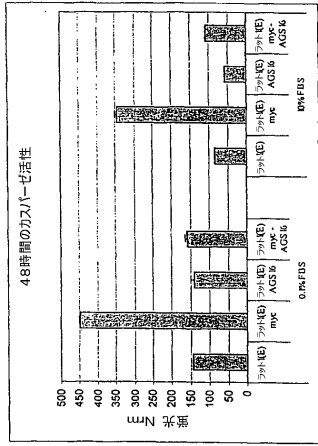


Figure 17: 161P2F10Bによるアポトーシスからの保護

【 図 1 8 】

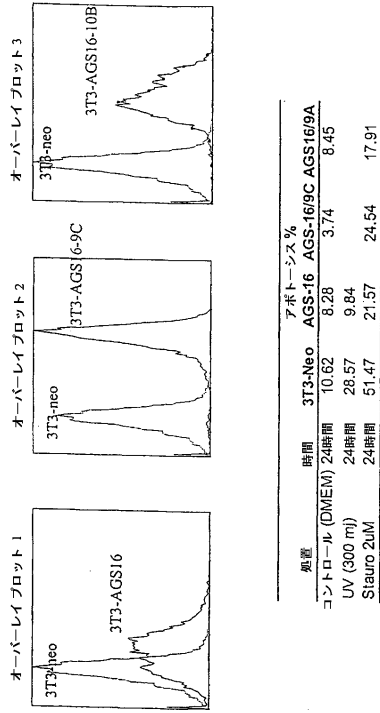
Figure 18 161P2F10Bは、アポトーシスシグナルから保護する



・Rat1(E)細胞をApo1カスパーゼアッセイを使用して分析した

【 図 1 9 】

Figure 19: スタウロsporinおよびUV誘導アポトーシスからの161P2F10B防護



【 図 2 0 】

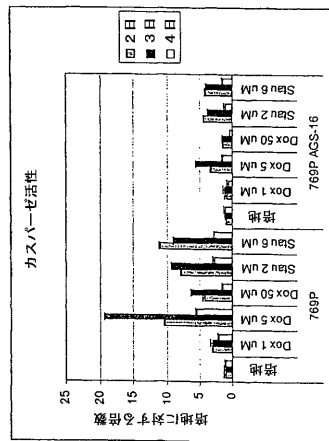
Figure 20: 薬物およびUV誘導アポトーシスからの161P2F10B発現防護細胞

細胞株	処置	時間	アポトーシス %
3T3 neo	コントロール	24時間	3.62
	スタウロsporin, 2.14 uM	24時間	64.93
	UV (300 mJ/cm ²)	24時間	62.92
3T3-AGS16	コントロール	24時間	1.72
	スタウロsporin, 2.14 uM	24時間	14.76
	UV (300 mJ/cm ²)	24時間	30.8

NIH3T3細胞は、スタウロsporin またはUVで処置され、Annexin V-FITCおよびヨウ化プロピジウムで染色され、ならびにFACSにより分析された。

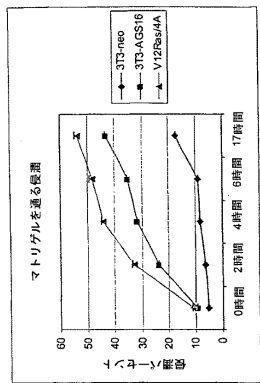
【 図 2 1 】

Figure 21: 化学治療剤によるアポトーシスからの161P2F10B防護



【 図 2 2 】

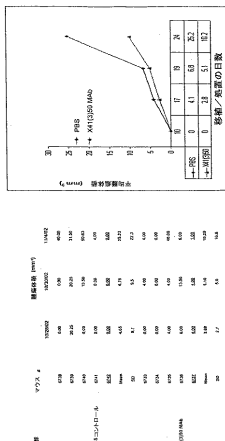
Figure 22: インビトロ侵潤における 161P2F10Bの効果



- 161P2F10Bを安定に発現する3T3細胞は、トランスウェル挿入システム (Transwell Insert System) を用いてアッセイされた。
- 侵襲は、全細胞数の蛍光に対してより低いチャンネルにおける細胞の蛍光を測定することにより決定した。
- このアッセイは三連で実施された。

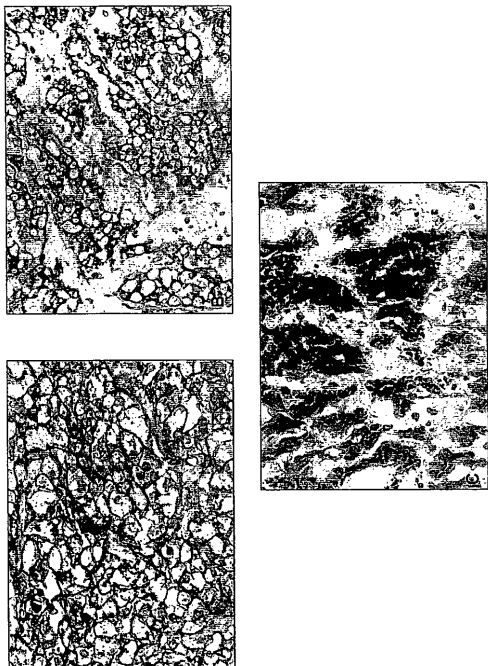
【 図 2 3 】

Figure 23: 161P2F10B MAbは、SCIDマウスにおいて、H腎臓癌細胞株の増殖を減らす



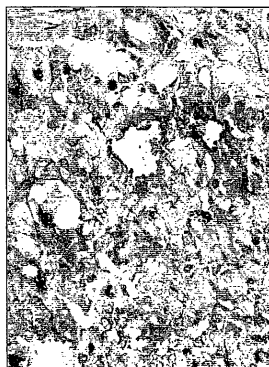
【 図 2 4 】

Figure 24: 腎臓癌標本における161P2F10Bタンパク質の発現



【 図 2 5 】

Figure 25: 前立腺癌標本における161P2F10Bタンパク質の発現



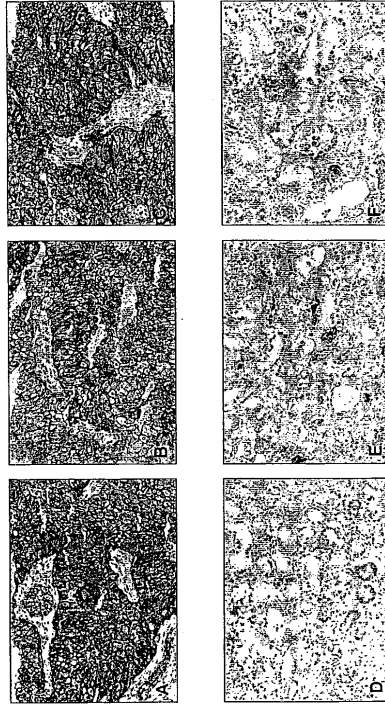
【 図 26 】

Figure 26: 結腸癌標本における161P2F10Bタンパク質発現



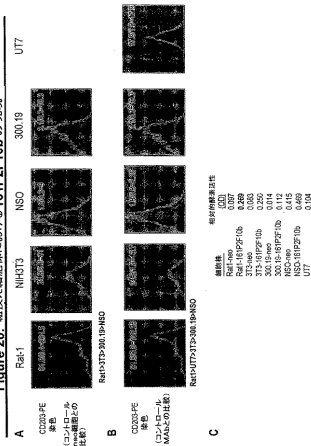
【 図 27 】

Figure 27: マウスモノクローナル抗体の特異的結合による腎臓癌明細胞癌者標本の161P2F10Bタンパク質発現を示す免疫組織化学図



【 図 28 】

Figure 28: 組織スライドにおける161P2F10bの発現



【 図 29 】

Figure 29: 161P2F10b の免疫反応性

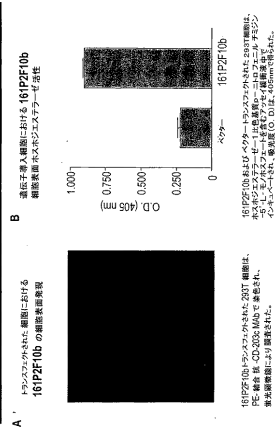


Figure 30: 組換え Caki 腎臓癌細胞における161P2F10b 変異体の相対発現および酵素活性

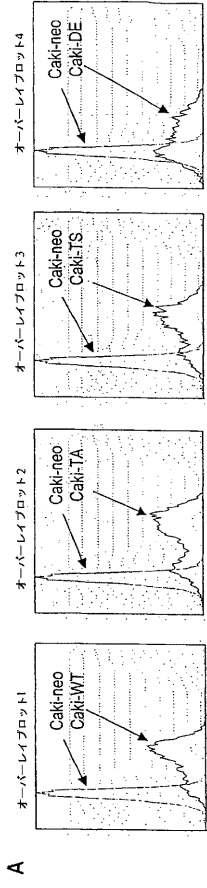


Figure 32: P-ニトロフェニル-チロジンモノホスフェート (p-nTMP) を利用する161P2F10b 酵素アッセイ

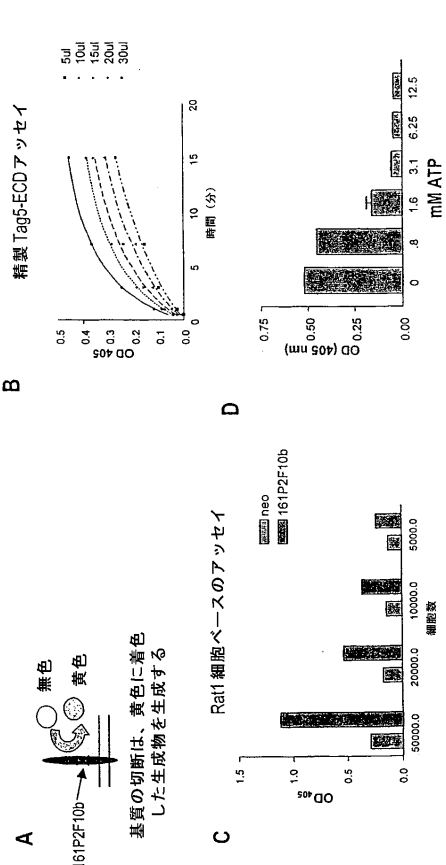


Figure 33: 抗161P2F10b MAb X41.6のインターナリゼーションの分析

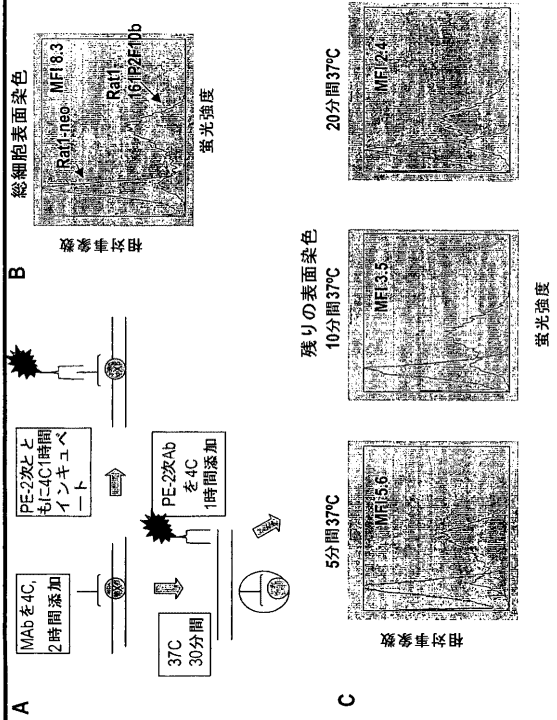


Figure 31: 161P2F10bの組換え細胞外ドメイン(ECD)の精製

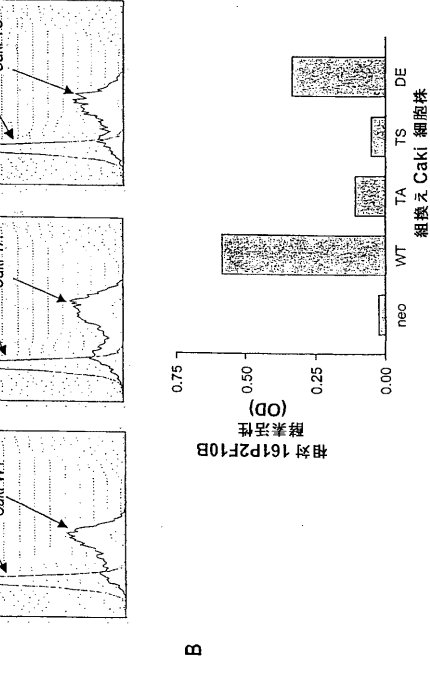


Figure 30: 組換え Caki 腎臓癌細胞における161P2F10b 変異体の相対発現および酵素活性

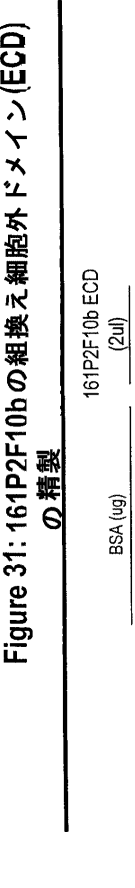


Figure 31: 161P2F10bの組換え細胞外ドメイン(ECD)の精製

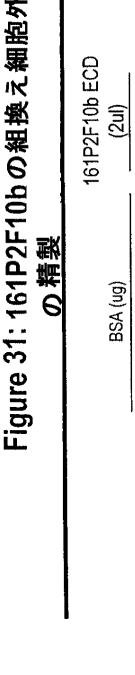


Figure 32: P-ニトロフェニル-チロジンモノホスフェート (p-nTMP) を利用する161P2F10b 酵素アッセイ

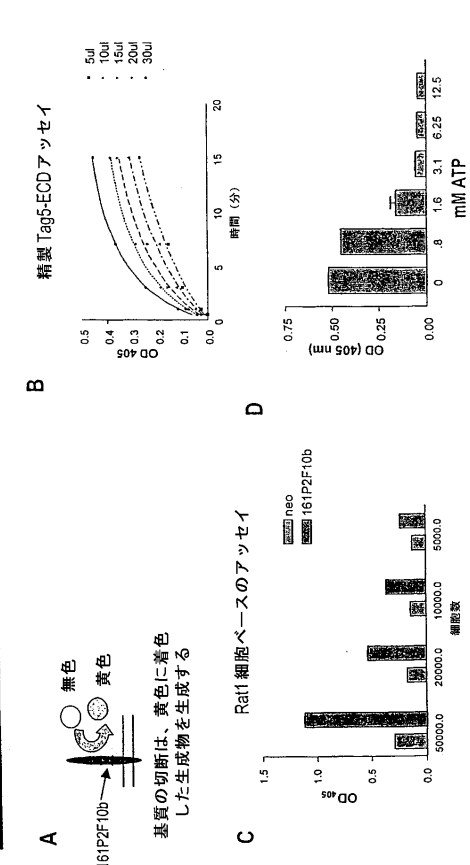


Figure 33: 抗161P2F10b MAb X41.6のインターナリゼーションの分析

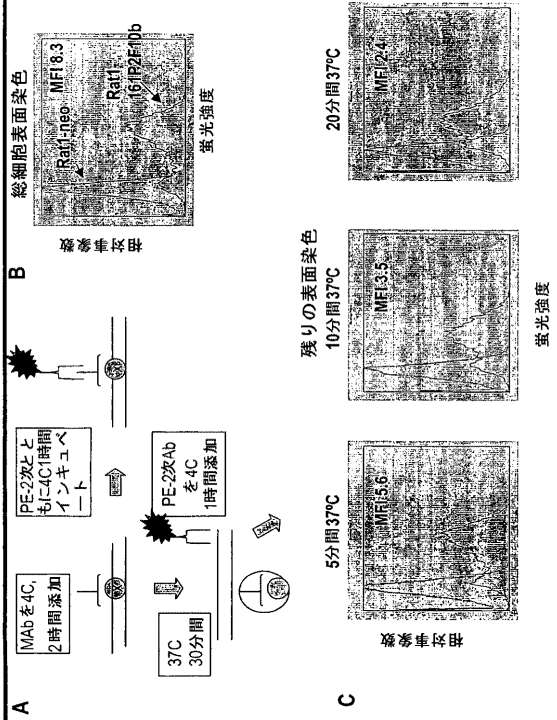


Figure 34: 選択された抗161P2F10bマウスMAbのインターナリゼーション

【 図 3 4 】

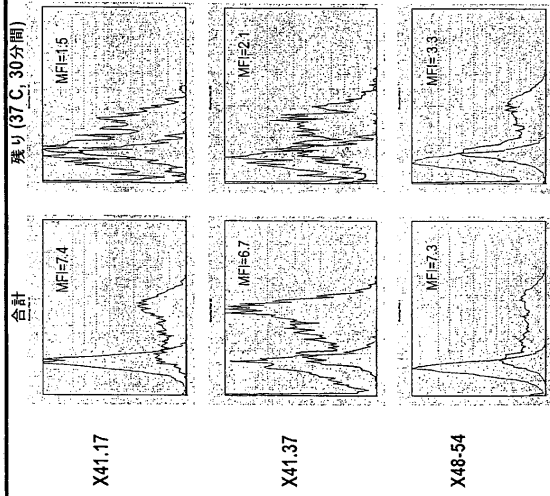


Figure 35: 161P2F10bの抗体価は、そのインターナリゼーションをもたらす

【 図 3 5 】

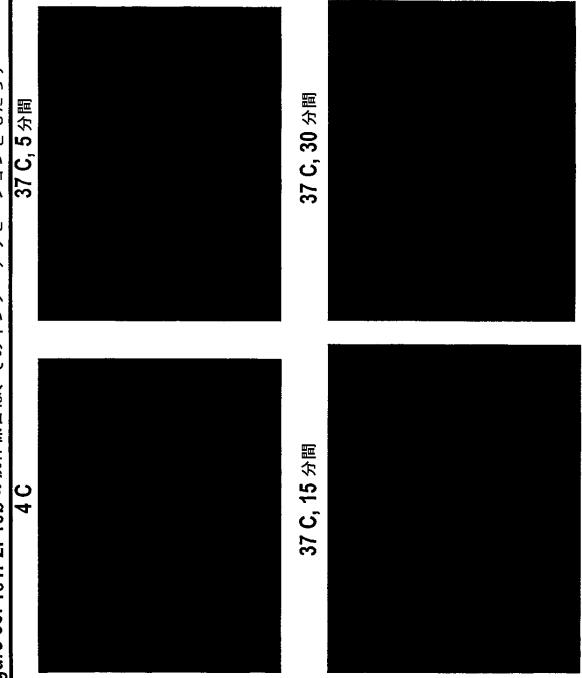


Figure 36: Caki-161P2F10b 細胞に対するX41.50 MAb-サポリン毒素結合体の影響

【 図 3 6 】

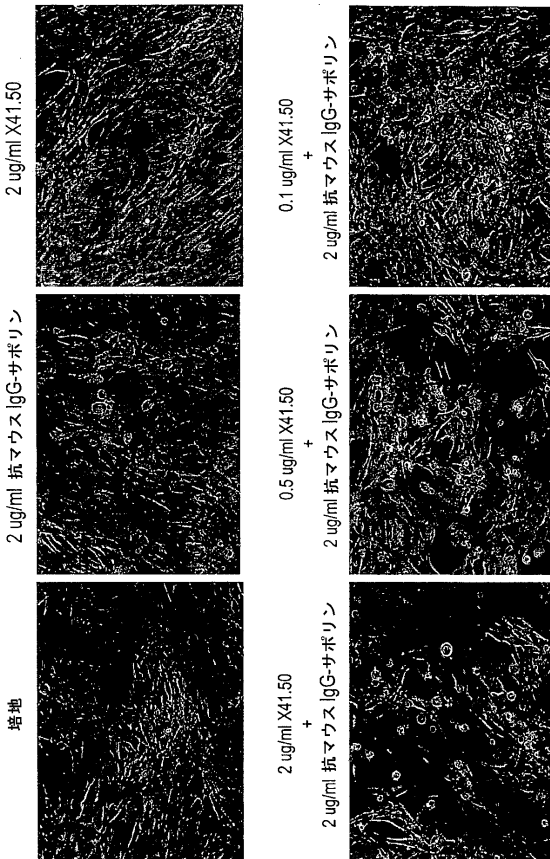
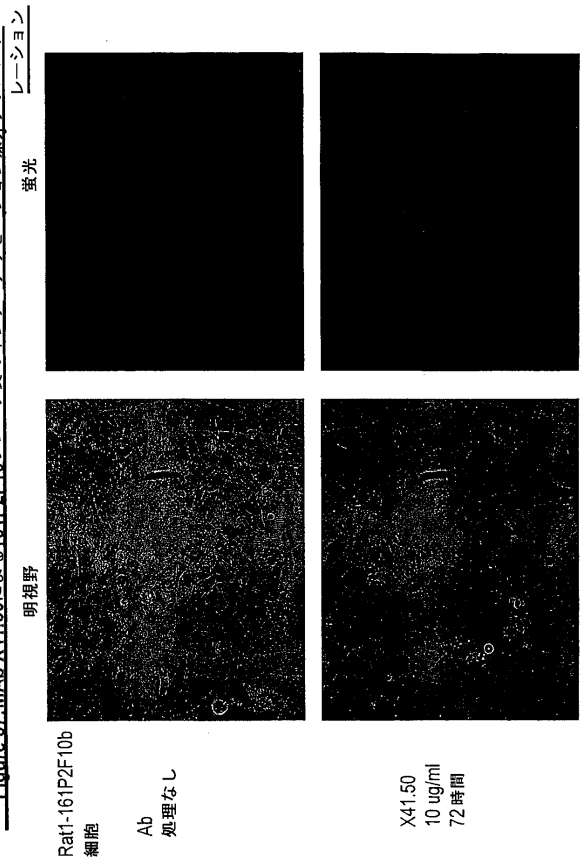


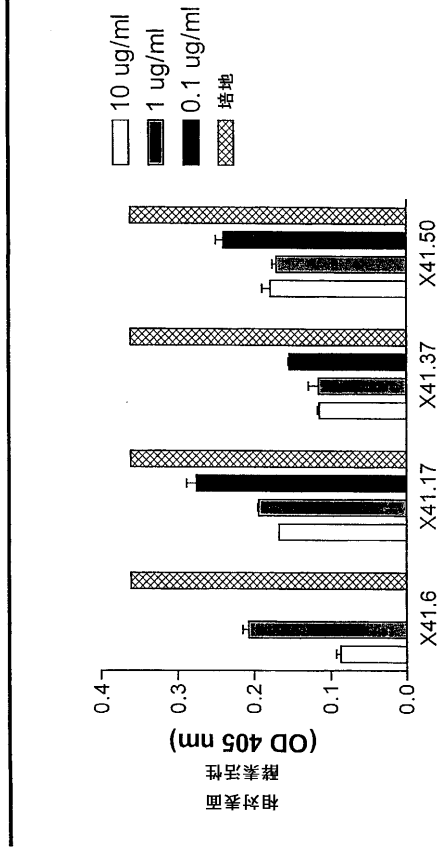
Figure 37: MAb X41.50による161P2F10タンパク質のインターナリゼーション媒介ダウソウレギュ

【 図 3 7 】



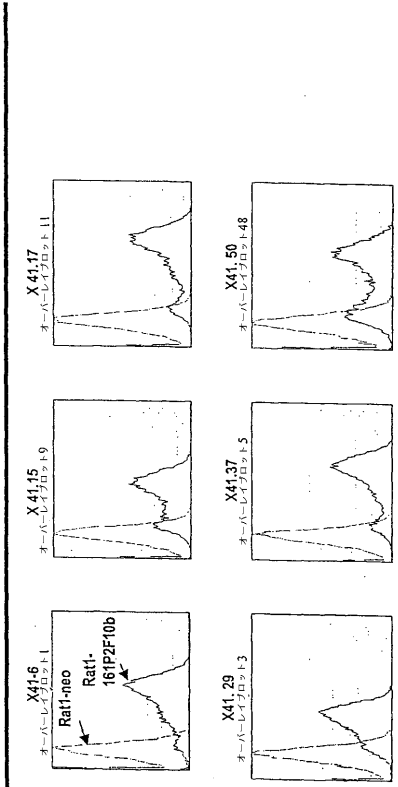
【 図 3 8 】

Figure 38: 抗161P2F10b MAbは、表面161P2F10b酵素活性をダウンレギュレートする



【 図 4 0 】

Figure 40: 選択された抗161P2F10b MAbの表面染色



Rat1-161P2F10b細胞を示したMAbを用いずに、または種々の濃度の示したMAbを用いて48時間にわたって処理し、次いで表面酵素活性についてアッセイした。

【 図 3 9 】

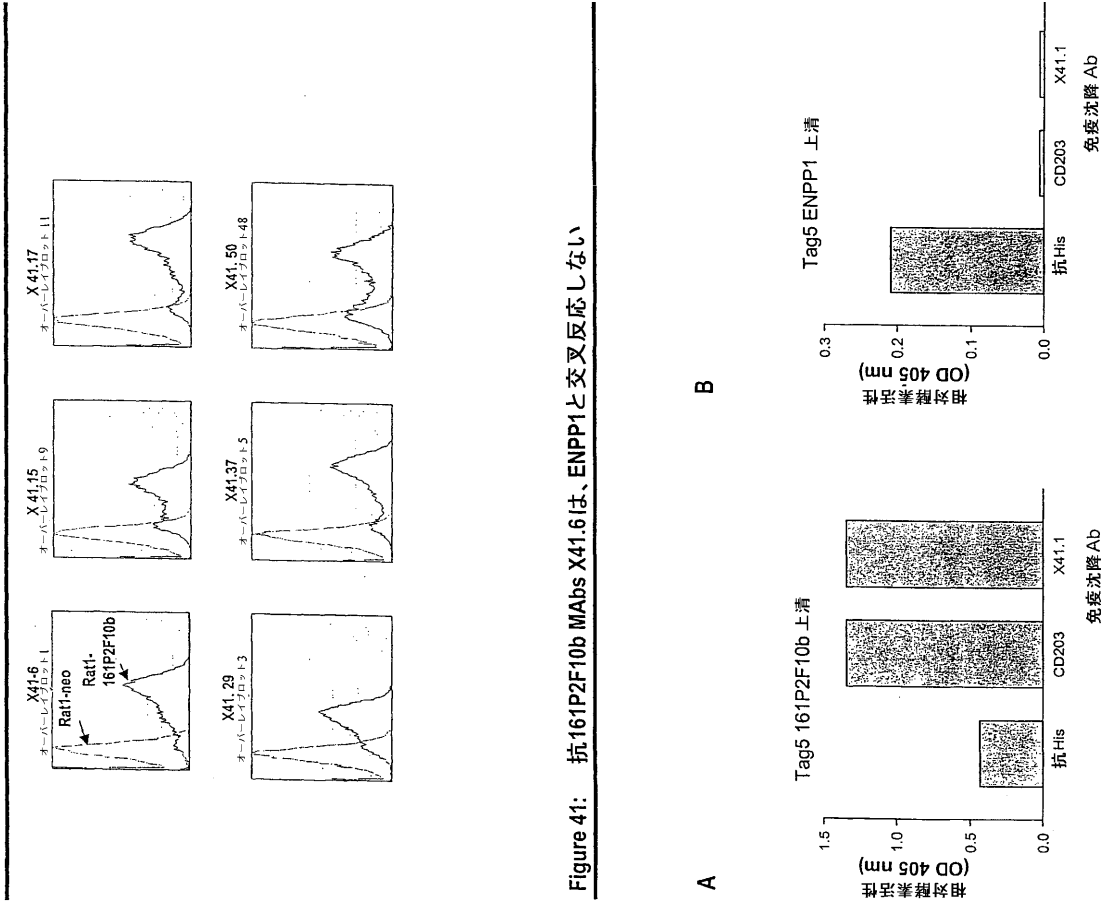
Figure 39: マウス161P2F10b MAbの特徴

MAb クローン	アインタイプ	相対親和性 (nM)	表面染色	インダーナリ センション (FACS)	酵素活性のダウンレギュレーション	特異的 JHC 染色	エピトープ フアミリー
X41(4)6	IgG1	0.09	s	++	m	s	1
X41(3)15	IgG2b	0.23	m	+	-	s	1
X41(3)17	IgG1	0.12	s	+++	s	m	2
X41(3)29	IgG2a	169.9	w	+	-	s	ND
X41(3)37	IgG1	0.24	m	+++	s	s	2
X41(3)50	IgG1	0.09	s	+++	s	s	2
97A6(CD203c)	IgG1	0.28	s	+++	ND	s	2

s = 強い +++
 m = 中程度 ++
 w = 弱い +
 ND = 決定せず

【 図 4 1 】

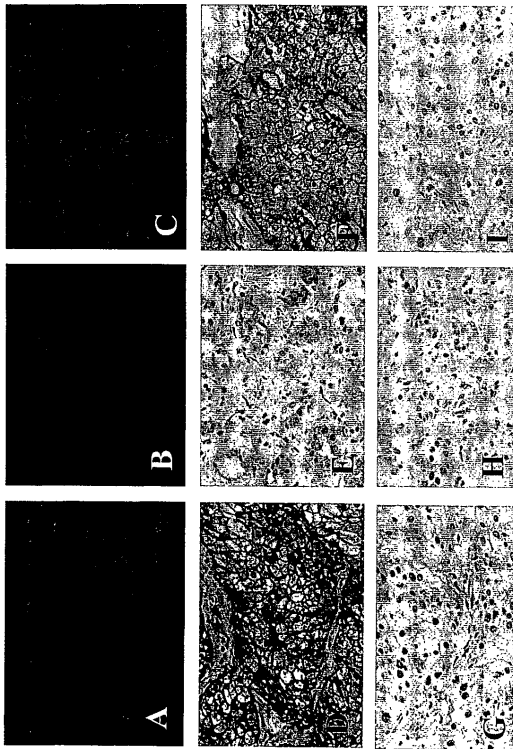
Figure 41: 抗161P2F10b MAbs X41.6は、ENPP1と交叉反応しない



【 図 4 1 】

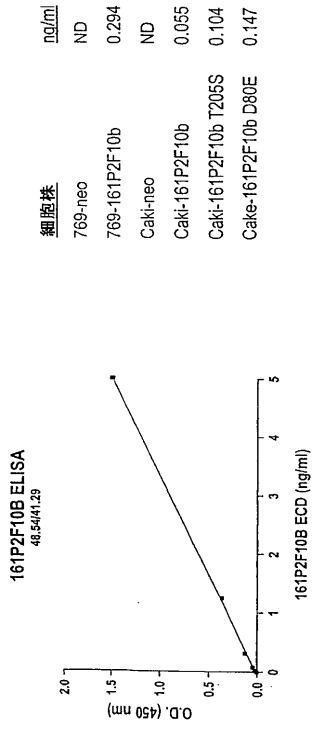
Figure 41: 抗161P2F10b MAbs X41.6は、ENPP1と交叉反応しない

Figure 44: 腎臓癌患者標本における免疫組織化学による161P2F10Bタンパク質の発現



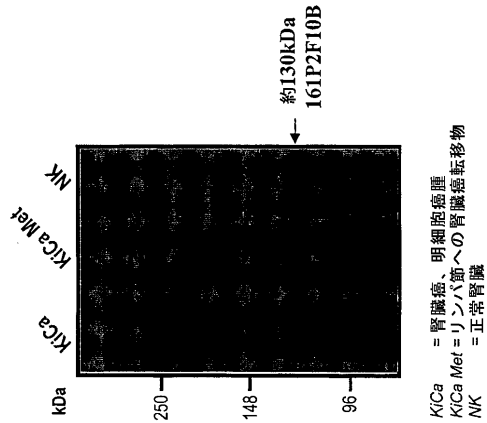
【 図 4 4 】

Figure 42: 161P2F10b発現細胞の馴化培地中での161P2F10bの検出



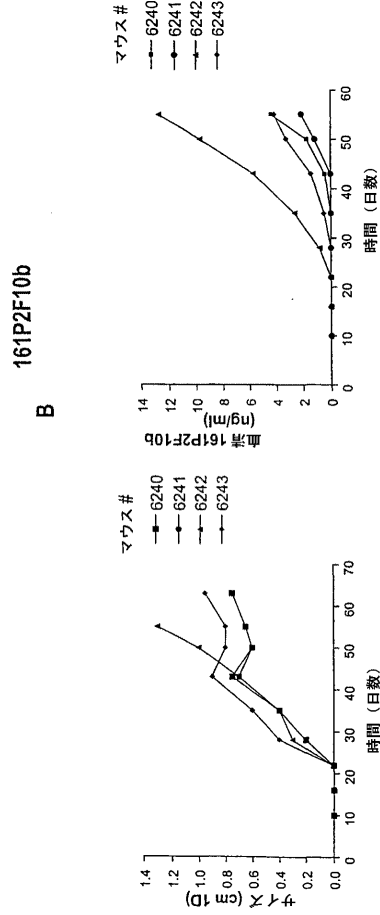
【 図 4 2 】

Figure 45: ウェスタンプロットによるヒト患者癌における161P2F10Bの発現



【 図 4 5 】

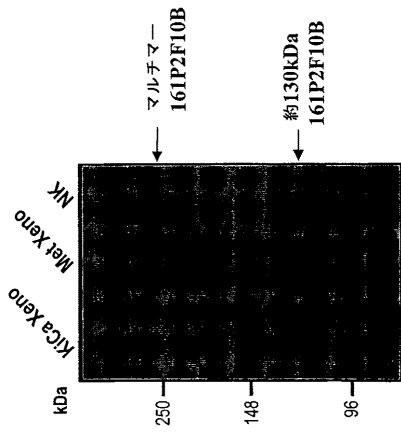
Figure 43: UGK3ヒト腎臓癌異種移植片を保有するマウスの血清中に分泌された161P2F10bの検出



【 図 4 3 】

マウスに、UGK3異種移植片細胞を移植し、そして腫瘍サイズについて示した時間にもモニタリングし、そして採血して161P2F10b補捉ELISAにより血清中の161P2F10bの発現を測定した。

Figure 46 ウェスタブロットによるヒト異種移植片組織中での
161P2F10Bの発現



K1Ca Xeno = 腎臓癌、明細胞癌腫の異種移植片
 Met Xeno = 腎臓癌転移物からリンパ節への異種移植片
 NK = 正常腎臓

【配列表】

0004299872000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) A 6 1 P 35/00
 C 1 2 P 21/08
- (72)発明者 アーサー ビー . ライタノ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 6 6 , ロス アンジェルス , ローズ アベニュー
 1 2 6 8 5
- (72)発明者 マリー ファリス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 7 7 , ロス アンジェルス , アルマデン コート
 2 5 3 8
- (72)発明者 レニー エス . ヒュバート
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 2 6 , ロス アンジェルス , エヌオー . オクシデ
 ンタル ブールバード 1 6 4 4
- (72)発明者 ゲ ワンマオ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 2 3 0 , カルバー シティ , ホロー コーナー ロ
 ード 4 8 3 8 , アpartment ナンバー 3 1 4
- (72)発明者 カレン ジェーン メイリック モリソン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 4 0 3 , サンタ モニカ , イェール ストリート 1
 0 4 4
- (72)発明者 ロバート ケンダル モリソン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 4 0 3 , サンタ モニカ , イェール ストリート 1
 0 4 4
- (72)発明者 ピア エム . チャリット - エイド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 4 3 6 , エンチノ , モリソン ストリート 1 5 7 4
 5

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 3 6 6 0 2 (WO , A 1)
 Genomics. 1997, Vol.45, No.2, p.412-415
 The Journal of biological chemistry. 1995, Vol.270, No.17, p.9849-9855
 Nature genetics. 1998, Vol.20, No.1, p.25-30

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 Pub Med
 SwissProt / PIR / GeneSeq
 GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq