



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-91402

54. TÍTULO

ANTICUERPO CONTRA ANTIGENO ESPECIFICO DE TUMOR COMO

OBJETO

1. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K 39/395, A61K 48/00

1. SOLICITANTE

SANKYO COMPANY LIMITED

DOMICILIO

Tokio, Japón.

4. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén.

2. BOGOTA, D.C.,


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación: 00001402 00000000

Folios: 240

Fecha (Año): 2004-09-09 17:29:42

Remite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA:

Dependencias 2004 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

10-10-05

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

 Nombre: **SANKYO COMPANY LIMITED**
 sociedad constituida y existente bajo las
 leyes de JAPON

 Dirección: 5-1, Nihonbashi-honcho 3-
 Chome, Chuo - Ku,
 Tokio,
 Japón

Domicilio: Tokio, Japón

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

 Nombre: **EMILIO FERRERO**
 Dirección: **Carrera 4ª. No. 72-35**
 Teléfono: **347 36 11**
 Fax: **211 86 50**
 E-mail: **clientes@camyp.com.**
 Domicilio: **Bogotá, Colombia.**
IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

 Número **438.019** T.P **31.929**

4

**INVENTOR (ES)
(72)**
1. Kimihisa ICHIKAWA

 c/o Sankyo Company Limited
 2-58, Hiromachi 1-chome,
 Shinagawa-Ku
 Tokyo 1408710
 Japón

2. Shu TAKAHASHI

 c/o Sankyo Company Limited
 2-58, Hiromachi 1-chome,
 Shinagawa-Ku
 Tokyo 1408710
 Japón

3. Toshinori AGATSUMA.

 c/o Sankyo Company Limited
 2-58, Hiromachi 1-chome,
 Shinagawa-Ku
 Tokyo 1408710
 Japón

4. Kelsuke FUKUCHI

 c/o Sankyo Company Limited
 2-58, Hiromachi 1-chome,
 Shinagawa-Ku
 Tokyo 1408710
 Japón

5. Takehiro HIRAI

 c/o Sankyo Company Limited
 2-58, Hiromachi 1-chome,
 Shinagawa-Ku
 Tokyo 1408710
 Japón

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/JP2004/003048

 Fecha: 9 de Marzo de 2004

 Publicación Internacional No. WO2004/081050 A1

 Fecha: 23 de Septiembre de 2004

6

Título (54)
**ANTICUERPO CONTRA ANTIGENO ESPECIFICO
DE TUMOR COM OBJETIVO**

7

Clasificación Internacional (51) CO7K16/32

8

Pri ridad**(33) País de Origen****(32) Fecha****(31) Número de Solicitud**SI ☒ NO ☐JP10 de Marzo de 20032003-063648

9

Comprobante de pago No: 05-67.464**Fecha: 5 de Septiembre de 2005**

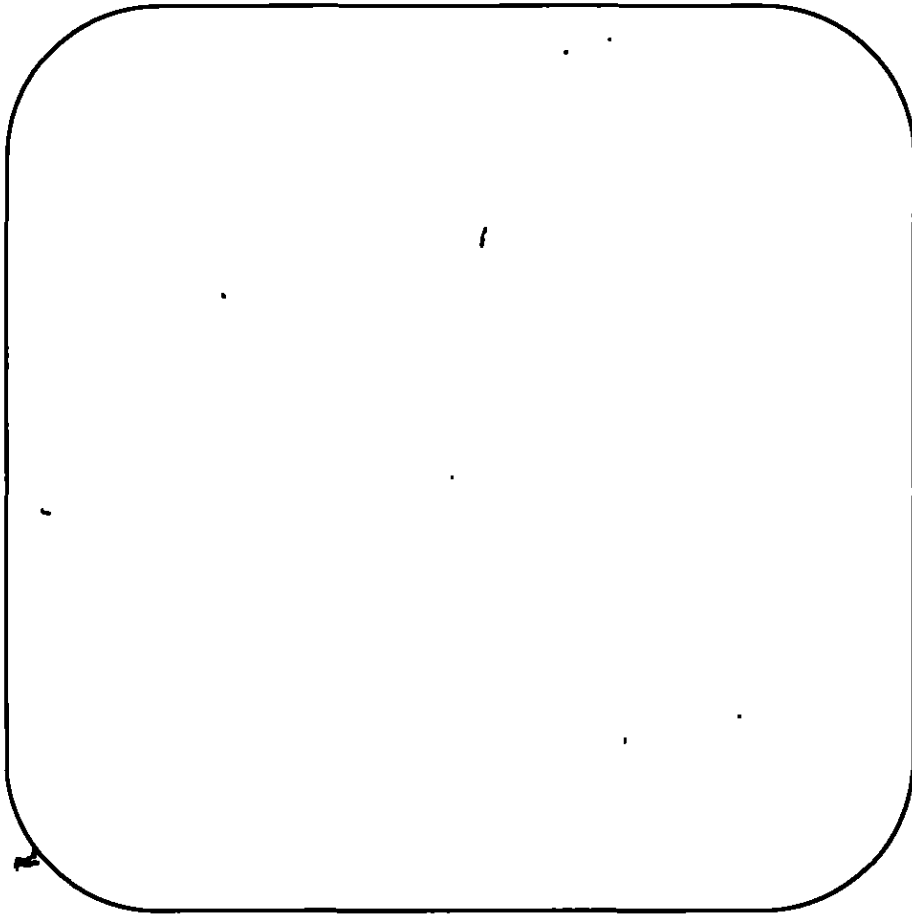
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

PRP

Johan.

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2004/081050 A1**

Descripción:

Páginas 1-77 en el idioma original

Páginas 1-142 en español

Reivindicaciones: Número (s) 1-27

Figuras: Número (s) _____

2. ☐ **Forma PCT/RO/101. PCT Request**
3. ☐ **Forma PCT/RO/106. Invitation to Correct Defects.**
4. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
5. ☐ **Forma PCT/ISA/220. Notificación De La Transmisión Del Informe De Búsqueda Internacional Y De La Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional, O De La Declaración.**
6. ☐ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
7. ☐ **Forma PCT/IB/304. Notification Concerning Submission Or Transmittal Of Priority Document.**
8. ☐ **Forma PCT/IB/306. Notification Of The Recoding Of A Change.**
Descripción De Modificación:

9. ☐ **Forma PCT/IB/308. Notice Informing The Applicant Of The Communication Of The International Application To The Designated Offices.**
10. ☐ **Forma PCT/IB/332. Information Concerning Elected Offices Notified Of Their Election.**
11. ☐ **FORMA PCT/IB/345. Communication in cases for which no other form is applicable.**

12. ☐ **Forma PCT/IPEA/401. PCT Demand**
13. ☐ **Forma PCT/IPEA/402. Notification Of Receipt Of Demand By Competent International Preliminary Examining Authority.**
14. ☐ **Forma PCT/IPEA/408. Written Opinion.**
15. ☐ **Forma PCT/IPEA/416. Notification Of Transmittal Of The International Preliminary Examination Report.**
16. ☐ **Forma PCT/IPEA/409. Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
17. ☐ **Traducción Al Español Del Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
18. ☐ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
19. ☒ **Extracto de publicación.**

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, D. C. - COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

SANKYO COMPANY, LIMITED

of / domiciliado (s) en 5-1, 3-chome,

Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japan, hereby ratify the appls.

Nos. 01084567; 01084568; 01084570; 01084571; 01084572; 01084574; filed by Emilio Ferraro on Oct. 3/01

por el presente nominamos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y al ser tratado de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, reuniéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistír, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this / Dado y firmado hoy

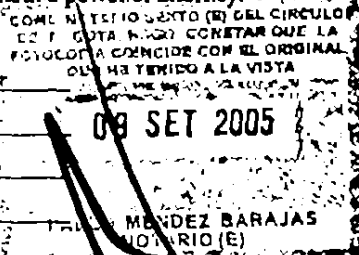
4th day of October, 2001

In/en Tokyo, Japan

X
Signature

Tetsuo Takato

Representative Director and President



© CAVELIER ABOGADOS

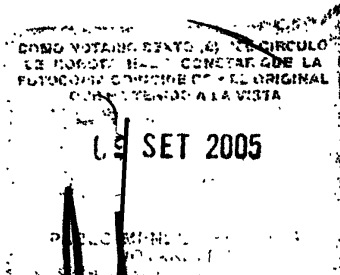
WPODERE-1 (MINUTA N° 12.1.12.5)

LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un *certificado consular* sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a *consular certificate*, on (1) the legal existence of the company which grants the Power-of-Attorney, (2) that it is in actual exercise of its company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

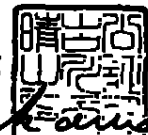


Registration No. 1021 of 2001

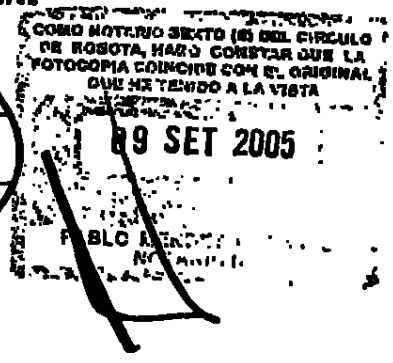
NOTARIAL CERTIFICATE

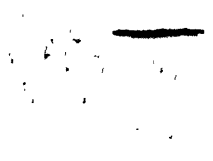
This is to certify that Tetsuo TAKATO who is Representative Director and President of SANKYO COMPANY, LIMITED, a corporation duly organized and existing under the Laws of Japan, located at 5-1, 3-chome, Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japan and who is authorized to sign the attached document, has acknowledged himself that signature on the foregoing document is his own.

Dated on this 4th day of October, 2001.

Motoharu Furukawa 

Notary: MOTOHARU FURUKAWA





09 SET 2005

平成 13 年 登 簿 第 1021 号

認 証

嘱 託 人 三共株式会社 (本店 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号)

代表取締役 高藤鉄雄は、日本国法に基づいて設立された同会社を代表し

その権限に基づき添付証書に署名した旨、本公証人に対し自認した。

よつて、これを認証する。

平成 13 年 10 月 4 日、本公証人役場において

東京都千代田区麹町 5 丁目 2 番地 1

東京法務局所属

公証人

古川元晴



証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成 13 年 10 月 4 日

東京法務局長

寶金敏明

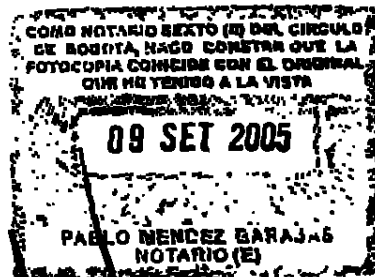
CERTIFICATE

This is to certify that the signature affixed above has been provided by Notary, duly authorized by the Tokyo Legal Affairs Bureau and that the Official Seal appearing on the same is genuine.

Date 4th October, 2001

Toshiaki HOUKIN

Director of the Tokyo Legal Affairs Bureau



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

This public document

2. has been signed by **Toshiaki HOUKEN**

3. acting in the capacity of **Director of the Tokyo Legal Affairs Bureau**

4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at **Tokyo**

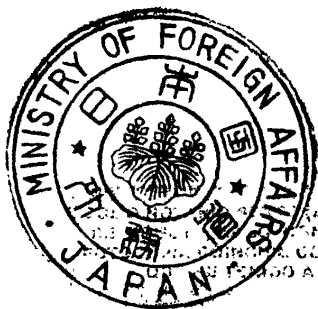
6. **4th October, 2001**

7. by the **Ministry of Foreign Affairs**

8. 01 - N^o 021583

9. Seal/stamp:

10. Signature:



T. Mochizuki

Takeshi MOCHIZUKI

For the Minister for Foreign Affairs

09 SET 2005

PABLO ELINDO BARAJAS
NOTARIO (E)

THE TOKYO CHAMBER OF COMMERCE AND INDUSTRY

3-2-2 MARUNOUCHI, CHIYODA-KU, TOKYO 100-0005, JAPAN PHONE: 81-3-3283-7610 FAX: 81-3-3201-6265

October 4, 2001

To whom it may concern :

Certificate

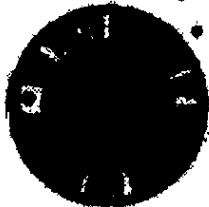
We hereby certify that the undermentioned company was established in accordance with Japanese Commercial Law.

Name of the company : SANKYO COMPANY, LIMITED

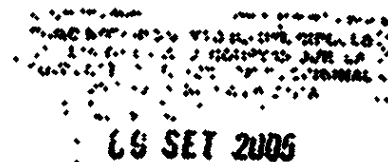
Registered address : 5-1, Nihonbashi-honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokyo

Date of establishment : March 1, 1913

The Tokyo Chamber of Commerce and Industry



Hiroyuki Amaya
Assistant Manager



9

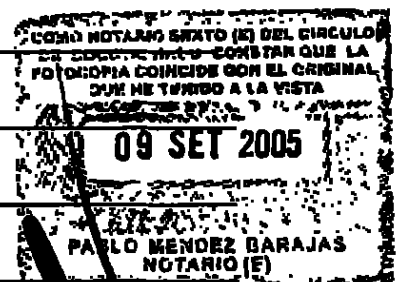
TRADUCCIÓN OFICIAL No. 12.10/01 realizada por Diego Vargas,
Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de
Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores
de Colombia.,

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un
documento de escrito en inglés y español por medio del cual
SANKYO COMPANY, LIMITED domiciliado en el 5-1, 3-chome,
Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokio, Japón por el presente ratifica
las solicitudes de registro de marca Nos. 01084567; 10184568;
01084570; 01084571; 01084572; 01084574, presentadas por el Dr.
Emilio Ferrero el 03 de octubre de 2001.

Y adicionalmente otorga derechos de Representación y Poder a los
Doctores GERMÁN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831;
EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555.

Dado y firmado hoy _____
4 de octubre de 2001

En Tokio, Japón



Director Financiero
Firma Tetsuo Takato Firma
Director y Presidente Representativo

(Anexo)

Registro No. 1021 de 2001

CERTIFICADO NOTARIAL

El presente es para certificar que Tetsuo TAKATO, quien
es Director y Presidente Representativo de SANKYO COMPANY,
LIMITED, una corporación debidamente constituida y existente de

10

acuerdo a las Leyes de Japón, ubicada en el 5-1, 3-chome,
Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokio, Japón y quien está autorizado
a firmar el adjunto documento, ha reconocido él mismo que la
firma en el anterior documento es la suya.

Fechado hoy 4 de octubre de 2001.

Firma ilegible

Notario: MOTOHARU FURUKAWA

Oficina de Asuntos Legales de Tokio
OFICINA NOTARIAL
5-2-1, Kojimachi, Chiyoda-ku,
Tokio, Japón

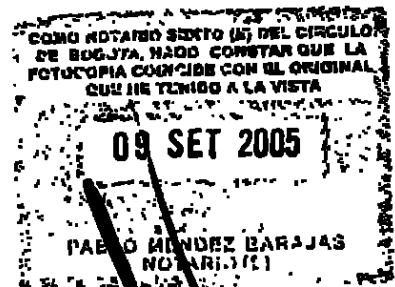
Sellos rojos cuadrados en la parte superior así como al lado de
la firma anterior.

LA CÁMARA DE COMERCIO E INDUSTRIA DE TOKIO

3-2-2 MARUNOUCHI, CHIYODA-KU, TOKIO 100-0005, JAPÓN TEL:81-3-3283-7610 FAX:81-3-3201-6265

Octubre 4 de 2001

A quien pueda interesar:



Certificado

Por el presente certificamos que la compañía mencionada a
continuación fue constituida de acuerdo a la Ley Comercial
Japonesa.

Nombre de la compañía: SANKYO COMPANY, LIMITED

12
11

Domicilio: 5-1, Nihonbashi-honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokio

Fecha de Constitución: 1 de Marzo de 1913

La Cámara de Comercio e Industria de Tokio

Firma Ilegible

Hiroyuki Amaya

Subdirector

Sello: LA CÁMARA DE COMERCIO DE TOKIO

B064302

Aparece un anexo en japonés con el número 1021 en la parte superior y con varios sellos cuadrados en el documento. En la parte inferior aparece texto en japonés en el

CERTIFICADO

El presente es para certificar que la firma colocada anteriormente ha sido otorgada por un Notario, debidamente autorizado por la Oficina de Asuntos Legales de Tokio y que el Sello Oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: 4 de octubre de 2001

Toshiaki HOUKIN

Director de la Oficina de Asuntos Legales

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por Toshiaki HOUKIN
3. actuando en capacidad de Director de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio
4. lleva el sello/estampilla de

CERTIFICADO

5. en Tokio
6. El 4 de octubre de 2001
7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores
8. 01- No. 021563
9. Sello/estampilla
10. Firma:



Firma

Takeshi MOCHIZUKI

Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

COMO NOTARIO ENTO (E) EL CIRCULO
EU DONOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

09 SET 2005

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta
oficina para su confrontación

/COLO 01579-701-005-3 /DVZ/ID-2743/WPCL002G/

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

200 OCT 12 P 12:13

Pedro
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LAS ANTERIORES FIRMA(S) PUESTA(S) POR *Diosdado*
Diosdado
Diosdado
IDENTIFICADOS CON C.C. No.(a) _____
ES(SON) AUTENTICA(S) _____
SANTA FE DE BOGOTA, 12 OCT. 2001



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

179830

Diosdado
YA FIRMADA APARECE EN EL
VOLUMEN DE DESEMPEÑO
DE LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA PUESTA POR *Diosdado* HA SIDO VERIFICADA CON EL ORIGINAL Y HA TENIDO A LA VISTA
09 SET 2005
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (F)

CAVELIER
AB GADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavelier@columsat.net.co

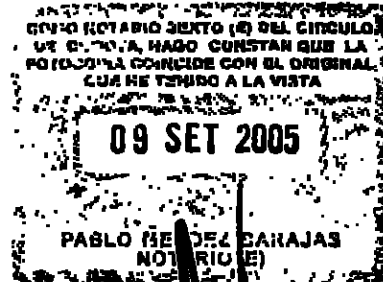
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: SANKYO COMPANY, LIMITED

Poder conferido el: 04-10-2001



Yo, GERMÁN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señora Jefe,

GERMÁN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:

EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén

2e-780-2

RECOMENDACIONES Y PRESENTACION PERSONAL

Engelke, U. G.

JUN 2002

NAME: JUAN MARCEL ROSSO MEDINA

ING. ARISTAYTO DEL CIRCULO DE ECOTIA

Հոդվածներ:

quiter (see) exhibito (exhibito) 1945 C.C.

78-779 24-428017
78-779 832-31928

que el contrato del mismo es claro, la cosa es
que se llama esto diferencia.

Gene C. Shi

Ernest C. Green



COMO NOT. DE BASTO (6) EL CIRCULO
DE LA CO. HAGO CONSTAR QUE LA
COPIA CONCORDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

09 SET 2005

PABLO MENDEZ BATISTA
NOTARIO

14

(12) 許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年9月23日 (23.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/081050 A1(51) 国際特許分類: C07K 16/32, C12N 15/12,
C12Q 1/68, G01N 33/574, C12P 21/08, A61K 31/7088,
39/395, 48/00, A61P 17/00, 35/00, 43/00(HIRAI, Takehiro) [JP/JP]; 〒1408710 東京都品川区
広町1丁目2番58号 三井株式会社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003048

(74) 代理人: 大野 彰夫, 外(OHNO, Akio et al.); 〒1408710
東京都品川区広町1丁目2番58号 三井株式会社
内 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004年3月9日 (09.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-063648 2003年3月10日 (10.03.2003) JP(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三井
株式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP];
〒1038426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
Tokyo (JP).(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 市川 公久
(ICHIKAWA, Kiyohisa) [JP/JP]; 〒1408710 東京都品
川区広町1丁目2番58号 三井株式会社内 Tokyo
(JP). 高橋 秀 (TAKAHASHI, Shu) [JP/JP]; 〒1408710
東京都品川区広町1丁目2番58号 三井株式会社内
Tokyo (JP). 我妻 利紀 (AGATSUMA, Toshiaki) [JP/JP];
〒1408710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三
井株式会社内 Tokyo (JP). 福地 圭介 (FUKUCHI,
Keisuke) [JP/JP]; 〒1408710 東京都品川区広町1丁
目2番58号 三井株式会社内 Tokyo (JP). 平井 岳大

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY AGAINST TUMOR SPECIFIC ANTIGEN AS TARGET

(54) 発明の名称: 癌特異的抗原を標的とした抗体

(57) Abstract: A method of detecting cancer with the use of oncogene; a method of screening compounds capable of exerting cancer
treating and/or preventing effects; and a pharmaceutical composition for cancer treatment and/or prevention. In particular, a method
of detecting cancer wherein the expression of human occluspanin gene is used as an index; and a pharmaceutical composition com-
prising an antibody capable of specifically recognizing human occluspanin and capable of exhibiting cytotoxic activity to carcinoma
cells.(57) 要約: 本発明は、癌遺伝子を用いた癌の検出方法、癌治療及び/又は予防効果を有する化合物のスクリーニ
ング方法、及び癌治療及び/又は予防用医薬組成に関する。すなわち、本発明は、ヒト・オキュロスパニン遺伝子の
発現を指標とした癌の検出方法、及び、ヒト・オキュロスパニンを特異的に認識し、癌細胞に対する細胞障害性活
性を有する抗体を含む医薬組成物を提供する。

WO 2004/081050 A1

明 細 書

癌特異的抗原を標的とした抗体

技術分野

本発明は、癌治療に用いることができる抗体、該抗体を有効成分として含有することを特徴とする癌治療用医薬組成物、癌の検出方法、癌の検出用キットに関する。

背景技術

腫瘍細胞は、細胞の種類に応じて固有な抗原蛋白質（以下、腫瘍関連抗原と記載することがある）を発現することが知られている。そこで、この腫瘍関連抗原をターゲットとして腫瘍に対する新たな治療方法を開発しようとする試みが検討されている。腫瘍関連抗原に対して特異的な抗原-抗体反応を示すモノクローナル抗体は、種々の生体免疫反応（抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ADCC）、補体依存性細胞傷害活性（CDC）等）を誘導して癌細胞を攻撃し、細胞死を誘導する事が知られているので、腫瘍の治療に有用なモノクローナル抗体が開発されている。

しかしながら、腫瘍の治療に有用なモノクローナル抗体は、転移性乳癌、急性骨髄性白血病、難治性慢性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫など、幾つかの腫瘍種に限られたものが知られているだけであり、他の腫瘍の治療に用いることができる、モノクローナル抗体の取得が求められていた。

腫瘍の治療に有用なモノクローナル抗体を取得するためには、腫瘍細胞で特異的に発現している蛋白質を同定し、該蛋白質を抗原としたモノクローナル抗体を取得することが有用である。

ヒト・オキュロスパニン（human oculospanin）は、網膜色素上皮及び眼球脈絡膜で発現している遺伝子よりイクスプレスト・シークエンス・タグ（Expressed Sequence Tag: EST）クローンとして取得された蛋白質である（Molecular Vision, (2002) 8, 25-220）。ヒト・オキュロスパニン遺伝子は 1068bp のオープン・リーディング・フレームを有し、ヒト・オキュロスパニンは 355 アミノ酸から

なり、DNA 配列から推定される分子量は、36.4kDa であるがヒト・オキュロスパニンと腫瘍との関係は明らかとはなっていない。

発明の開示

本発明は、癌で特異的に発現する遺伝子を見出し、該遺伝子の発現を検出することによる癌の検出方法、該検出方法に用いる癌検出用キット、該遺伝子の発現産物に特異的に結合し、細胞障害活性を持つ抗体、該抗体を有効成分として含む癌の治療用医薬組成物を提供することを目的とする。

本発明者はヒト癌組織で特異的に発現する遺伝子を探索し、機能が不明であった、ヒト・オキュロスパニン (human oculospanin) 遺伝子の発現量がメラノーマ細胞で顕著に増加していることを見出し、該遺伝子を用いた癌の検出方法、癌の検出用キット並びに、抗ヒト・オキュロスパニン抗体を含有する、癌治療用医薬組成物を提供し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、

- (1) ヒト・オキュロスパニンと特異的に結合し、該蛋白質を発現している細胞に対し細胞障害活性を持つ抗体、
- (2) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び／又は配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質と特異的に結合し、該蛋白質を発現している細胞に対し細胞傷害活性を持つ抗体、
- (3) 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害活性であることを特徴とする、(1) 又は (2) に記載の抗体、
- (4) 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害活性であることを特徴とする、(1) 又は (2) に記載の抗体、
- (5) 細胞傷害活性が補体依存性細胞性細胞傷害活性であることを特徴とする、(1) 又は (2) に記載の抗体、
- (6) 細胞傷害活性がアポトーシス誘導であることを特徴とする、(1) 又は (2) に記載の抗体、
- (7) モノクローナル抗体であることを特徴とする、(1) 乃至 (6) のいずれか一つに記載の抗体、
- (8) マウスハイブリドーマ O3B8-2C9-4F3 (FERM BP-

08627) から産生されることを特徴とする、(7) に記載の抗体。

(9) ヒト化されていることを特徴とする、(1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載の抗体、

(10) 完全ヒト抗体であることを特徴とする、(1) 乃至 (7) のいずれか一つに記載の抗体、

(11) IgG 抗体であることを特徴とする、(1) 乃至 (10) のいずれか一つに記載の抗体、

(12) 下記の工程 1) 乃至 4) を含む、癌の検出方法：

1) 被験者より採取した検体より、全 RNA 画分を抽出する工程；

2) 正常人より採取した検体より、全 RNA 画分を抽出する工程；

3) 上記工程 1) 由来の全 RNA 画分と上記工程 2) 由来の全 RNA 画分における、下記の a) 又は b) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

a) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

b) 上記 a) に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

4) 上記工程 1) 由来の全 RNA 画分と上記工程 2) 由来の全 RNA 画分との間における上記工程 3) によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記工程 1) に記載の被験者の癌を検出する工程、

(13) 下記の工程 1) 乃至 3) を含む、癌の検出方法：

1) 被験者より採取した検体における、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び／又は配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の発現量を測定する工程；

2) 正常人から採取した検体における、上記工程 1) に記載の蛋白質の少なくともいずれか一つの発現量を測定する工程；

3) 上記工程 1) で検出された蛋白質の発現量と上記工程 2) で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の癌を検出する工程、

(14) 癌が皮膚癌であることを特徴とする、(12) 又は (13) のいずれ

か一つに記載の方法、

(15) 癌がメラノーマであることを特徴とする、(12)又は(13)のいずれか一つに記載の方法、

(16) ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が、ノーザンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイ又はランオン・アッセイであることを特徴とする、(12)、(14)及び(15)のいずれか一つに記載の方法、

(17) ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が検体由来の相補的DNA群又は該DNA群の各DNAの部分配列からなるDNAで作製された遺伝子チップ又はアレイを用いることを特徴とする、(12)、(14)及び(15)のいずれか一つに記載の方法、

(18) 蛋白質の発現量の測定方法が、該蛋白質に特異的に結合する抗体又はリガンドを用いることを特徴とする、(13)乃至(15)のいずれか一つに記載の方法、

(19) 蛋白質の発現量の測定方法が、ウェスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法又は固相酵素免疫定量法(ELISA法)であることを特徴とする、(18)乃至(15)のいずれか一つに記載の方法、

(20) 下記(1)乃至(3)からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含む癌の検出用キット：

1) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを特異的に増幅するための15乃至30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；

2) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；

3) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドが固定された固相化試料。

(21) 下記(1)及び(2)の少なくとも一つを含む癌の検出用キット：

1) 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び／又は配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合し、

該蛋白質を検出するための抗体；

2) 上記1)に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

(22) 癌が皮膚癌であることを特徴とする、(20)又は(21)に記載のキット、

(23) 癌がメラノーマであることを特徴とする、(20)又は(21)に記載のキット、

(24) (1)乃至(11)に記載の抗体の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、癌の治療用医薬組成物、

(25) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列又は該配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを含む癌の治療用医薬組成物、

(26) 癌が皮膚癌であることを特徴とする、(24)又は(25)のいずれか一つに記載の医薬組成物、

(27) 癌がメラノーマであることを特徴とする、(24)又は(25)のいずれか一つに記載の医薬組成物、
からなる。

図面の簡単な説明

図1の上図は、各種細胞株内でのヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を示すグラフである。図1の下図は、健常人皮膚サンプルとメラノーマサンプルにおけるヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を示すグラフである。

図2の上図は、健常人皮膚サンプルと皮膚組織由来メラノーマサンプルにおけるヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を示すグラフである。図2の下図は、健常人皮膚サンプルとリンパ節組織由来メラノーマサンプルにおけるヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を示すグラフである。

図3は、健常人リンパ節由来サンプルとリンパ節組織由来メラノーマサンプルにおけるヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を示すグラフである。

図4は、ヒト・オキユロスバニン遺伝子産物のNIH3T3細胞での発現を示す図である。

図5は、ヒト・オキユロスバニン発現細胞を用いた抗ヒト・オキユロスバニ

17

ン抗体による抗体依存性細胞傷 活性を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本明細書中において、癌治療効果を有する化合物とは、癌の増殖を抑制する活性、癌を縮小する活性を有する化合物をいう。なお、本明細書中においては、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。本明細書中において、「遺伝子」という語には、DNAのみならずそのmRNA、cDNA及びそのcRNAも含まれるものとする。したがって、本発明における「ヒト・オキユロスバニン遺伝子」には、ヒト・オキユロスバニンのDNA、mRNA、cDNA及びcRNAが含まれる。本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれている。本明細書中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。また、本明細書中において、「RNA画分」とは、RNAを含んでいる画分をいう。また、本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。本明細書中において、「細胞の癌化」とは、細胞が接触阻止現象への感受性を喪失することや、足場非依存性増殖を示すこと等、細胞が異常な増殖を示すことをいい、このような異常な増殖を示す細胞を「癌細胞」という。本明細書においては、ヒト・オキユロスバニンが有する細胞の癌化活性等と同等の機能を有する蛋白質もヒト・オキユロスバニンという。なお本発明における癌遺伝子 (Oncogene) という語には癌遺伝子の他に癌原遺伝子、前癌遺伝子 (Proto-Oncogene) も含む。

本発明における、「細胞傷害」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化をもたらすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷をいう。本発明における「細胞障害活性」とは上記細胞傷害を引き起こすことをいう。

本発明において、「ストリンジントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液 ExpressHyb Hybridization Solution (クロンテック社製) 中、68℃でハイブリダイズすること、又は、DNAを固定したフィルターを用いて0.7-1.0MのNaCl存在下68℃でハイブリ

ダイゼーションを行った後、0.1-2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度SSCとは150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウムからなる）を用い、68℃で洗浄することにより固定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

1. ヒト・オキュロスパニン

(1) ヒト・オキュロスパニン遺伝子の特異的発現の確認

ヒト・オキュロスパニン遺伝子は、ヒト各種細胞株群における遺伝子の発現量の解析の結果、他の組織に比べてメラニン細胞で有意に高い発現量を示し、さらに、正常なメラニン細胞に比べメラノーマにおいて有意に発現量が増加していることが本発明者らによって見出された。例えば、メラニン細胞、リンパ芽、グリア細胞、上皮細胞の間でヒト・オキュロスパニンの発現量を比較すると、メラニン細胞で有意に発現量が高く、また、正常な皮膚細胞とメラノーマにおけるヒト・オキュロスパニンの発現量を比較すると、メラノーマにおいて顕著に発現量が高いことが、本発明者らによって見出された。したがって、ヒト・オキュロスパニンは細胞の癌化及び／又は癌細胞の増殖に関与していると考えられる。すなわち、ヒト・オキュロスパニンの各細胞、及び／又は各組織における発現量を測定することでヒト・オキュロスパニンの過剰発現に起因して発生する癌化及び／又は癌細胞、の増殖の状態を判定することができる。こ

ような癌としては、例えば、皮膚癌、特にメラノーマを挙げることができるが、ヒト・オキュロスパニンの発現量が他の組織より有意に増殖している癌であれば皮膚癌以外の癌にも適用することができる。

ヒト・オキュロスパニン遺伝子のオープン・リーディング・フレーム（Open Reading Frame: ORF）のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号1に示されており、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号2に示されている。ヒト・オキュロスパニンのcDNAは、GenBankにHomo sapiens oculospanin (OCSP), mRNA（アクセッション番号：NM_031945）として登録されており、GenBankに登録されているcDNAのヌクレオチド配列は、配列表の配列番号3にも示されており、ORFは配列番号3のヌクレオチド番号65乃至1129に示されている。また、GenBankに登録されているヒト・オキュロス

パニンのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列は配列表の配列 号4に示されている。なお、ヒト・オキユロスパニンのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加されたアミノ酸配列からなり、ヒト・オキユロスパニンと同等の生物活性を有する蛋白質もヒト・オキユロスパニンに含まれる。

2. 癌の検出方法

ヒト・オキユロスパニンは癌細胞、特にメラノーマで高い発現が認められるので細胞、特に皮膚細胞の癌化及び／又は癌細胞の増殖に関与していると考えられる。なお、「検体」とは、被験者や臨床検体等から得られた、血液、体液、前立腺、精巣、陰茎、膀胱、腎臓、口腔、咽頭、口唇、舌、歯肉、鼻咽頭、食道、胃、小腸、大腸、結腸、肝臓、胆嚢、脾臓、鼻、肺、骨、軟部組織、皮膚、乳房、子宮、卵巣、脳、甲状腺、リンパ節、筋肉、脂肪組織等の組織又は排泄物等の試料を意味するが、本発明においては皮膚又はリンパ節がより好ましい。

(1) ヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を利用した癌の検出方法

ヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を利用した癌の検出方法は、具体的には、以下の工程1)乃至4)を含む方法である。

- 1) 被験者より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
- 2) 正常人より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
- 3) 上記工程1)に記載の全RNA画分と上記工程2)に記載の全RNA画分におけるヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を測定する工程；
- 4) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分との間における上記工程3)によって測定された遺伝子の発現量の差を解析し、上記工程1)に記載の被験者の癌を検出する工程。

以下、各工程を具体的に説明する。

a) 工程1)被験者より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；

検体から全RNA画分を抽出するに際しては、適切な実験の倫理基準に適した方法で入手したヒト由来組織をRNA抽出用の溶媒（例えばフェノール等、リボヌクレアーゼを不活性化する作用を有する成分を含むもの）で直接溶解す

るか又は、該組織の細胞を破壊しないように、スクレーパーで慎重に掻きとるか、もしくはトリプシン等の蛋白質分解酵素を用いて穏やかに組織から細胞を抽出するなどの方法により、細胞を回収した後、速やかにRNA抽出工程に移行する。

RNAの抽出方法としては、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987), 162, 156-159) などを採用しうるが、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法が好適である。また、市販のRNA抽出用試薬（例えば、ISOGEN（ニッポンジーン（株）製）、TRIZOL試薬（ギブコ・ビーアールエル社製））等を試薬に添付のプロトコールに従って用いることもできる。

得られた全RNA画分は、必要に応じてさらにmRNAのみに精製して用いるのが好ましい。精製方法は特に限定されないが、例えばビオチン化したオリゴ(dT)プローブにmRNAを吸着させ、さらにストレプトアビジンを固定化した常磁性粒子に、ビオチン/ストレプトアビジン間の結合を利用してmRNAを捕捉し洗浄操作の後、mRNAを溶出することにより、mRNAを精製することができる。また、オリゴ(dT)セルロースカラムにmRNAを吸着させて、次にこれを溶出して精製する方法も採用し得る。ただし、本発明の方法のためには、これらmRNAの精製工程は必須ではなく、検出対象のポリヌクレオチドの発現の検出が可能である限りにおいて、全RNA画分をその後の工程に用いることもできる。

b) 工程2) 正常人より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程：本発明において、正常人とは、癌を有さない人を意味する。正常人であるか否かは、ヒト・オキユロスバニンの濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かで判定することもできるし、ヒト・オキユロスバニンの発現量と、正常人の癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者から採取した検体におけるヒト・オキユロスバニンの発現量を測定することによって被験者が、正常人であるか否かを判定することもできる。正常人よりの全RNA画分の調製は、上記工程1)と同様に行うこと

ができる。

c) 工程3) 上記工程1) に記載の全RNA画分と上記工程2) に記載の全RNA画分におけるヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を測定する工程:

ここで、ヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量は配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド又は、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドの発現量で示される。

ヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量の測定方法として、固相化試料を用いた測定方法と、その他のいくつかの測定方法について説明する。

(a) 固相化試料を用いた測定方法

(i) 固相化試料

固相化試料としては、例えば以下のものが挙げられる。

(イ) 遺伝子チップ:

データベース上のEST (e x p r e s s e d s e q u e n c e t a g) 配列又はmRNA配列をもとに合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドが固相化された遺伝子チップを用いることができる。このような遺伝子チップとしてはアフィメトリックス (A f f y m e t r i x) 社製の遺伝子チップ (Lipshutz, R. J. et al., Nature Genet. (1999) 21, suppliment, 20-24) を用いることができるが、これに限定されず、公知の方法に基づき作製してもよい。ヒト細胞由来のmRNAを解析する場合には、ヒト由来のものが好ましく、例えば、アフィメトリックス社製ヒトU95セット又はU133セットを用いることができる。しかしながら、それらに限定されず、例えば近縁種の動物由来のものも使用可能である。

(ロ) ヒト、全RNAあるいは特定の組織から得た全RNAより作製されたcDNA又はRT-PCR産物が固相化された、アレイ又はメンブレンフィルター:

上記cDNA又はRT-PCR産物は、ヒトのESTデータベース等の配列情報を基に作製されたプライマーで逆転写酵素反応やPCRを実施することによりクローン化されたものである。このcDNAやRT-PCR産物は、あら

はじめ腫瘍を有するヒトと腫瘍を有さないヒトの間で発現量の異なる全RNAを、サブトラクション法 (Diatchenki, L, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93, 6025-6030)、ディファレンシャルディスプレイ法 (Liang, P., et al Nucleic Acids Res., (1992) 20, 3685-3690) などを利用して選択されたものであってもよい。また、アレイやフィルターは市販のもの (例えば、インテリジェン: タカラバイオ社製等) を使用してもよいし、上記cDNAやRT-PCR産物を市販のスポッターで (例えば、GMS 417アレイヤー: タカラバイオ社製等) を用いて固相化することにより作製してもよい。

(11) プロープの作製と解析

標識プロープは、特定のmRNAクローンではなく、発現している全てのmRNAを標識したものを用いる。プロープ作製のための出発材料としては精製していないmRNAを用いてもよいが、前述の方法で精製したポリ(A)+RNAを用いることが望ましい。以下に、各種固相化試料を用いた場合の、標識プロープの調製方法と検出、解析方法について説明する。

(イ) アフィメトリックス社製造伝子チップ:

アフィメトリックス社製造伝子チップに添付されたプロトコール (アフィメトリックス社発現解析技術マニュアル) に従ってビオチン標識したcRNAプロープを作製する。次いでアフィメトリックス社製造伝子チップに添付のプロトコール (発現解析技術マニュアル) に従って、アフィメトリックス社製の解析装置 (GeneChip Fluidics Station 400) を用いてハイブリダイゼーション及び解析を行い、アビジンによる発光を検出、解析を行う。

(ロ) アレイ:

逆転写酵素反応でポリ(A)+RNAからcDNAを作製する際に、cDNAの検出ができるようにcDNAを標識しておくことが必要であり、蛍光色素で標識する場合には、蛍光色素 (例えばCy3、Cy5など) で標識されたd-UTPなどを加えておくことによりcDNAを蛍光標識する。このとき、メラノーマ細胞由来のポリ(A)+RNAと対照細胞由来のポリ(A)+RNAをそれぞれ異なる色素で標識しておけば、後のハイブリダイゼーション時には両者を混合して用いることができる。アレイとして例えば、タカラバイオ (株)

社の市販アレイを用いる場合、同社のプロトコールに従いハイブリダイゼーション及び洗浄を行って、蛍光シグナル検出機（例えばGMS 418 アレイスキャナー（タカラバイオ（株）社製）等）で蛍光シグナルを検出後、解析を行う。ただし、使用するアレイとしては市販のものに限定されず、自家製のもの、特別に作製したものでもよい。

（ハ）メンブレンフィルター：

逆転写酵素でポリ（A）⁺RNAからcDNAを作製する際に、放射性同位元素（例えば、d-CTP等を加えることにより標識プローブを調製し、常法によりハイブリダイゼーションを行い、例えば、市販のフィルター製マイクロアレイである、アトラスシステム（クロンテック社製）を用いてハイブリダイゼーション及び洗浄を行った後、解析装置（例えば、アトラスイメージ：クロンテック社製等）を用いて検出、解析を行う。

前記（イ）乃至（ハ）のいずれに記載の方法も、同一ロットの固相化試料にヒト各組織由来のプローブをハイブリダイズさせる。このとき、使用するプローブ以外のハイブリダイゼーション以外の条件は同じとする。蛍光標識プローブを用いる場合には、それぞれのプローブを異なる蛍光色素で標識しておけば一つの固相化試料に両プローブの混合物を一度にハイブリダイズさせて蛍光強度を読み取ることができる（Brown, P.O. et al. Nature Genet., (1999)21, supplement, p.33-37）。

（b） その他の測定方法

上記以外の測定方法としてサブトラクションクローニング法（実験医学別冊 新 遺伝子工学ハンドブック、羊土社刊（1996）p.32-35 参照）、ディファレンシャルディスプレイ法（基礎生化学実験法4 核酸・遺伝子実験 II.応用編、東京化学同人（2001）、p125-128）、レポーター遺伝子を用いた方法（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（例えば、pCAT3-Basicベクター：プロメガ社製を使用。）やβ-ガラクトシダーゼ（例えば、pβgal-Basic：プロメガ社製を使用。）、分泌型アルカリホスファターゼ（例えば、pSEAP2-Basic：クロンテック社製を使用。）、緑色蛍光蛋白質（green-fluorescent protein）（例え

ば、pEGFP-1：クロンテック社製を使用。))があるがこれらに限定されない。

工程4) 上記工程1) 由来の全RNA画分と上記工程2) 由来の全RNA画分との間における上記工程3)によって測定された遺伝子の発現量の差を解析し、上記工程1)に記載の被験者の癌を検出する工程。

正常人由来の検体と被験者由来の検体との間でヒト・オキユロスバニンの発現量の差を解析し、ヒト・オキユロスバニンの発現量が有意に増加している検体では癌、特に皮膚癌、更にはメラノーマが存在する可能性が高いと判定することができ、癌を検出することができる。発現量が有意に増加しているとは、例えば、アフィメトリックス社の遺伝子チップを用いて、アフィメトリックス社のmicroarray Suite Ver. 3.0を用いて解析した場合、メラノーマ細胞由来の遺伝子のAverage difference値が正常メラニン細胞に比べて有意に増加している場合をいう。

また、ヒト・オキユロスバニン遺伝子の濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かを解析し正常人の値として決められている範囲を超えている場合には癌を有すると判定することで癌を検出することもできるし、ヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量と、正常人の癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者から採取した検体におけるヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を測定することによって被験者が、正常人であるか否かを判定することもできる。

(3) ヒト・オキユロスバニンの発現量(蛋白質の発現量)を利用した癌の検出方法

ヒト・オキユロスバニンの発現量を利用した癌の検出方法は、具体的には、以下の工程1)乃至3)を含む方法である。

1) 被験者より採取した検体における、ヒト・オキユロスバニンの発現量を測定する工程：

2) 正常人より採取した検体における、上記1)に記載の蛋白質の発現量を測定する工程：

3) 上記工程1)で測定された蛋白質の発現量と上記工程2)で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の癌を検出する工程。

以下、各工程を具体的に説明する。

a) 工程1) 被験者より採取した検体における、ヒト・オキユロスバニンの発現量を測定する工程：

(a) 検体より蛋白質測定用試料の調製

検体は、必要に応じて高速遠心を行うことにより、不溶性の物質を除去した後、以下のようにELISA/RIA用試料やウエスタンブロット用試料として調製する。

ELISA/RIA用試料としては、例えば回収した、皮膚又はリンパ節をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈したものを用いる。ウエスタンブロット用（電気泳動用）試料は、例えば、皮膚又はリンパ節の抽出液をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈して、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用の2-メルカトルエタノールを含むサンプル緩衝液（シグマ（Sigma）社製等）と混合する。ドット/スロットブロットの場合は、例えば回収した皮膚又はリンパ節の抽出液そのもの、又は緩衝液で適宜希釈したものを、プロットング装置を使用するなどして、直接メンブレンへ吸着させる。

(b) 試料の固相化

上記のようにして得られた試料中の蛋白質を特異的に検出するためには、試料を免疫沈降法、リガンドの結合を利用した方法等によって、沈殿させ、固相化せずに検出することもできるし、そのまま検出する該試料を固相化することもできる。蛋白質を固相化する場合において、ウエスタンブロット法、ドットブロット法又はスロットブロット法に用いられるメンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン（例えば、バイオラッド社製等）、ナイロンメンブレン（例えば、ハイボンド-ECL（アマシャム・ファルマシア社製）等）、コットンメンブレン（例えば、プロットアブソーベントフィルター（バイオラッド社製）等）又はポリビニリデン・ジフルオリド（PVDF）メンブレン（例えば、バイオラッド社製等）等が挙げられる。

ELISA法/RIA法で蛋白質の検出・定量を行うためには、専用の96穴プレート（例えば、イムノプレート・マキシソープ（マシク社製）等）に試

又はその希釈液（例えば0.05% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」という）で希釈したもの）を入れて4℃乃至室温で

一晚、又は 37℃で 1 乃至 3 時間静置することにより、ウェル内底面に蛋白質を吸着させて固相化する。

ヒト・オキユロスバニンに対する抗体は、常法を用いて（例えば、*新生化学実験講座 1*、蛋白質 1、p. 389-397、1992 参照。）、ヒト・オキユロスバニン又はヒト・オキユロスバニンのアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, *Nature* 256, 495-497, 1975; Kennel, R. ed., *Monoclonal Antibody* p. 366-367, 1980, Plenum Press, N.Y.）に従って、ヒト・オキユロスバニンに対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

なお、抗原となるヒト・オキユロスバニンはヒト・オキユロスバニン遺伝子を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具

体的には、ヒト・オキユロスバニン遺伝子を発現可能なベクターを複製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したヒト・オキユロスバニンを精製すればよい。

(c) ヒト・オキユロスバニンの発現量の測定

ヒト・オキユロスバニンの発現量は、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の発現量で示される。

発現量の測定は、上記抗ヒト・オキユロスバニン抗体を用いてウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法等公知の方法を用いて測定することができる。

b) 工程 2) 正常人より採取した検体における、上記 1) に記載の蛋白質の発現量を測定する工程：

正常人より採取した検体におけるヒト・オキユロスバニンの発現量の測定は上記工程 1) と同様の方法で行うことができる。

c) 工程 3) 上記工程 1) で測定された蛋白質の発現量と上記工程 2) で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の癌を検出する工程。

正常人由来の検体と被験者由来の検体との間でヒト・オキユロスバニンの発現量の差を解析し、ヒト・オキユロスバニンの発現量が有意に増加している検

体では癌、特に皮膚癌、更にはメラノーマが存在する可能性が高いと判定することができ、癌を検出することができる。

また、ヒト・オキユロスバニンの濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かを解析し正常人の値として決められている範囲を超えている場合には癌を有すると判定することで癌を検出することもできるし、ヒト・オキユロスバニンの発現量と、正常人の癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者から採取した検体におけるヒト・オキユロスバニンの発現量を測定することによって被験者が、正常人であるか否かを判定することもできる。

3. ヒト・オキユロスバニン遺伝子及びヒト・オキユロスバニンの検定

ヒト・オキユロスバニン遺伝子及びヒト・オキユロスバニンは、ヒトの正常組織の間ではメラニン細胞で発現量が有意に増加しており、更に、正常なメラニン細胞に比べ、メラノーマで発現量が有意に増加している。

ヒト・オキユロスバニンの検定を調べる方法としては、まず、ヒト・オキユロスバニンを発現している細胞由来のヒトcDNAライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーション法等、公知の方法に従い、完全長cDNAを取得する。この完全長cDNAをマウス又はヒト細胞に導入して高発現させ、細胞に影響が生じるか否かを検討する。

cDNAを動物個体内で発現させるためには、得られた完全長cDNAをウイルスベクターに組み込み、動物に投与する方法が挙げられる。ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス等のDNAウイルス、又はRNAウイルスにcDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。なかでも、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が好ましい。

非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リボソーム法、リボフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等

が挙げられ、なかでも、DNAワクチン法、リボソーム法が好ましい。

また、培養細胞に対して、完全長cDNAをヒト、マウス、ラット等由来の筋肉細胞、肝細胞、脂肪細胞、あるいは筋肉細胞、肝細胞、脂肪細胞、皮膚細胞等へ導入し、高発現させ、各標的細胞の有する機能、具体的には、糖や脂質の産生や取り込み、あるいはグリコーゲンの蓄積等の糖脂質代謝を調節する機能、あるいは細胞の形態にどのような影響が現れるかを検討することができる。逆に、試験する遺伝子の全RNAに対するアンチセンス核酸を、細胞に導入し、各標的細胞の機能や形態にどのような影響が出るかを調べることもできる。

完全長cDNAを動物又は細胞に導入するにあたっては、適当なプロモーター及び形質発現に関わる配列を含むベクターに該cDNAを組み込み、該ベクターで宿主細胞を形質転換させる。脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上位に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. et al., Mol. Cell. Biol., (1981) 1, p. 864-864)、レトロウイルスベクターpLNCX、pLNSX、pLXIN、pSIR (クロンテック (Clontech) 社製)、コスミドベクターpAXCw (タカラバイオ社製) 等が挙げられるが、これに限定されない。該発現ベクターは、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G., Nucleic Acids Res. (1988) 11, p. 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. Virology, (1973) 52, p. 456-457)、及び電気パルス穿孔法 (Neumann, B. et al., EMBO J. (1982) 1, p. 841-845) などによりサルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC: CRL-1650) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO細胞、ATCC: CCL-61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, p. 4126-4220)、ヒト胎児腎臓由来293細胞 (ATCC: CRL-1573) 等に取り込ませることができるが、これらに限定されない。かくして所望の形質転換体を得ることができる。

また、遺伝子操作により、正常動物において、目的とする遺伝子が高発現す

るようにトランスジェニック動物を作製し、細胞の形態にどのような影響が現れるかを検討することも可能である。逆に、メラノーマを有する動物において、対象とする遺伝子を破壊したノックアウト動物を作製し細胞の状態を判定することができる。

4. ヒト・オキユロスバニン遺伝子及び／又はヒト・オキユロスバニン検出用キット

ヒト・オキユロスバニン遺伝子及び／又はヒト・オキユロスバニンは、以下の1)乃至5)からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含むキットを用いて検出することができる。

- 1) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを特異的に増幅するための15乃至30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；
- 2) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；
- 3) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドが固定された固相化試料；
- 4) 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；
- 5) 上記4)に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

前記1)に記載のプライマーは、ヒト・オキユロスバニン遺伝子のヌクレオチド配列（配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列）に基づき市販のプライマー設計ソフト（たとえば、Wisconsin GCG package Version 10.2）を用いる等、常法により容易に設計し、増幅することができる。このようなプライマーとしては例えば、配列表の配列番号1に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを増幅するためには配列表の配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号6に示されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドの組合せを使用することができる。また、前記2)に記載のプローブは、ヒト・オキユロスバニンに特異的にハイブ

リダイズするポリヌクレオチドであって、100乃至1500塩基長、好ましくは300乃至600塩基長である。これらのプライマーやプローブは、適当な標識によりラベル（例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等）されていてもよく、また、リンカーを付加していてもよい。

上記3）に記載の固相化試料は、上記2）に記載のプローブをガラス板、ナイロンメンブレン等の固相に固定することにより作製される。このような固相化試料の作成方法については、既に「2. 癌の検出方法」の項の「(1) ヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を利用した癌の検出方法」の項中の「(1) 固相化試料を用いた測定方法」の項で説明した通りであり、例えば、遺伝子チップ、cDNAアレイ、オリゴアレイ、メンブレンフィルター等を挙げることもできる。

本発明のキットには、更に耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTPの混合物) 及び緩衝液を含めることもできる。耐熱性DNAポリメラーゼとしてはTaq DNAポリメラーゼ、LA Taq DNA polymerase (宝酒造社製)、Tth DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼなどが例示できる。緩衝液は使用するDNAポリメラーゼに応じて選ばれ、必要に応じてMg²⁺などが添加されている。

前記、4）及び5）に記載の抗体は上記「2. 癌の検出方法」の項の「(3) ヒト・オキユロスバニンの発現量（蛋白質の発現量）を利用した癌の検出方法」の項や「5. 抗ヒト・オキユロバニン抗体の製造」の項に記載した方法により作製することができる。該抗体は、適当な標識によりラベル（例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等）されていてもよい。

本発明のキットはヒト・オキユロスバニン遺伝子及び／又はヒト・オキユロスバニンの検出に用いることができ、癌の有無の判定や、癌の増殖を抑制する薬のスクリーニングにも用いることができる。

5. 抗ヒト・オキユロバニン抗体の製造

(1) 抗原の調製

抗ヒト・オキユロバニン抗体を作製するための抗原としては、ヒト・オキユロバニン又はその少なくとも6個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペ

85
24

プチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導を
与えることができる。

ヒト・オキユロスパニン[®]は、ヒトの腫瘍組織あるいは腫瘍細胞から直接精製
して使用することができ、また、ヒト・オキユロスパニンを *in vitro* に
て合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得
ることができる。遺伝子操作では、具体的には、ヒト・オキユロスパニンを発現
可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー
物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主
細胞を形質転換させることによってヒト・オキユロスパニンを発現させることに
より、該蛋白質を得ることが出来る。ヒト・オキユロスパニンの cDNA のヌク
レオチド配列は、文献 (Graeme Wistow, Steven L. Bernstein, M. Keith Wyatt,
Robert N. Pariss, Amita Behal, Jeffrey W. Touchman, Gerard Bouffard, Don
Smith, and Katherine Perterson (2002) Expressed sequence tag analysis of
human RPE/choroids for the NEIBank Project: Over 6000 non-redundant
transcripts, novel and splice variants, Molecular Vision 8:2-5-220) に記
載されており、GenBank にアクセッション番号 NM_031945 で登録され
ており、また、その ORF は配列表の配列番号 1 に記載されている。ヒト・オ
キユロスパニンの cDNA は例えば、ヒト・オキユロスパニンを発現している
cDNA ライブラリーを鋳型として、ヒト・オキユロスパニン cDNA を特異
的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (以下「PCR」とい
う) [Saiki, R. K., et al. (1988) Science 239, 487-49 参照] を行なう、い
わゆる PCR 法により取得することができる。

ポリペプチドのイン・ビトロ (*in vitro*) 合成としては、例えばロ
シュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム (R
TS) が挙げられるが、これに限定されない。RTS を用いる場合を例に挙
げると、目的の遺伝子を T7 プロモーターにより制御される発現ベクターにク
ローニングし、これを *in vitro* の反応系に添加すると、最初に鋳型 D
NA より T7 RNA ポリメラーゼにより mRNA が転写され、その後大腸菌溶
液中のリボソーム等により翻訳が行われ、目的のポリペプチドが反応液中に
合成される (Biochemica, 1, 20-23 (2001), Biochemica, 2, 28-29 (2001))。

原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質 (表現型) の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

例えば、大腸菌としては K12 株などがよく用いられ、ベクターとしては、一般に pBR322 や pUC 系のプラスミドが用いられるが、これらに限定されず、公知の各種菌株、及びベクターがいずれも使用できる。

プロモーターとしては、大腸菌においては、トリプトファン (*trp*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (*lac*) プロモーター、リボプロテイン (*lpp*) プロモーター、ポリペプチド鎖伸張因子 Tu (*tufB*) プロモーター等が挙げられ、どのプロモーターも目的のポリペプチドの産生に使用することができる。

枯草菌としては、例えば 207-25 株が好ましく、ベクターとしては pTUB228 (Ohmura, K. et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93) などが用いられるが、これに限定されるものではない。枯草菌の α -アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードする DNA 配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182, ATCC CRL-1650)、マウス繊維芽細胞 NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞、ATCC CCL-61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220) 等がよく用いられているが、これらに限定されない。

脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、サイトメガロウイルス初

期プロモーターを有する pCDNA3.1 (インビトロジェン社製)、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864) 等が挙げられるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS細胞あるいはNIH3T3細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞あるいはNIH3T3細胞において自立増殖が可能であり、さらに、転写プロモーター、転写終結シグナル、及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターは、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 450-457)、及び電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845) などによりCOS細胞、あるいはNIH3T3細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、抗生物質G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989) : "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) やpSV2neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341) などをコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、目的のポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、又は細胞外に目的のポリペプチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、上記COS細胞であれば、RPMI1640培地やダルベッコ変法イーグル培地（以下「DMEM」という）などの培地に、必要に応じてウシ胎児血清などの血清成分を添加したものを使用できる。

上記培養により、形質転換体の細胞内又は細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば、

通常の蛋白質沈殿剤による処理、膜外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。また、発現させる組換え蛋白質にも残基からなるヒスチジンを繋げることににより、ニッケルアフィニティークラムで効率的に精製することができる。上記方法を組み合わせることにより容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

（２） 抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体の製造

ヒト・オキユロスバニンと特異的に結合する抗体の例として、ヒト・オキユロスバニンと特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。すなわち、

- （a）抗原として使用する生体高分子の精製、
- （b）抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、
- （c）骨髓腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、
- （d）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
- （e）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、
- （f）単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
- （g）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、
- （h）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその結合特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

（a）抗原の精製

抗原としては、前記したような方法で調製したヒト・オキユロスバニン又はその一部を使用することができる。また、ヒト・オキユロスバニン発現組換え体細胞より調製した膜画分、又はヒト・オキユロスバニン発現組換え体細胞自身、さらに、当業者所周知の方法を用いて、化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

(b) 抗体産生細胞の調製

工程 (a) で得られた抗原と、フロインドの完全又は不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法に用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、抽出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。また、実際に使用するマウス及びラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CB、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SVR、WB、129 等が、またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer 等を用いることができる。これらのマウス及びラットは例えば日本クレア、日本チャールスリバー、日本 SLC、The Jackson Laboratories 等実験動物飼育販売業者より入手することができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは BALB/c 系統が、ラットでは low 系統が被免疫動物として特に好ましい。また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ましい。なお、これらマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは 5～12 週齢、さらに好ましくは 6～8 週齢である。

ヒト・オキユロスバニン又はこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E.A. and Mayer, M.M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等に詳しく記載されている公知の方法を用いるこ

とができる。これらの免疫法のうち、この発明において好適な方法を具体的に示せば、たとえば以下のとおりである。すなわち、まず、抗原である膜蛋白質成分、もしくは抗原を発現させた細胞を動物の皮内又は腹腔内に投与する。ただし、免疫効率を高めるためには両者の併用が好ましく、前半は皮内投与を行い、後半又は最終回のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数3～6回、投与間隔2～6週間が好ましく、投与回数8～4回、投与間隔2～4週間がさらに好ましい。投与回数を過度に増やすと抗原を浪費し、また投与間隔を広げすぎると動物の老化による細胞の低活性化を招くために好ましくない。また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、0.05～5 ml、好ましくは0.1～0.5ml程度とする。追加免疫は、以上の通りの抗原投与の1～6週間後、好ましくは2～4週間後、さらに好ましくは2～8週間後に行う。この追加免疫の時期が6週間目より遅すぎるか、あるいは1週間目より早すぎると追加免疫の効果が少ない。なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等により異なるが、一般に、例えばマウスの場合には、0.05～5 ml、好ましくは0.1～0.5 ml、さらに好ましくは0.1～0.2 ml程度とする。不必要の大量投与は免疫効果を低下させるだけでなく、被免疫動物にとっても好ましいものではない。

上記追加免疫から1～10日後、好ましくは2～5日後、さらに好ましくは2～8日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞又はリンパ球を無菌的に取り出す。なお、その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性などの観点から、RIA法又はELISA法がより好適である。

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、精製又は部分精製した抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン(以下「B

SA」という)により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料(例えばマウス血清)に接触させ、上記抗原に試料中のモノクローナル抗体を結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

これらの脾臓細胞又はリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法(例えば、Kohler et al., *Nature*, 256, 495, 1975; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.*, 6, 511, 1977; Milstein et al., *Nature*, 266, 550, 1977; Walsh, *Nature*, 266, 495, 1977)に従って行うことができる。例えば、脾臓細胞の場合には、細胞を細切してステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地(MEM)に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的な方法を採用することができる。

(c) 骨髓腫細胞(以下、「ミエローマ」という)の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているHGPRT(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase)欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来のX68-Ag8(X68)、NS1-Ag4/1(NS1)、P8X63-Ag8.U1(P8U1)、X68-Ag8.653(X68.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-46.6TG1.7(46.6TG)、F0、S149/5XO、BU.1等、ラット由来の210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等、ヒト由来のU266AR(SK0-007)、GM1500-GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等である。これらのHGPRT欠損株は例えば、American Type Culture Collection(ATCC)等から入手することができる。

これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清(以下「FCS」という)を加えた培地に8-アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下「IMDM」という)、又はダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下「DMEM」という)で継代培養するが、細胞融合の3乃至4日前に正常培地[例えば、10% FCSを含む

ASF104培地（味の素（株）社製）で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

(d) 細胞融合

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法（Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E.A. and Mayer, M.M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等）に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下のとおりである。すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量 1500～6000、好ましくは 2000～4000 のポリエチレングリコール溶液中で、30～40℃、好ましくは 35～38℃の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを1～10分間、好ましくは5～8分間混合する。

(e) ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合により得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常HAT（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法（Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975); Milstein et al., Nature 256, 550 (1977)）が用いられる。この方法は、アミノプテリンで生存し得ないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマをHAT培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

(f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる（例えば Barbara, B.M. and Stanley, M.S. : Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1980) 参照）。このクローニング

法としては、プレートの1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニピレーターによって1個ずつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられる。これらの方法のうち、特に限界希釈法が好適である。この方法では、マイクロプレートにラット胎児由来繊維芽細胞株、あるいは正常マウス脾臓細胞、胸腺細胞、腹水細胞などのフィーダー(feeder)を接種しておく。一方、あらかじめハイブリドーマを0.2~0.5個/0.2mlになるように培地中で希釈し、この希釈したハイブリドーマの浮遊液を各ウェルに0.1mlずつ入れ、一定期間毎(例えば3日毎)に約1/3の培地を新しいものに交換しながら2週間程度培養を続けることによってハイブリドーマのクローンを増殖させることができる。

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2~4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。このようにしてクローニングされたハイブリドーマ株のひとつは、O3B8-2C9-4F3と命名され、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に2004年2月17日付けで、寄託番号FERM BP-08627として寄託されている。

(g) ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

このようにして選択されたハイブリドーマは、これを培養することにより、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、精製又は部分精製したヒト・オキユロスバニン、もしくはヒト・オキユロスバニンを発現させた細胞をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン(以下「BSA」という)により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料

(例えばマウス血清)に接触させ、上記抗原に試料中の抗ヒト・オキユロスバニン抗体を結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出す

。なお、このようなスクリーニングは、上記のようにハイブリドーマをクローニングした後で行ってもよいし、その前に行ってもよい。

以上の通りの方法によって得たハイブリドーマは、被体凍液中又は80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲル濾過等、当業者所周知の方法を用いて精製することにより、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス(例えば、上記

BALB/c)、あるいはNu/Nuマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。腹腔内に投与する場合には、事前(3～7日前)に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(2,6,10,14-tetramethyl pentadecane)(プリスタン)等の飼料油を投与すると、より多量の腹水が得られる。たとえば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、T細胞を不活性化した後、20日後に $10^4 \sim 10^7$ 個のハイブリドーマ・クローン細胞を血清を含まない培地中に浮遊(0.5ml)させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水にたまったところでマウスより腹水を採取する。この方法により、培養液中に比べて約100倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

上記方法により得たモノクローナル抗体は、例えばVeir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)に記載されている方法で精製することができる。すなわち、硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等である。これらの方法のうち、硫酸塩析法を3～4回、好ましくは3～6回繰り返すことによって、モノクローナル抗体

を精製することが可能である。しかしこの方法では精製モノクローナル抗体の収率が極めて低くなる。そのため、硫酸分画法を1～2回行った粗精製モノクローナル抗体について、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等から選ばれた少なくとも1種類、好ましくは2種類の方法を行うことによって、高純度に精製されたモノクローナル抗体を高収率で得ることができる。硫酸塩析法と他法との組合せ及び順序としては、a)硫酸塩析法－イオン交換クロマトグラフィー法－ゲル濾過法、b)硫酸塩析法－イオン交換クロマトグラフィー法－アフィニティークロマトグラフィー法、c)硫酸塩析法－ゲル濾過法－アフィニティークロマトグラフィー法等を例示することができるが、高純度でかつ高収率にモノクローナル抗体を得るためには、上記c)の組合せが特好ましい。

精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット(例えば、MAb Trap GIIキット;ファルマシア社製)等を利用することもできる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、ヒト・オキユロスバンに対して高い抗原特異性を有する。

(h) モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー

(Ouchterlony)法、ELISA法、又はRIA法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ELISA法又はRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット(例えば、マウスタイパーキット;パイオラッド社製)等を利用することもできる。

さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280nmにおける吸光度 $[1.4(OD_{280}) = \text{イムノグロブリン} 1 \text{ mg/ml}]$ より算出する方法により行うことができる。

(3) ヒト化抗ヒト・オキユロスバニン抗体の作製

免疫グロブリンG（以下、単に「IgG」という。）は、分子量約23000の軽ポリペプチド鎖（以下「軽鎖」という。）、分子量約50000の重ポリペプチド鎖（以下「重鎖」という。）各2本ずつから構成される。重鎖、軽鎖とも約110残基からなる、アミノ酸配列が保存されている領域の繰り返し構造を持ち、これらはIgGの3次元構造の基本単位（以下、「ドメイン」という。）を構成する。重鎖及び軽鎖は、それぞれ連続した4個、及び2個のドメインから構成されている。重鎖、軽鎖いずれにおいても、アミノ末端のドメインは他のドメインに比べ各抗体分子間でのアミノ酸配列の変異が大きく、このドメインは可変ドメイン（variable domain：以下、「Vドメイン」という。）と呼ばれる。IgGのアミノ末端においては、重鎖、軽鎖のVドメインが相補的に会合し可変領域を形成している。これに対し、残余のドメインは、全体として定常領域を形成する。定常領域は、各動物種に特徴的な配列を有し、例えば、マウスIgGの定常領域はヒトIgGの定常領域とは異なっているので、マウスIgGはヒトの免疫系によって異物として認識され、その結果、ヒト抗マウス抗体（Human Anti Mouse Antibody：以下「HAMMA」という。）応答が起こる（シュロッフら、Cancer Res., 45, 879-85 (1985)参照）。従って、マウス抗体はヒトに繰返し投与することはできない。このような抗体をヒトに投与するためには、抗体の特異性を保持したままHAMMA応答を起こさないように抗体分子を修飾する必要がある。

X線結晶構造解析の結果によれば、一般に、このようなドメインは3本から5本の β 鎖からなる逆平行 β シートが二層重なり合った長円筒状の構造をとる。可変領域では、重鎖、軽鎖のVドメインそれぞれにつき各3個のループが集合し、抗原結合部位を形成する。この各ループは相補性決定領域（complementarity determining region：以下、「CDR」という。）と呼ばれ、アミノ酸配列の変異が最も著しい。可変領域のCDR以外の部分は、一般に、CDRの構造を保持する役割を有し、「フレームワーク」と呼ばれる。カバトらは、重鎖、軽鎖の可変領域の一次配列を多数収集し、配列の保存性に基づき、それぞれの一次配列をCDR及びフレームワークに分類した表を作成した（カバトら、SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabati et al. 参照）。また、各フレームワークは、アミノ

酸配列が共通の特徴を有する複数のサブグループに分類された。さらに、ヒトとマウスの間で対応するフレームワークが存在することも見いだされた。

このようなIgGの構造的特徴に関する研究から以下のヒト化抗体の作製法が考案された。

研究初期の段階では、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体が提案された(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984) 参照)。しかし、そのようなキメラ抗体は、依然として、多くの非ヒトアミノ酸残基を含むので、特に長期間投与した場合にはHAMA応答を誘導しうる(Begentら Br. J. Cancer, 62, 487, (1990) 参照)。

ヒトに対しHAMA応答を誘導する可能性のある、非ヒトは哺乳動物由来のアミノ酸残基を更に少なくする方法として、CDR部分のみをヒト由来の抗体に組み込む方法が提案された(Nature, 321, 522-525, (1986)参照)が、一般に、抗原に対する免疫グロブリン活性を保持するにはCDRのみの移植では不十分であった。

一方、チョッチアらは、1987年、X線結晶構造解析データを用い、

(i) CDRのアミノ酸配列中には、抗原に直接結合する部位とCDR自体の構造を維持する部位とが存在し、CDRの取り得る三次元構造は、複数の典型的なパターン(カノニカル構造)に分類されること、

(ii)カノニカル構造のクラスは、CDRのみならずフレームワーク部分の特定の位置のアミノ酸の種類によって決定されること、を見いだした(J. Mol. Biol., 196, 901-917, (1987)参照)。

この知見に基づき、CDR移植法を用いる場合、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植する必要性が示唆された(特表平4-602408号参照)。

一般に、移植すべきCDRを有する非ヒト哺乳動物由来の抗体は「ドナー」、CDRが移植される側のヒト抗体は「アクセプター」と定義されるが、本発明もこの定義に従うことにする。

CDR移植法を実施する際に考慮すべき点は、可能な限りCDRの構造を保存し、免疫グロブリン分子の活性を保持することにある。この目的を達成するため：

- (i) アクセプターは、いずれのサブグループに属するものを選択すべきか；
(ii) ドナーのフレームワークからいずれのアミノ酸残基を選択すべきかの2点に留意する必要がある。

クィーンらは、ドナーのフレームワークのアミノ酸残基が、以下の基準の少なくともひとつに該当する場合、CDR配列とともにアクセプターに移植するデザインの方法を提唱した（特表平4-502408号参照）：

- (a) アクセプターのフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置において稀であり、ドナーの対応するアミノ酸がアクセプターの前記位置において普通である。
(b) 該アミノ酸がCDRのひとつのすぐ近くである。
(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約8Å以内に側鎖原子を有し、そして抗原と又はヒト化抗体のCDRと相互作用することができると予想される。

本発明の抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAは、上記抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを調製し、該mRNAを逆転写酵素でcDNAに変換してから、該抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAをそれぞれ離することにより得られる。

mRNAの抽出にあたっては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法なども採用しう

が、グアニジン・チオシアネート・塩化セシウム法が好適である。細胞からのmRNAの調製は、まず全RNAを調製し、該全RNAからオリゴ(dT)セルロースやオリゴ(dT)ラテックスビーズ等のポリ(A)⁺RNA精製用担体を用いて精製する方法、又は細胞ライセートから該担体を用いて直接精製する方法により実施できる。全RNAの調製方法としては、アルカリシソ密度勾配遠心分離法 [Dougherty, V. G. and Kleber, E. (1980) *Virology* 101, 466-474 参照]、グアニジンチオシアネート・フェノール法、グアニジンチオシアネート・トリフルオロセシウム法、フェノール・SDS法なども採用し得るが、グアニジンチオシアネート及び塩化セシウムを用いる方法 [Chirgwin, J. M., et al. (1979) *Biochemistry* 18, 5294- 5299 参照] が好適である。

上記のごとくして得られたポリ(A)⁺RNAを鋳型として、逆転写酵素反応により一本鎖cDNAを合成した後、この一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成することができる。この方法としてはS1ヌクレアーゼ法[Efstratiadis, A., et al. (1976) Cell 7, 279-288 参照]、グブラー-ホフマン法[Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) Gene 25, 263-269 参照]、オカヤマ-バーグ法[Okayama, H. and Berg, P. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 161-170 参照]等を採用し得るが、本発明においては、一本鎖cDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」という)[Saiki, R. K., et al. (1988) Science 239, 487-49 参照]を行なう、いわゆるRT-PCR法が好適である。

このようにして得られた二本鎖cDNAをクローニングベクターに組み込み、得られた組換えベクターを大腸菌等の微生物に導入して形質転換させ、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性等を指標として形質転換体を選択することができる。大腸菌の形質転換は、ハナハン法[Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580 参照]、すなわち塩化カルシウムや塩化マグネシウム又は塩化ルビジウムを共存させて調製したコンピテント細胞に、該組換えDNAベクターを加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合は、上記の薬剤耐性遺伝子を有することが必要である。また、プラスミド以外のクローニングベクター、例えばラムダ系のファージ等を用いることも可能である。

上記により得られた形質転換株から、目的の抗ヒト・オキキュロスバニンモノクローナル抗体の各サブユニットをコードするcDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。なお、上記RT-PCR法により目的のcDNAを特異的に増幅した場合は、これらの操作を省略することが可能である。

(a) ポリメラーゼ連鎖反応を用いる方法

目的蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部が解明されている場合、該アミノ酸配列の一部に対応するセンスストランドとアンチセンスストランドのオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、これらを組み合わせてポリメラーゼ連鎖反応[Saiki, R. K., et al. (1988) Science 239, 487-49 参照]を行ない、目的の抗ヒト・オキキュロスバニン抗体重鎖あるいは軽鎖サブユニットをコードす

DNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、例えば抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのmRNAより逆転写酵素反応にて合成したcDNAを用いることができる。

このようにして調製したDNA断片は、市販のキット等を利用して直接プラスミドベクターに組み込むこともできるし、該断片を 32 P、 32 Sあるいはビオチン等で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション又はブラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択することもできる。

例えば、本発明の抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体の各サブユニットの部分アミノ酸配列を調べる方法としては、電気泳動やカラムクロマトグラフィーなどの周知の方法を用いて各サブユニットを単離してから、自動プロテインシークエンサー（例えば、島津製作所（株）製 PPSQ-10）等を利用してそれぞれのサブユニットのN末端アミノ酸配列を解析する方法が好適である。

上記のごとくして得られた目的の形質転換株より、抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体蛋白質の各サブユニットをコードするcDNAを採取する方法は、公知の方法 [Maniatis, T., et al. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照] に従い実施できる。例えば細胞よりベクターDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAより目的とするサブユニットをコードするDNA領域を切り出すことにより行うことが可能である。

(b) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

目的蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部が解明されている場合（該配列は、複数個連続した特異的配列であれば、目的蛋白質のどの領域のものでもよい）、該アミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し（この場合、コドン使用頻度を参考に推測されるヌクレオチド配列、又は考えられるヌクレオチド配列を組み合わせた複数個のヌクレオチド配列のいずれも採用でき、また後者の場合イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる）、これをプローブ（ 32 P、 32 Sあるいはビオチン等で標識する）として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を選別する。

このようにして得られるDNAの配列の決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法 [Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) in "Methods in Enzymology" 65, 499-576 参照] やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 [Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276 参照] 等により実施することができる。

また近年、蛍光色素を用いた自動塩基配列決定システムが普及している（例えばパーキンエルマー・ジヤパン社製シークエンスロボット "CATALYST 800" 及びモデル 373ADNAシークエンサー等）。

こうしたシステムを利用することで、DNAヌクレオチド配列決定操作を効率よく、かつ安全に行うことも可能である。このようにして決定された本発明のDNAの各ヌクレオチド配列、及び重鎖及び軽鎖の各N末端アミノ酸配列データから、本発明のモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の全アミノ酸配列を決定することができる。

イムノグロブリンの重鎖及び軽鎖は、いずれも可変領域及び定常領域からなり、可変領域はさらに相補性決定領域（以下「CDR」と記す；重鎖・軽鎖ともに各3か所）及びそれらに隣接するフレームワーク領域（重鎖・軽鎖ともに各4か所）からなる。

このうち、定常領域のアミノ酸配列は、抗原の種類に関係なく、イムノグロブリンサブクラスが同一である抗体間では共通である。一方、可変領域、特にCDRのアミノ酸配列は各抗体に固有のものであるが、数多くの抗体のアミノ酸配列データを比較した研究によれば、CDRの位置やフレームワーク配列の長さは、同じサブグループに属する抗体サブユニットの間ではほぼ類似していることが知られている [Kabat, E. A., et al. (1991) in "Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol. II": U.S. Department of Health and Human Services 参照]。従って、例えば抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体の抗体の重鎖及び軽鎖の各アミノ酸配列とそれら公知のアミノ酸配列データとを比較することにより、各アミノ酸配列におけるCDRやフレームワーク領域及び定常領域の位置を決定することができる。なお、FRH₁、すなわち重鎖の最もN末端側のフレームワーク領域の鎖長については、通常（30アミノ酸）より短いことがあり、例えば、該フレームワーク領域が最小18アミノ酸であ

る例などが知られている [前出 Kabat et al. 参照]。このことから本発明の抗においては、抗ヒト・オキユロスバニン抗体としての機能を損なわない限りにおいて、重鎖のN末端のフレームワーク領域の鎖長を18アミノ酸以上30アミノ酸以下とするが、好適には30アミノ酸である。

なお、上記のようにして決定された軽鎖又は重鎖のそれぞれのCDRと同じアミノ酸配列、もしくはその中の連続した部分アミノ酸配列を有するペプチドを、人為的な修飾操作を施して該CDRが抗ヒト・オキユロスバニン抗体分子中で形成する立体構造に近付けることにより、単独でヒト・オキユロスバニンに対する結合活性を付与せしめることが可能である [例えば、米国特許第5381573号公報参照]。したがって、そのように修飾された、CDRと同じアミノ酸配列、もしくはその中の連続した部分アミノ酸配列を有するペプチドも、本発明の分子に包含される。

アミノ酸配列中の任意の一つもしくは二つ以上のアミノ酸を欠失させた改変を作製するにあたっては、カセット変異法 [岸本利光、"新生化学実験講座 2・核酸 III 組換えDNA技術" 242-251 参照] などに従うことができる。

この様な各種のDNAは、例えばフォスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M., et al. (1984) Nature 310, 105-111 参照] 等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドン、それ自体が公知であり、その選択も任意でよく、例えば使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定することも可能である。これらヌクレオチド配列コドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (サイトスペシフィック・ミュータジェネシス) [Mark, D.F., et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666 参照] 等に従うことができる。

また、あるDNAが本発明の抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAとハイブリダイズするか否かは、例えば、該DNAを、ランダムプライマー法 [Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) Anal. biochem. 132, 6-13 参照] やニクトランスレーション法 [Maniatis, T., et al. (1982) In "Molecular Cloning A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照] 等に従い [α - 32 P] dCTP等で標識したプローブ

DNAを用いて、以下に記載するような実験を行うことにより調べることができる。

まず調べようとするDNAを、例えばニトロセルロース膜やナイロン膜等に吸着させ、必要に応じてアルカリ変性等の処理を行ってから、加熱あるいは紫外線等により固相化させる。この膜を、 $6\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$ は 0.15M 塩化ナトリウム、 0.015M クエン酸三ナトリウム溶液)と 5% デンハート溶液、 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含むプレハイブリダイゼーション溶液に浸し、 55°C で4時間以上保温してから、先に調製したプローブを同様のプレハイブリダイゼーション溶液に最終比活性 $1\times 10^4\text{cpm/ml}$ となるように加え、 60°C で一晩保温する。その後、膜を室温下で $6\times\text{SSC}$ で5分間の洗浄する操作を数回繰り返し、さらに $2\times\text{SSC}$ で20分間洗浄してから、オートラジオグラフィーを行う。

上記のような方法を利用して、任意のcDNAライブラリー又はゲノムライブラリーから、本発明のヒト化抗ヒト・オキユロスバニン抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAとハイブリダイズするDNAを単離することができる [Maniatis, T., et al. (1982) in "Molecular Cloning A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照]。

上記のごとくして得られる各DNAを、それぞれ発現ベクターに組み込むことにより、原核生物又は真核生物の宿主細胞に導入し、それらの宿主細胞で各遺伝子を発現させることが可能である。発現方法は上記「5. 抗ヒト・オキユロスバニン抗体の製造」の項の「(1) 抗原の調製」の項に記載した方法と同一の方法によって行うことができる。

形質転換体の細胞内又は細胞外に生産される、抗ヒト・オキユロスバニン抗体蛋白質を含む画分は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種公知の蛋白質分離操作法により、分離・精製することができる。かかる方法としては、具体的には例えば通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種クロマトグラフィー、透析法、及びこれらの組合せ等を採用できる。

抗ヒト・オキユロスバニンマウスモノクローナル抗体をヒト化するためには、決定されたCDR配列全体及びFR配列の一部のアミノ酸残基をヒト抗体へ移植するように、可変領域のアミノ酸配列を設計する必要がある。この設計は、以下の方法に従う。

従来、ヒト化のデザインを行う場合、アクセプターのサブグループの選択指針としては、a)天然のアミノ酸配列を有する公知のヒト抗体の重鎖、軽鎖の天然の組合せをそっくりそのまま用いる、

b)重鎖、軽鎖が属するサブグループとしての組合せは保存するが、重鎖、軽鎖としては、それぞれ異なるヒト抗体に由来し、ドナーの重鎖、軽鎖のアミノ酸配列と同一性が高いアミノ酸配列、又は、コンセンサス配列を用いる、

いずれかが選択されている。本発明においても、上記の指針に従うことができるが、これらと異なる方法として、

c)サブグループの組合せを考慮することなく、ドナーのFRと最も同一性の高い重鎖、軽鎖のFRをヒト抗体の一次配列のライブラリーの中から選択する、という方法を採用することも可能である。これらの選択法により、ドナー及びアクセプター間での、FR部分のアミノ酸の同一性を少なくとも70%以上とすることが可能となる。この方法を採用することにより、ドナーより移植するアミノ酸残基の数をより少なくすることが可能となり、HAMA応答誘導を減少させることができる。

また、抗体分子の一次配列より三次構造を予測する操作（以下、この操作を「分子モデリング」という）はその予測精度に限界があり、そのドナーが属するサブグループにおいて稀にしか出現しないアミノ酸残基の役割を十分に特定することができない。クィーンらの方法に従い、かかる位置においてドナー、アクセプターのいずれのアミノ酸残基を選択すべきかを判断することは一般に困難である。c)の選択法によれば、このような判断をする機会を著しく減少することができる。

本発明者らは、ドナーのCDRの構造及び機能を維持するために重要なドナーのFR由来のアミノ酸を同定するための新規な方法を提供することによって、このヒト化の方法をさらに改良している。

軽鎖、重鎖それぞれのヒトアクセプター分子が選択された後、ドナーのFR

34

より移植するアミノ酸残基を選択する方法は、以下に記載する通りである。

ドナーとアクセプターのアミノ酸配列を並べ、両者のFRの対応する位置でアミノ酸残基が異なっていた場合、どちらの残基を選択すべきかを決定する必要があるが、この選択においては、ドナー由来のCDRの三次元構造を損なわないよう選択を行う必要がある。

クィーンらは前述の特表平4-502408号において、FR上のアミノ酸残基が、以下の要件の少なくともひとつに該当する場合、CDR配列とともにアクセプターに移植する方法を提唱した：

- 1) アクセプターのヒトFR領域中のアミノ酸がその位置において稀であり、ドナーの対応するアミノ酸がアクセプターの前記位置において普通である；
- 2) 該アミノ酸がCDRのひとつのすぐ近くである；
- 3) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内に側鎖原子を有し、そして抗原と又はヒト化抗体のCDRと相互作用することができると予想される。

ここで2)で示された残基はしばしば3)の性質を示すことより、本発明ではこの2)の要件を削除し、別に新たに2種の要件を設ける。すなわち、本発明では、CDRと共に移植すべきドナーのFR上のアミノ酸残基については：

- a) アクセプターのFR中のアミノ酸がその位置において稀でありドナーの対応するアミノ酸が当該位置において普通であるか；
- b) 該アミノ酸が三次元構造モデルにおいて、CDRの構成アミノ酸原子と抗原又は移植すべきCDRループとの相互作用が予想されるか；
- c) 当該位置がカノニカルクラス決定残基であるか；
- d) 当該位置が重鎖と軽鎖の接触面を構成するか、

である場合に、ドナーのFRから当該アミノ酸残基を移植することにする。

a)の要件では、前述したカバトの表に従い、同一サブクラスの抗体について当該位置で90%以上の頻度で見いだされるアミノ酸を「普通」、10%未満の頻度で見いだされるアミノ酸を「稀」と定義する。

c)の要件では、「当該位置がカノニカルクラス決定残基であるか」否かについては、前述したチョッチアの表に従い、一義的に決定することができる。

b)、d)の要件については、予め抗体可変領域の分子モデリングが必要とな

る。分子モデリング用ソフトウェアとしては、市販のものならいずれのものも採用し得るが、好適には、A b M（オックスフォード・モレキュラー・リミテッド社製）を使用することができる。

分子モデリングの予測精度には一定の限界があるので、本発明においては、種々の抗体の可変領域のX線結晶解析の実験結果を参照することにより、分子モデリングから得られる構造予測の確からしさを2段階に区別する。

本発明においては、A b M等の分子モデリング用ソフトウェアによって構築されたところの可変領域の3次元構造において、2原子間の距離が、各々のファンデルワールス半径の和に0.5 Åを加えた値より短いとき、当該2原子間はファンデルワールス接触していると推定した。主鎖及び側鎖のアミド窒素、カルボニル酸素など極性の原子間距離が平均の水素結合距離である2.9 Åに0.5 Å加えた距離より短い場合は、その間に水素結合が存在すると推定した。さらに、相反する電荷を持つ原子間が、2.85 Åに0.5 Å加えた距離より短い場合は、その間にイオン対が形成されているものと推定した。

一方、種々の抗体の可変領域のX線結晶構造解析の実験結果から、サブグループと無関係に、高頻度にCDRとの接触が見いだされるFR上の位置として、軽鎖では、1、2、3、4、5、29、35、36、46、48、49、58、69、71、88番の位置、重鎖では、2、4、27、28、29、30、36、38、46、47、48、49、66、67、69、71、73、78、92、93、94、103番の位置が特定される（数字はいずれも前出カバトらの文献において定義されるアミノ酸番号を表わす。以下において同じ）。分子モデリングと同じ基準を適用した場合、これらの位置のアミノ酸残基は、公知の抗体可変領域の8分の2においてCDRのアミノ酸残基との接触が認められる。これらの知見に基づき、b)の「該アミノ酸が三次元構造モデルにおいて、CDRの構成アミノ酸原子が抗原又は移植すべきCDRループとの相互作用が予想される」とは、以下の要件を意味する。

分子モデリングにおいて、FRとCDRとの接触の可能性が予見されたFRの位置が、X線結晶解析により実験的にFRとCDRとの接触が高頻度に検出される位置のいずれかに一致する場合は、ドナーのアミノ酸残基の移植を優先する。

それ以外の場合は、この要件b)は考慮しない。

d)の「当該位置が重鎖と軽鎖の接触面を構成する」とは、以下の要件を意味する。種々の抗体の可変領域のX線結晶解析の実験結果から、軽鎖においては、36、38、43、44、46、49、87、98番目のアミノ酸残基、重鎖においては、37、39、45、47、91、103、104番目のアミノ酸残基が、高頻度に重鎖-軽鎖間接触をすることが認められている。分子モデリングにおいて、重鎖-軽鎖間接触の可能性が予見され、その位置が上述の位置のいずれかに一致する場合は、ドナーのアミノ酸残基の移植を優先する。それ以外の場合は、この要件d)は考慮しない。

本発明のヒト化抗ヒト・オキユロスバニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAは、以下に記載する方法で製造することができる。

例えば、60乃至70ヌクレオチドの、該DNAの部分ヌクレオチド配列からなる複数のポリヌクレオチド断片を、センス側及びアンチセンス側において互い違いになるように化学合成し、その後各ポリヌクレオチド断片をアニーリングし、DNAリガーゼにより結合し、所望のヒト化抗ヒト・オキユロスバニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを有するDNAを得ることができる。

別の方法として、アクセプターの可変領域の全アミノ酸配列をコードするDNAをヒトリンパ球より分離し、CDRをコードする領域に当業者所周知の方法でヌクレオチド置換を行うことにより、制限酵素切断配列を導入する。対応する制限酵素で該領域を切断した後、ドナーのCDRをコードするヌクレオチド配列を合成し、DNAリガーゼにより結合して、所望のヒト化抗ヒト・オキユロスバニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを得ることができる。

さらに、本発明では、好適には以下に述べるオーバーラップ・エクステンション・PCR法（ホルトンら、Gene, 77, 61-68, (1989) 参照）に従い、所望ヒト化抗ヒト・オキユロスバニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを得ることができる。

すなわち、接続を所望する2種のアミノ酸配列をそれぞれコードする2種のDNAを、便宜的に(A)及び(B)とする。(A)の5'側にアニールする2

0乃至40ヌクレオチドのセンスプライマー（以下、このプライマーを（C）とする。）及び（B）の3'側にアニールする20乃至40ヌクレオチドのアンチセンスプライマー（以下、このプライマーを（D）とする）を化学合成する。さらに、（A）の3'側の20乃至30ヌクレオチドと（B）の5'側20乃至30ヌクレオチドを連結した、キメラ型のセンスプライマー（以下、このプライマーを（E）とする）及びこれに相補的なアンチセンスプライマー（以下、このプライマーを（F）とする）を合成する。（A）を含む適当なベクターDNA

Aを基質にして、センスプライマー（C）及びキメラ型アンチセンスプライマー（F）を用いたPCRを行うことにより、（A）の3'末端に（B）の5'末端側20乃至30ヌクレオチドが付加したDNAを得ることができる（この新たに得られたDNAを（G）とする）。同様に、（B）を含む適当なベクターDNAを基質にして、アンチセンスプライマー（D）及びキメラ型センスプライマー（E）を用いたPCRを行うことにより、（B）の5'末端に（A）の3'末端側20乃至30ヌクレオチドが付加したDNAを得ることができる（この新たに得られたDNAを（H）とする。）。このようにして得られた（G）と（H）は、（G）の3'側40乃至60ヌクレオチドと（H）の5'側40乃至60ヌクレオチドにおいて相補的なヌクレオチド配列を保持している。増幅された（G）及び（H）を混合してPCRを行った場合、1回目の変性反応で（G）と（H）は1本鎖になり、その後のアニーリング反応で殆どのDNAは元に戻るが、一部のDNAについては相補的ヌクレオチド配列領域でアニーリングするヘテロDNA 2本鎖を形成する。その後の伸長反応で、突出した1本鎖部分が修復され、（A）と（B）が連結したキメラ型のDNA（以下、このDNAを（I）とする。）を得ることができる。さらにこの（I）を基質として、センスプライマー（C）とアンチセンスプライマー（D）を用いPCRを行うことにより、（I）を増幅することができる。本発明では、抗ヒトヒト・オキユロスパニンマウスモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖のCDR領域をコードするDNA及びヒト免疫グロブリンIgGのFR領域をコードするDNA、さらには、ヒト免疫グロブリンIgGの分泌シグナルをコードするDNAを、それぞれケース・バイ・ケースにより（A）及び（B）として上記の連結反応を行うこと

ができる。

なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる。これらヌクレオチド配列コドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスベシフィック・ミュータジェネシス (site specific mutagenesis) (Mark, D. F., et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5882-5886 参照) 等に従うことができる。したがって、各プライマーを化学合成する際に、予め点突然変異を導入するように各プライマーを設計することにより、所望の抗ヒト・オキキュロスバニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを得ることができる。

このようにして得られた本発明の各DNAをそれぞれ発現ベクターに組み込むことにより、原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらベクターに適当なプロモーター及び形質発現に関わる配列を導入することにより、各々の宿主細胞において各遺伝子を発現させることが可能である。

上記方法により、容易に高収率、高純度で組換え抗ヒト・オキキュロスバニン抗体を製造できる。

(4) 抗ヒト・オキキュロスバニン完全ヒト抗体の作製

完全ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗ヒト・オキキュロスバニン完全ヒト抗体は、ヒト抗体のH鎖とL鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法 (Tomisuka, K. et al., *Nature Genetics*, 16, p.133-143, 1997.; Kuroiwa, Y. et al., *Nuc. Acids Res.*, 26, p.8447-8448, 1998.; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999.; Tomisuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 722-727, 2000.等を参照。) や、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(7), p.2301-8, 2002; Carmen, S. et al., *Briefings in*

Functional Genomics and Proteomics, 1 (2), p.189-203, 2002; Siriwardena, D. et.al., Ophthalmology, 109(8), p.427-431, 2002 等参照。)によって取得することができる。

このようにして作製される組換え抗ヒト・オキユロスパニン抗体がヒト・オキユロスパニンと特異的に結合することを確認する方法としては、例えば、マウス免疫時に抗体価の評価を行う場合と同様のELISA法が好適である。

6. 抗ヒト・オキユロスパニン抗体を含有する医薬

上述の「5. 抗ヒト・オキユロスパニン抗体の製造」の項に記載された方法でられる抗ヒト・オキユロスパニン抗体の中から、ヒト・オキユロスパニンの生物活性を中和する抗体又はヒト・オキユロスパニンを発現する癌細胞を特異的に傷害する抗体を得ることができる。これらの抗体は、生体内でのヒト・オキユロスパニンの生物活性、即ち、細胞の癌化を阻害することから、医薬として、に癌に対する治療剤として用いることができる。*in vitro*での抗ヒト・オキユロスパニン抗体によるヒト・オキユロスパニンの生物活性の中和活性は例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰発現している細胞における細胞の癌化の抑制活性で測定することができる。例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰発現しているマウス繊維芽細胞株NIH3T3を培養し、培養系に種々の濃度で抗ヒト・オキユロスパニン抗体を添加し、フォーカス形成、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。*in vitro*での抗ヒト・オキユロスパニン抗体による癌細胞の傷害活性は例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰発現している細胞に対して抗ヒト・オキユロスパニン抗体の示す抗体依存性細胞障害活性、補体依存性細胞障害活性又は補体依存性細胞性細胞障害活性で測定することができる。例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰発現している293T細胞を培養し、培養系に種々の濃度で抗ヒト・オキユロスパニン抗体を添加し、さらにマウス脾臓細胞を添加して適当時間培養後の、ヒト・オキユロスパニン過剰発現細胞に対する細胞死誘導率を測定することができる。*in vivo*での実験動物を利用した抗ヒト・オキユロスパニン抗体の癌に対する治療効果は、例えば、ヒト・オキユロスパニン

を過剰に発現しているトランスジェニック動物に同ヒト・オキユロスバニン抗体を投与し、癌細胞の変化を測定することができる。

このようにして得られたヒト・オキユロスバニンの生物活性を中和する抗体又はヒト・オキユロスバニンを発現する癌細胞を特異的に傷害する抗体は、医薬として特に癌の治療を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。癌の種類としては、皮膚癌や皮膚癌の一種であるメラノーマを好適に挙げることができるがこれらに限定されない。

本発明は、治療に有効な量の抗ヒト・オキユロスバニン抗体と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。

本発明の医薬組成物において許容される製剤に用いる物質としては好ましくは投与量や投与濃度において、医薬組成物を投与される者に対して非毒性のものが好ましい。

本発明の医薬組成物は、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、色、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、維持したり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。製剤用の物質として以下のものを挙げることができるが、これらに制限されない：グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素、トリスー塩酸 (Tris-HCl) 溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、 β -シクロデキストリンやヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類やグルコース、マンノースやデキストリン等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン・

グリコール又はポリエチレングリコール等の糖媒、マンニトール又はソルビトール等の当アルコール、懸濁剤、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルビテート20やポリソルビテート80等ポリソルビテート、トリトン (Triton)、トロメタミン (tromethamine)、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、希釈剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。これらの製剤用の物質の添加量は、抗ヒト・オキユロスバニン抗体の重量にたいして0.01~100倍、特に0.1~10倍添加するのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはpH7.0~8.5のTrisバッファーやpH4.0~6.5の酢酸バッファーやそれらにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。本発明の医薬組成物は選択された組成で必要な純度で適当な薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。抗ヒト・オキユロスバニン抗体を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化管吸収用に調製することもできる。製剤の組成及び濃度は投与方法によって決定することができるし、本発明の医薬組成物に含まれる、抗ヒト・オキユロスバニン抗体のヒト・オキユロスバニンに対する親和性、即ち、ヒト・オキユロスバニンに対する解離定数 (K_d 値) に対し、親和性が高い (K_d 値が低い) ほど、ヒトへの投与量を少なく薬効を発揮することができるので、この結果に基づいて本発明の医薬組成物の人に対する投与量を決定することもできる。投与量は、ヒト型抗ヒト・オキユロスバニン抗体をヒトに対して投与する際には、約0.1~100mg/kgを1~30日間に1回投与すればよい。

本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。

7. 直接相互作用する物質の探索

本発明の他の一つの態様としては、ヒト・オキユロスバニンの活動を抑制するような物質を得ることを目的とした、該蛋白質の立体構造をベースとしたドラッグデザインの手法を含む。このような手法は、ラショナルドラッグデザイン法として知られており、酵素活性などの機能や、リガンド、コファクター、又はDNAへの結合などを効率よく阻害もしくは活性化させるような化合物の探索に利用されている。この例として、すでに上市されている抗HIV剤であるプロテアーゼの阻害剤がよく知られている。本発明のヒト・オキユロスバニンの三次元構造解析においても、X-線結晶解析や核磁気共鳴法といった一般的によく知られている手法が利用できると思われる。さらに、ヒト・オキユロスバニンの機能を抑制する物質の探索には、コンピュータドラッグデザイン(CADD)を活用した設計も可能である。この例としては、慢性関節リウマチ治療の新たなゲノム新薬として期待されているAP-1の働きを阻害する低分子化合物(国際特許出願公開WO99/58515号)などが知られている。このような方法により、ヒト・オキユロスバニンに直接結合するか、あるいはヒト・オキユロスバニンと他の因子との相互作用を阻害することにより、ヒト・オキユロスバニンの機能を抑制するような物質を得ることができる。

さらに、他の一つの態様は、本発明のヒト・オキユロスバニンが会合するポリペプチド、すなわちヒト・オキユロスバニンのパートナー蛋白質に関する。すなわち、本発明は、ヒト・オキユロスバニンの活性を調節するパートナー蛋白質のスクリーニング方法に関する。

このスクリーニング方法の一つの態様は、ヒト・オキユロスバニンに被験蛋白質試料を接触させ、ヒト・オキユロスバニンに結合する蛋白質を選択する工程を含む。このような方法としては、例えば、精製したヒト・オキユロスバニンを用いて、これに結合する蛋白質のアフィニティー精製を行う方法が挙げられる。具体的な方法の一例を示せば、ヒト・オキユロスバニンにヒスチジン6個よりなる配列をアフィニティータグとして融合したものを作製して、これを細胞の抽出液(予めニッケル-アガロースカラムにチャージして、このカラムを素通りした部分)と4℃で12時間インキュベートし、次いで、この混合物に別途ニッケル-アガロース担体を加えて4℃で1時間インキュベートする。

ニッケル-アガロース担体を洗浄バッファーで十分洗浄した後、100 mM イミダゾールを加えることにより、ヒト・オキユロスバニンと特異的に結合する細胞抽出液中の蛋白質を溶出させて精製し、この構造を決定する。このようにして、ヒト・オキユロスバニンと直接結合する蛋白質、及びヒト・オキユロスバニンとの結合活性は持たないが、サブユニットとしてヒト・オキユロスバニンに直接結合する蛋白質と複合体を形成することにより間接的にヒト・オキユロスバニンに結合する蛋白質が精製できる〔実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ6「転写因子研究法」pp 215-219（羊土社刊）〕。

別の方法としては、ファウエスタンブロット法〔実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」pp 76-81（羊土社刊）〕や、酵母や哺乳動物細胞を用いたツーハイブリッドシステム法〔実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」pp 66-75（羊土社刊）、「チェックメイト・マンマリアン・ツーハイブリッドシステム」（プロメガ社製）〕によるクローニングも可能であるが、これらの方法に限定されない。

このようにして、ヒト・オキユロスバニンと直接もしくは間接的に相互作用するパートナー蛋白質のcDNAが得られれば、ヒト・オキユロスバニンと該パートナー蛋白質との相互作用を阻害する物質の機能スクリーニングに利用することができる。具体的には、例えば、ヒト・オキユロスバニンとグルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合蛋白質を調製して、抗グルタチオンS-トランスフェラーゼ抗体で覆ったマイクロプレートに結合させた後、ビオチン化した該パートナー蛋白質をこの融合蛋白質と接触させ、該融合蛋白質との結合をストレプトアビジン化アルカリホスファターゼで検出する。ビオチン化した該パートナー蛋白質添加の際、被験物質も添加し、融合蛋白質と該パートナー蛋白質との結合を促進あるいは阻害する物質を選択する。この方法では、融合蛋白質に直接作用する物質又は該パートナー蛋白質に直接作用する物質が得られる。

融合蛋白質と該パートナー蛋白質との結合が間接的であり、何らかの別の因子を介しているような場合には、例えば該因子を含むような細胞抽出液存在下で、同様に上記アッセイを行う。この場合には、該因子に対して作用するような物質も選択される可能性がある。

また、得られたパートナー蛋白質が、ヒト・オキユロスバニンの機能を抑制する活性を有している場合には、既に記載したヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現ベクターを応用した試験方法に従って、抗癌剤、例えば、前立腺癌の治療剤として有用な候補物質のスクリーニングを行うことができる。また、得られたパートナー蛋白質が、ヒト・オキユロスバニンの機能を抑制する活性を有している場合には、このような抑制因子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、癌の遺伝子治療に用いることができる。

そのようなポリヌクレオチドは、例えば特定された阻害因子のアミノ酸配列を解析し、該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプローブを合成してcDNAライブラリーやゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことにより取得できる。また、ヒト・オキユロスバニンの機能の阻害活性を有するペプチドが、ランダムに合成された人工ペプチドライブラリー由来である場合は、該ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるDNAを化学合成する。

遺伝子治療においては、そのようにして得られた阻害因子をコードする遺伝子を、例えばウイルスベクターに組み込んで、該組換えウイルスベクターを有するウイルス（無毒化されたもの）を患者に感染させる。患者体内では抗癌因子が産生され、癌細胞の増殖抑制機能を有するので、癌の治療が可能となる。

遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、実験医学増刊、12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」、羊土社（1996））のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに、阻害因子あるいはその変異体をコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リボソーム法、リボフェクテン法、マイ

クロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リボソーム法が好ましい。

また遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するインビボ (in vivo) 法及びヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すエクスビボ (ex vivo) 法がある (日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48 (1994)、実験医学増刊, 12 (15) (1994))。

例えば、該遺伝子治療剤がインビボ法により投与される場合は、疾患、症状等に応じ、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等、適当な投与経路により投与される。またインビボ法により投与する場合は、該遺伝子治療剤は一般的には注射剤等とされるが、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リボソーム又は膜融合リボソーム (センダイウイルスーリボソーム等) の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリボソーム製剤とすることができる。

配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列又は該配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列は、いわゆるアンチセンス治療に用いることができる。アンチセンス分子は、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列の一部に相補的な、通常15乃至30merからなるDNA、もしくはそのホスホロチオエート、メチルホスホネート又はモルフォリノ誘導体などの安定なDNA誘導体、2'-O-アルキルRNAなどの安定なRNA誘導体として用いられ得る。そのようなアンチセンス分子を、微量注入、リボソームカプセル化により、あるいはアンチセンス配列を有するベクターを利用して発現させるなど、本発明の技術分野において周知の方法で、細胞に導入することができる。このようなアンチセンス療法は、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列がコードする蛋白質の活性が増加しすぎることによって引き起こされる病気の治療に有用である。

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬として有用な組成物は、医薬として許容できる担体の混合などの公知の方法によって製造され得る。このような担体と製造方法の例は、Applied Antisense Oligonucleotide Technology (1998 Wiley-Liss, Inc.) に記載されている。アンチセンスオリゴヌクレオ

チドを含む製剤は、それ自体あるいは適宜の薬理学的に許容される、賦形剤、希釈剤等と混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤等により経口的に、又は、注射剤、坐剤、貼付剤、若しくは、外用剤等により非経口的に投与することができる。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、パレイショデンプン、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；磷酸水素カルシウムのような磷酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤を挙げることができる。）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイヌのようなワックス類；硬脂酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体を挙げることができる。）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げることができる。）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤を挙げることができる。）、安定剤

(メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸を挙げることができる。)、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

本発明の化合物を患者へ導入する方法については、上記に加えてコロイド分散系を用いることができる。コロイド分散系は化合物の生体内の安定性を高める効果や、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果が期待される。コロイド分散系は、通常用いられるものであれば限定しないが、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び水中油系の乳化剤、ミセル、混合ミセル及びリボソームを包含する脂質をベースとする分散系を挙げる事ができ、好ましくは、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果のある、複数のリボソーム、人工膜の小胞である (Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698)。

0.2 - 0.4 μm のサイズ範囲をとる単膜リボソームは、巨大分子を含有する水性緩衝液のかなりの割合を被包化し得、化合物はこの水性内膜に被包化され、生物学的に活性な形態で脂細胞へ輸送される (Fraley et al., *Trends Biochem. Sci.*, 1981, 6, 77)。リボソームの組成は、通常、脂質、特にリン脂質、とりわけ相転移温度の高いリン脂質を1種又はそれ以上のステロイド、特にコレステロールと通常複合したものである。リボソーム生産に有用な脂質の例は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルエタノールアミン、セレブロシド及びガングリオシドのようなホスファチジル化合物を包含する。特に有用なのはジアシルホスファチジルグリセロールであり、ここでは脂質部分が14 - 18の炭素原子、特に16 - 18の炭素原子を含有し、飽和している (14 - 18の炭素原子鎖の内部に二重結合を欠いている)。代表的なリン脂質は、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジステアロイルホスファ

チジルコリンを包含する。

リボソームを包含するコロイド分散系の標的化は、受動的又は能動的のいずれかであってもよい。受動的な標的化は、洞様毛細血管を含有する臓器の洞内系細胞へ分布しようとするリボソーム本来の傾向を利用することによって達成される。一方、能動的な標的化は、例えば、ウイルスの蛋白質コート (Morishita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 1993, 90, 8474)、モノクローナル抗体 (又はその適切な結合部分)、糖、糖脂質又は蛋白質 (又はその適切なオリゴペプチドフラグメント) のような特定のリガンドをリボソームへ結合させること、又は天然に存在する局在部位以外の臓器及び細胞型への分布を達成するためにリボソームの組成を変えることによってリボソームを修飾する手法等を挙げることができる。標的化されたコロイド分散系の表面は様々なやり方で修飾され得る。リボソームで標的したデリバリーシステムでは、脂質二重層との緊密な会合において標的リガンドを維持するために、リボソームの脂質二重層へ脂質基が取込まれ得る。脂質鎖を標的リガンドと結びつけるために様々な連結基が使用され得る。本発明のオリゴヌクレオチドのデリバリーが所望される細胞の上に支配的に見出される特定の細胞表面分子に結合する標的リガンドは、例えば、(1) デリバリーが所望される細胞によって支配的に発現される特定の細胞受容体と結合している、ホルモン、成長因子又はその適切なオリゴペプチドフラグメント、又は (2) 標的細胞上で支配的に見出される抗原性エピトープと特異的に結合する、ポリクローナル又はモノクローナル抗体、又はその適切なフラグメント (例えば、Fab; F(ab')₂)、であり得る。2種又はそれ以上の生物活性剤は、単一のリボソーム内部で複合し、投与することもできる。内容物の細胞内安定性及び/又は標的化を高める薬剤をコロイド分散系へ追加することも可能である。

その使用量は症状、年齢等により異なるが、経口投与の場合には、1回当り下限1mg (好適には、30mg)、上限2000mg (好適には、1500mg) を、注射の場合には、1回当り下限0.1mg (好適には、5mg)、上限1000mg (好適には、500mg) を皮下注射、筋肉注射又は静脈注射によって投与することができる。

以下、実施例を示してこの発明を詳細かつ具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E.F. 及び Maniatis, T. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊)に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【実施例 1】 癌細胞で特異的に発現している遺伝子の選別

配列表の配列番号 1 と部分的に重複するヌクレオチド配列を有する EST プローブ (Affimetrix Genechip HG-133 probe 223795_at: アフィメトリクス社製) について、GeneLogic 社製のデータベース (GeneExpress Software System Release 1.4.2) を用いて発現プロファイル解析を行った。

各種細胞株内でのヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を比較した結果、メラニン細胞 (メラノサイト: melanocyte) 8 例は、他の細胞株群、すなわち血球系細胞サンプル 12 例、グリア細胞株サンプル 6 例、上皮系細胞サンプル 62 例と比較して有意に高く転写されていた (順に P 値 < 0.0001 , $= 0.0007$, < 0.0001 図 1 上パネル)

次に組織由来サンプルでのヒト・オキユロスバニン遺伝子の発現量を比較した。健康人皮膚サンプル 66 例、及びメラノーマサンプル 33 例について転写量を比較したところ、メラノーマサンプルにおいて有意に高く転写されていた (P 値 < 0.0001 : 図 1 下パネル)。また、健康人皮膚サンプル 66 例と、メラノーマサンプルのうち、皮膚組織由来サンプル 12 例を比較したところ、メラノーマサンプルにおいて有意に高く転写されていた (P 値 $= 0.0007$: 図 2 上パネル)。

一方、健康人皮膚サンプル 66 例と、メラノーマサンプルのうち、リンパ節組織由来サンプル 12 例を比較したところ、メラノーマサンプルにおいて有意に高く転写されていた (P 値 $= 0.0003$: 図 2 下パネル)。

さらに、健康人リンパ節由来サンプル 13 例と、メラノーマサンプルのうち、リンパ節組織由来サンプル 12 例を比較したところ、メラノーマサンプルにお

いて有意に高く転写されていた (P 値 = 0.0011 : 図 3 パネル)。

【実施例 2】 ヒト・オキユロスバニン遺伝子の取得と発現プラスミドの構築

a) PCR 反応

ヒト・オキユロスバニン cDNA を PCR で増幅するためのプライマーとして 5' -CACCATGGAGGAGGGGAGAGGAGCC-3' (プライマー 1 : 配列表の配列番号 5) 及び、

5' -GCCCCGGGCGGGTTTGGCAGCGG-3' (プライマー 2 : 配列表の配列番号 6)

の配列を有するオリゴヌクレオチドを常法に従って合成した。なお、プライマー 1 はヒト・オキユロスバニン遺伝子の開始コドン上流に Kozak 配列として 4 塩基、CACC を付加したオリゴヌクレオチドであり、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 乃至 23 からなるヌクレオチド配列の 5' 側に 4 塩基配列 (CACC) 付加した塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。この CACC 配列は、クローニングベクター pENTR/D-TOPO への組み込みの際にベクター 3' 末端と相補鎖を形成するため、遺伝子の方向性を保持したベクターへ組み込みを可能としている。プライマー 2 は配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1043 乃至 1065 からなるヌクレオチド配列の相補鎖からなるオリゴヌクレオチドである。

PCR 反応は PLATINUM Pfx DNA Polymerase (インビトロジェン社製) を添付プロトコルに従って用いて行った。具体的には、得られたファーストストランド cDNA 0.1 μ l に 10 pmol/ μ l の濃度の合成プライマー 1 と合成プライマー 2 をそれぞれ 1.5 μ l、10X Pfx Amplification Buffer 5 μ l、10mM dNTP Mix を 1.5 μ l、50mM MgSO₄ を 1 μ l、PLATINUM Pfx DNA Polymerase 0.5 μ l、10X PCR Enhancer Solution 10 μ l、滅菌精製水 28.9 μ l を添加し、50 μ l の PCR 反応溶液を作製した。PCR 反応は、Peltier Thermal Cycler TPC-200 DNA Engine (エムジェーリサーチ (MJ Research) 社製) により行った。まず 94℃ で 2 分加熱した後、引き続き 94℃ で 30 秒、65℃ で 2 分の温度サイクルを

5回、続いて94℃で30秒、60℃で40秒、68℃で1分20秒の温度サイクルを5回、続いて94℃で30秒、55℃で40秒、68℃で1分20秒の温度サイクルを5回、続いて94℃で30秒、50℃で40秒、68℃で1分20秒の温度サイクルを3.5回繰り返し、最後に68℃で10分間保温してから、4℃に保存した。目的cDNAは、反応物を1.5%のアガロースゲルで電気泳動し、NM__031945 cDNA (1069bp) の増幅を確認後、S. N. A. P. UV-Free Gel Purification Kit (インビトロジェン社製) をその添付プロトコールに従って用いることによりアガロースゲルよりDNAを精製した。精製されたcDNAの濃度は、1D Image Analysis Software Version 3.5 (Kodak Digital Science EDAS290: コダック社製) を用い、1kb DNA Ladder (インビトロジェン社製) を濃度標準物にして測定した。

b) ヒト・オキユロスバニン cDNAのpENTR/D-TOPOベクターへのクローニング

pENTR Directional TOPO Cloning Kits (インビトロジェン社製) を添付プロトコールに従って用い、実施例2a) によって得られたNM__031945 cDNAをpENTR/D-TOPOベクターにクローニングした。NM__031945 cDNAを、キット付属の反応バッファー中でTopoisomeraseを結合させてあるpENTR/D-TOPOベクターと混合し室温で30分間インキュベートした。得られた反応物を用いて大腸菌OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製) を形質転換し、50μg/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果カナマイシン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、1mlの50μg/mlのカナマイシンを含む液体TB培地中で37℃で一晩培養し、Montage Plasmid Miniprep Kit (ミリポア社製) を利用することによりプラスミドDNAを単離精製した。得られたプラスミドDNAについて、BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kitをそ

の添付プロトコールに従って用いることにより反応を行った後、ABI PRISM 3100 DNA Analyzer (アプライド・バイオシステムズ社製) によりヌクレオチド配列解析を行い、GenBank アクセッション番号 (ACCESSION NO. NM_031945 に示されるヌクレオチド配列の Open Reading Frame を有する cDNA (配列表の配列番号 1) が、pENTR/D-TOPOベクターに組み込まれていることを確認した。

次に発現用ベクター pcDNA3.1/DEST40 (インビトロジェン社製) へ GATEWAY™ システムを用いて遺伝子の乗せ替えを行った。すなわち、GATEWAY™ LR Clonase™ Enzyme Mix (インビトロジェン社製) 4 μ l、LR Reaction Buffer 4 μ l、pENTR/D-TOPO-NM_031945 0.3 μ g、pcDNA3.1/DEST40 0.3 μ g を TE バッファーで 20 μ l に調製し、25℃ で 1 時間反応させる。反応後、2 μ l の Proteinase K を加え、37℃ にて 10 分間反応させる。得られた反応物を用いて大腸菌 One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製) を形質転換し、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地上で培養した。その結果アンピシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、100 ml の 50 μ g/ml のアンピシリンを含む液体 LB 培地中で 37℃ で一晩培養し、Plasmid MAXI Kit (QIAGEN 社製) を利用することによりプラスミド DNA (pcDNA3.1-DEST40-NM_031945) を単離精製した。

【実施例 3】 ヒト・オキユロスバニン遺伝子の細胞への導入と発現されたヒト・オキユロスバニン遺伝子産物の確認、及び免疫原としてのヒト・オキユロスバニン発現細胞の膜画分の調製

a) プラスミド pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 の NIH 3T3 細胞へのトランスフェクション

実施例 2 によって得られたプラスミド pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 を NIH 3T3 細胞に以下のようにトランスフェクションした。NIH 3T3 細胞への

トランスフェクションは(株)Invitrogen製のLipofectamine™ 2000 Reagentを用いてリポフェクションにより行った。すなわち、まずNIH3T3細胞を6穴プレートにてセミコンフルエントになるまで増殖させた。細胞を抗生物質の入っていない、10% ウシ胎児血清を含むDMEMで一度洗浄したのち、200 μ lの抗生物質の入っていない、10% ウシ胎児血清を含むDMEMを加えた。次に1.5mlエッペンドルフチューブ中に無血清培地(DMEM)100 μ lと、上記方法にて回収したプラスミドDNA (pcDNA3.1-DEST40-NM__031945) 2 μ gを加え、混合した。別の1.5mlエッペンドルフチューブ中に無血清培地(DMEM)96 μ lと、Lipofectamine™ 2000 Reagent 4 μ lを加え、混合した。DNA溶液とLipofectamine溶液を混合し、室温にて20分間放置した。その後、DNA-Lipofectamine混合液を細胞に加え、37℃、5% CO₂下で培養した。4時間後 10% ウシ胎児血清を含むDMEM 1mlを細胞に加え、37℃、5% CO₂下で一晩培養した。

b) プラスミド pcDNA3.1-DEST40-NM__031945 の NIH3T3 細胞での発現の確認

このようにして得られた細胞培養物を回収した。cDNAを含まないネガティブコントロール又は pcDNA3.1-DEST40-NM__031945 でトランスフェクトして得たNIH3T3細胞をPBS(-)緩衝液((株)Invitrogen製)で洗浄した。細胞をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)用の2-メルカプトエタノールを含むサンプル緩衝液(バイオラッド社製)に溶解し、12.5% ポリアクリルアミドゲル(e バジエル E-T12.5 L アトー(株)社製)を用いて、還元条件下でSDS-PAGEを行った。

電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルからバンドを転写緩衝液(192mM グリシン、20% メタノール、25mM トリス)中でゲルメンブレン転写装置(マリソル社製、NP7513)を用いて4℃、120分、200mAの条件でPolyvinylidene Difluoride(PVDF)メンブレン(ミリポア社製)に転写した。

転写後のPVDFメンブレンについて、抗V5タグ抗体((株)Invit

45
44

rogen製)を用いたウエスタンブロット解析を行った。すなわち、まずP VDFメンブレンをブロックエース((株)曹印製)にて、ブロッキング(室温で30分間を1回)した後、プラスチックバッグ(商品名ハイブリバック、コスモバイオ(株)社製)に入れ、抗V5タグ抗体(1000倍希釈)、ブロックエース 5ml添加して室温で1時間振とうした。1時間後、メンブレンを取り出し0.05%のツイーン20を含むPBS(以下「0.05% Tween 20-PBS」という)で洗浄した(室温で15分間を1回、次いで5分間を2回)その後、メンブレンを新しいプラスチックバッグに移し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(アマシャム・ファルマシア社製)を0.05% Tween 20-PBSで5000倍に希釈した溶液30mlを入れ、を室温で1時間振とうした。1時間後、メンブレンを取り出し、0.05% Tween 20-PBSで15分間×1回、次いで5分間×4回洗浄した。洗浄後、メンブレンをラップフィルム上に置き、ECLウエスタンブロットティング検出溶液(アマシャム・ファルマシア社製)を用いて、抗V5タグ抗体が結合するバンドの検出を行った(メンブレンをラップフィルム上に置き、ECLウエスタンブロットティング検出溶液に1分間浸した後、X線フィルムを感光させた(1分間))。その結果、抗V5タグ抗体により、pcDNA3.1-DEST40-NM_031946 プラスミドDNAを導入して得られたNIH3T3細胞に特異的なバンドが検出された(図4)。

c) プラスミド pcDNA3.1-DEST40-NM_031945 のBALB-3T3細胞へのトランスフェクション

BALB-3T3細胞(American Type Culture Collection No. CCL-163)を、10% ウシ血清(ギブコ社製)(以下「CS」という)を含むダルベッコ変法イーグル培地(以下「DMEM」という:日本製薬(株)社製)を入れた細胞培養用フラトレイ(培養面積500cm²;住友ベークライト(株)社製)8枚中でセミコンフルエントになるまで37℃、5% 炭酸ガス下で培養した後、pcDNA3.1-DEST40-NM_031945をBALB-3T3細胞にトランスフェクションした。BALB-3T3細胞へのトランスフェクションは(株)Gene Therapy Systems製のGeneporter™ 2 Transfection Reagentを用いてリポフェクションにより

行った。すなわち、細胞を無血清培地 (DMEM) で一度洗浄したのち、50 ml の無血清培地 (DMEM) を加えた。次に50 ml ファルコンチューブ中に New DNA Diluent 6 ml と、上記方法にて回収したプラスミド DNA (pcDNA3.1-DEBT40-NM_031945) 240 μ g を加え、混合した。別の50 ml ファルコンチューブ中に無血清培地 (DMEM) 4.8 ml と、Geneporter™ 2 Reagent 1200 μ l を加え、混合した。DNA 溶液と Geneporter™ 2 溶液を混合し、室温にて20分間放置した。その後、DNA-Geneporter™ 2 混合液を細胞に加え (4 ml / トレイ)、37℃、5% CO₂ 下で培養した。4時間後 20% ウシ血清を含む DMEM 50 ml / トレイ を細胞に加え、37℃、5% CO₂ 下で一晩培養した。

d) 細胞膜画分の調製

上記の方法にて培養した細胞を PBS (-) 緩衝液 ((株) Invitrogen 製) で洗浄する。セルスクレーパー (住友ベークライト (株) 社製) を用いて細胞を回収し、5 mM Tris バッファー pH 8.0 7 ml に懸濁する。4℃にて30分間細胞溶液を放置する。Dounce Type B ホモジェナイザー (30 ストローク) にて細胞を破砕する。1000 G で10分間遠心し、上清を回収する。上清を78000 G 100分間、超遠心分離機 (日立 (株) 製) にて遠心し、沈殿を回収する。シヨ糖密度勾配により、膜画分を濃縮する。すなわち、沈殿を57% シヨ糖 0.25 M Tris バッファー pH 8.0 3 mL に溶解する。超遠心用チューブに移しかえ、その細胞溶液の上へ37.2% 57% シヨ糖 0.25 M Tris バッファー pH 8.0 3 mL、0.25 M 57% シヨ糖 0.25 M Tris バッファー pH 8.0 1.5 mL を重層する。超遠心分離機にて、75500 G 16時間遠心する。チューブ中の溶液を上方より1 mL ずつ回収する。各フラクションに10 mL の5 mM Tris バッファー pH 8.0 を加え、78000 G 1時間超遠心し、沈殿を回収する。沈殿に5 mM Tris バッファー pH 8.0 500 μ l を加え、Dounce Type B ホモジェナイザー (10 ストローク) にて細胞溶液を均一化する。発現確認の項で述べたウエスタンブロッティング法により、細胞膜画分を同定し、免疫原とする。

45

〔実施例4〕 マウスの免疫及び細胞融合**(4-1) 免疫**

実施例3で得られたヒト・オキユロスバニン発現細胞の膜画分溶液 1ml (全蛋白質量: 100 μ g) を4~10週令のBALB/cマウス雌(日本エスエルシー社より購入)腹腔内に投与した。2週間後、同様の膜画分溶液(20 μ g蛋白質/マウス)を腹腔内に投与し追加免疫する。

(4-2) 細胞融合

追加免疫3日後のマウスより脾臓を摘出し、これを20mM HEPES緩衝液(pH7.3)、350mg/ml 炭酸水素ナトリウム、0.05mM β -メルカプトエタノール、50単位/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン、300 μ g/ml L-グルタミン酸を含む無血清RPMI 1640培地(10.4g/リットル RPMI 1640「ニッスイ」(1): 日水製薬(株)社製)(以下「無血清RPMI培地」という)10ml中に入れ、メッシュ(セルストレイナー: ファルコン社製)上でスパーテルを用いてつぶす。メッシュを通過した細胞懸濁液を遠心して脾臓細胞を沈殿させた後、この脾臓細胞を無血清RPMI培地で2回洗浄してから、無血清RPMI培地に懸濁して細胞数を測定する。

一方、10% FCS(ギブコ・ビーアールエル社製)を含むASF104培地(味の素(株)社製)(以下「血清入りASF培地」という)にて、37℃、5% 炭酸ガス存在下で細胞濃度が 1×10^5 細胞/mlを超えないように培養したミエローマ細胞 NS1 (American Type Culture Collection TIB-18)を同様に無血清RPMI培地で洗浄し、無血清RPMI培地に懸濁して細胞数を測定する。

3×10^5 個相当のNS1細胞懸濁液と、 3×10^5 個相当の脾臓細胞懸濁液を混合し、遠心後、上清を完全に除去する。以下の細胞融合の操作は、ペレットの入ったプラスチック遠沈管を温水を入れたビーカー中で37℃に保温しながら実施する。このペレットに、50% (w/v) ポリエチレングリコール 1500 (ペーリンガー・マンハイム社製) 1mlを、ピペットの先でペレットを攪拌しながらゆっくり添加した後、予め37℃に加温しておいた無血清R

PMI 培地 1 ml を 2 回に分けてゆっくり添加し、さらに 7 ml の無血清 RPMI 培地を添加する。遠心後、上清を除去し、10% FCS を含むヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン培地（以下「HAT 培地」という；ペーリンガー・マンハイム社製）10 ml を、ピペットの先でゆっくり攪拌しながら添加する。さらに 10% FCS を含む HAT 培地 20 ml を添加した後に、細胞培養用 96 穴マイクロプレートに 100 μ l / ウェルずつ分注し、37℃、5% 炭酸ガス下で培養する。7～8 日後、培地が黄色味を帯びたウェルには新しい HAT 培地を 100 μ l / ウェルずつ加えた。このようにして得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供する。

（4-3） 限界希釈

4～10 週令の BALB/c マウス雌（日本エスエルシー社より購入）より胸腺を摘出後、メッシュ（セルストレイナー；ファルコン社製）上でスパテルを用いてつぶし、メッシュを通過した細胞を 10% FCS を含むヒポキサンチン・チミジン培地（以下「HT 培地」という；ペーリンガー・マンハイム社製）で 2 回洗浄する。マウス 1 匹分の胸腺細胞を 10% FCS を含む HT 培地 30 ml に懸濁したものをフィーダー細胞液とした。上記（4-2）で得られた融合細胞を含む培養液を、細胞密度に応じてフィーダー細胞液で 10 乃至 100 倍に希釈し、さらに融合細胞の密度が 5 細胞/ml、1 細胞/ml、0.5 細胞/ml となるように、フィーダー細胞液で段階希釈する。このようにして調製した各試料を、細胞培養用 96 穴マイクロプレートに 100 μ l / ウェルずつ分注し、37℃、5% 炭酸ガス下で 5 日間培養する。

（4-4） 選別

（4-4-1）細胞 ELISA

ヒト・オキユロスバニン発現細胞の維持培養は、RPMI1640（インビトロジェン社製）に 10% 牛胎児血清（Noregate Biotech 社製）、20mM HEPES（シグマ社製）、55 μ M 2-メルカプトエタノール（インビトロジェン社製）を添加した培地（培地）にて、37℃、5%CO₂ 下で行う。対数増殖期にあるヒト・オキユロスバニン発現細胞を 2×10^4 cells/cm² で細胞培養用フラスコへまきこみ、3 日間培養する。このように調製したヒト・オキユロスバニン発現細胞を全て 50ml チューブへ移し、HITACHI himac CP8DL で 1000rpm、5 分間遠心分離する（遠心分離条件

1)。上清を除き、培地でヒト・オキュロスパニン発現細胞を懸濁後、0.4%トリパンブルー溶液（シグマ社製）を使用し、生細胞数を計測する。培地でヒト・オキュロスパニン発現細胞を生細胞 10^7 cells/ml に調製し、96穴U底プレートに $100\mu\text{l/well}$ ずつ分注する。96穴U底プレートを HITACHI himac CF8DL で 15000rpm 、1分間遠心分離し（遠心分離条件 2）、上清を $200\mu\text{l}$ チップで抜き取った。96穴U底プレートの側面をたたいてヒト・オキュロスパニン発現細胞を懸濁後、氷中で冷やした培地で $10\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $2.5\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したハイブリドーマ培養上清を $100\mu\text{l/well}$ ずつ添加する。15分毎に96穴U底プレートをプレートミキサー（フジレビオ社製）で撹拌しながら、 4°C で1.5時間反応させる。反応終了後、96穴U底プレートを遠心分離条件 2 で遠心分離し、上清を $200\mu\text{l}$ チップで抜き取る。PBS(-)（日本製薬社製）に5%牛胎児血清を添加した溶液（PBS-5XFBS）を $200\mu\text{l/well}$ ずつ添加し、プレートミキサーで撹拌後、遠心分離条件 2 で遠心分離し、上清を $200\mu\text{l}$ チップで抜き取る。以上の操作をこのあと2回行う。96穴U底プレートの側面をたたいてヒト・オキュロスパニン発現細胞を懸濁後、氷中で冷やした PBS-5XFBS で500倍に希釈したベルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories 社製）を $100\mu\text{l/well}$ ずつ添加し、15分毎に96穴U底プレートをプレートミキサーで撹拌しながら、 4°C で1.5時間反応させる。反応終了後、96穴U底プレートを遠心分離条件 2 で遠心分離し、上清を $200\mu\text{l}$ チップで抜き取った。PBS-5XFBS を $200\mu\text{l/well}$ ずつ添加し、プレートミキサーで撹拌後、遠心分離条件 2 で遠心分離し、上清を $200\mu\text{l}$ チップで抜き取る。以上の操作をこのあと2回行う。96穴U底プレートの側面をたたいてヒト・オキュロスパニン発現細胞を懸濁後、室温にしたベルオキシダーゼ用発色基質（ナカライテスグ社製）を $100\mu\text{l/well}$ ずつ添加し、プレートミキサーで10分間撹拌する。遠心分離条件 2 で遠心分離後、上清 $50\mu\text{l/well}$ を96穴平底プレートへ移し、プレートリーダー（1420 ARVO マルチラベルカウンター、パーキンエルマー社製）で405nm 吸収を測定する。

（4-4-2）フローサイトメーター

実施例 3 で取得したヒト・オキュロスパニン発現細胞を、10% FCS を含む RPMI 1640 培地中で、 37°C 、5%炭酸ガス下で培養し増殖させて

から、 1×10^7 細胞/mlに調整した細胞懸濁液を、U字底96穴マイクロプレート（ヌンク社製）に50 μ l/ウェルずつ分注し、遠心分離（90 $\times$ g、4℃、10分）する。上清を除去し、上記（4-3）で培養する融合細胞の培養上清を50 μ l/ウェル加えて攪拌した後、氷上で1時間静置してから、遠心分離（90 $\times$ g、4℃、10分）して上清を除去する。ペレットを100 μ l/ウェルのフローサイトメトリー用緩衝液（5% FCS、0.04%（w/v）アジ化ナトリウムを含むPBS）で2回洗浄した後、500倍希釈したフルオレッセイン-5-イソチオシアネート（Fluorescein-5-isothiocyanate；以下「FITC」という）標識ヤギ抗マウスIgG抗体IgG画分（オルガノン・テクニカ社製）50 μ lを二次抗体として加え、氷上で1時間静置する。遠心分離（90 $\times$ g、4℃、10分）して上清を除去してから、ペレットをフローサイトメトリー用緩衝液100 μ l/ウェルで2回洗浄後、3.7%ホルマリン溶液50 μ lを添加し、氷上で10分静置することにより細胞を固定する。遠心分離（90 $\times$ g、4℃、10分）して上清を除去してから、再度フローサイトメトリー用緩衝液100 μ l/ウェルで洗浄し、ペレットをフローサイトメトリー用緩衝液100 μ l/ウェルに懸濁したものをフローサイトメトリー用試料とする。各試料中の細胞のFITC蛍光強度をフローサイトメーター（エビックス・エリート；コールター社製）で測定する（励起波長：488 nm、検出波長：530 nm）。その結果、融合細胞培養上清を添加しなかったヒト・オキユロスバニン発現細胞（FITC蛍光強度約0.8）よりも明らかに高値（約100-1000）のFITC蛍光強度を示した試料に対応する融合細胞を選別する。

（4-5） クローニング

上記（4-4）で選別される細胞群について、上記（4-3）から（4-4）一連の工程を5回繰り返すことにより、ヒト・オキユロスバニン発現細胞と結合するが導入前の細胞と結合しない単一の抗体を産生するハイブリドーマを数クローン得る。

【実施例5】 ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体の精製

実施例4で作出されるマウス-マウスハイブリドーマを、10% FCSを

47

含むASF培地 1リットル中で、37℃、5% 炭酸ガス下で培養し、 1×10^6 細胞/mlとなるまで増殖させる。培養液を遠心分離(1000rpm、2分間)し、上清を捨て、沈殿した細胞を無血清ASF培地で1回洗浄後、無血清ASF培地1リットルに再懸濁し、37℃、5% 炭酸ガス下で48時間培養する。この培養液を遠心分離(1000rpm、2分間)し、上清を回収して透析チューブ(排除限界分子量12000-14000;ギブコ・ビーアールエル社製)に入れ、10倍量の10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)に対して透析する。この透析チューブ内液からのIgGの粗精製を、高速液体クロマトグラフィー装置(FPLCシステム;ファルマシア社製)を用いて以下に記載する条件で行う:

カラム: DEAE-セファロース CL-6Bカラム(カラムサイズ10m l;ファルマシア製);

溶媒: 10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)

流速: 1ml/分;

溶出: 1M 塩化ナトリウムの直線濃度勾配(0-50%、180分)。

溶出液を5mlずつ分画し、各分画中の抗ヒト・オキユロスバニン抗体価を、ヒト・オキユロスバニン蛋白質を用いたELISA法により検定する。まず、実施例3で調製するヒト・オキユロスバニン発現細胞より調製した膜画分溶液をELISA用96穴マイクロプレート中に100 μ l/ウェル入れ、37℃で1時間保温した後、この溶液を捨て、各ウェルをPBS-Tween 100 μ l/ウェルで3回洗浄する。次に2% ウシ血清アルブミンを含むPBS 100 μ l/ウェルを入れて37℃で1時間保温する。PBS-Tween 100 μ l/ウェルで3回洗浄した後に、各溶出分画 100 μ lを入れて37℃で1時間保温する。さらに、PBS-Tween 100 μ l/ウェルで8回洗浄した後に、PBS-Tweenで2000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体(アマシャム社製)100 μ l/ウェルを添加して37℃で1時間反応させ、PBS-Tween 100 μ l/ウェルで3回洗浄する。次に西洋ワサビペルオキシダーゼ基質(パイオラッド社製)100 μ l/ウェルを入れて5分間静置した後、マイクロプレートリーダーで各ウェルの415nmの吸光度を測定する。

その結果、吸光度の大きかった分画を集め、抗体アフィニティー精製用カラム（ハイトラップ・プロテインGカラム、カラム体積 5 ml；ファルマシア社製）2本に供与する。カラム内を25 ml／カラムの平衡化緩衝液（20 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0））にて洗浄した後に、15 ml／カラムの溶出緩衝液（0.1 M グリシン-塩酸（pH 2.7））にて抗体を溶出する。それぞれの溶出液は、1.125 mlの1 M トリス-塩酸（pH 9.0）を入れた試験管内に受け、溶出終了後ただちに遠心管型限外濾過器（セントリプレッ10；グレースジャパン（株）製）の上部に入れて、3000×g、4℃で2時間遠心した。濾過器下部に回収された濾液を除去後、上部に15 mlのPBSを加えて、再び3000×g、4℃で2時間遠心する操作を5回繰り返す。ただし5回目の遠心は濾過器上部内の液量が0.5 mlになるまで行い、この濾過器上部に残った液を抗ヒト・オキュロスバニン抗体試料とする。

【実施例6】 細胞傷害活性

生物活性の指標として、抗体依存性細胞傷害活性を測定する。

ヒト・オキュロスバニン発現細胞（実施例3）をトリパンブルー染色法で計数後、10%ウシ胎児血清（Moregate社製）を含むRPMI 1640 培地（インビトロジェン社製、以下RPMI培地）で 1×10^6 cells/mlに調製した。2.5 μ lのbis (acetoxymethyl) 2, 2':6', 2''-terpyridine-6, 6''-dicarboxylic acid (BATDA 標識試薬、パーキンエルマー社製) を添加後よく撹拌し、37℃、5%二酸化炭素存在下80分間、途中5分間隔で転倒撹和しながらインキュベートする。RPMI培地10 mlを添加して撹拌後1500 rpmで5分間遠心分離し、この洗浄操作をさらに2回繰り返す。このようにして得られたBATDA標識ヒト・オキュロスバニン発現細胞をRPMI 1640 培地10 mlに再懸濁し、あらかじめRPMI 1640 培地で1 μ g/mlに調製した精製マウス抗ヒト・オキュロスバニン抗体 もしくは ハイブリドーマ培養上清を添加して4℃に30分間静置した96穴丸底マイクロプレートに50 μ l (5×10^5 cells) ずつ播種して4℃でさらに30

分間静置する。陰性コントロールウェルには精製マウス抗ヒト・オキユロスバニン抗体 もしくは ハイブリドーマ上清の代りにRPMI 1640培地を添加する。

エフェクター細胞は以下のように調製する。あらかじめ100 ng/mlのマクロファージコロニー刺激因子（シグマ社製）存在下で3日間培養したJ774A.1細胞（大日本製薬）をトリパンブルー染色法で計数後、RPMI培地で 1×10^6 cells/mlに調製する。先の96穴丸底マイクロプレートに100 μ l (1×10^6 cells) ずつ播種してプレートを1500 rpmで5分間遠心し、37℃、5%二酸化炭素存在下4時間インキュベートする。陽性コントロールウェルには、BATDA標識ヒト・オキユロスバニン発現細胞を完全に殺傷するためエフェクター細胞の代りに1% Trilon X-100を添加する。4時間のインキュベート後、各ウェルから20 μ lの培養上清を採取して96穴白色プレートに移し、ユーロピウム溶液（パーキンエルマー社製）200 μ lを添加する。室温で15分間振とう後、時間分解蛍光を測定する。

各ウェルの細胞死誘導率は以下の計算式より算出する。細胞死誘導率(%) = (各テストウェルのカウント - 陰性コントロールウェルのカウント) / (陽性コントロールウェルのカウント - 陰性コントロールウェルのカウント) $\times 100$

RPMI 1640培地のためのコントロールと比較し、精製マウス抗ヒト・オキユロスバニン抗体若しくはハイブリドーマ上清の添加により、ヒト・オキユロスバニン発現細胞への細胞死の誘導が認められる。

【実施例7】 免疫原及び抗体検出系抗原としてのヒト・オキユロスバニン発現細胞及びその膜画分の調製

a) プラスミド pEF-DEST61-NM_031945 の構築

pENTR Directional TOPO Cloning Kits（インビトロジェン社製）を添付プロトコールに従って用い、実施例2a)によって得られたNM_031945 cDNAをpENTR/D-TOPOベクターにクローニングした。NM_031945 cDNAを、キット付属

の反応バッファー中でTopoisomeraseを結合させてあるpENTR/D-TOPOベクターと混合し室温で30分間インキュベートした。得られた反応物を用いて大腸菌OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製)を形質転換し、50 μ g/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果カナマイシン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、1mlの50 μ g/mlのカナマイシンを含む液体TB培地中で37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、Montage Plasmid Miniprep_{ss} Kit(ミリポア社製)を利用することによりプラスミドDNAを単離精製した。得られたプラスミドDNAについて、BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kitをそ添付プロトコールに従って用いることにより反応を行った後、ABI PRISM 3100 DNA Analyzer(アプライド・バイオシステムズ社製)によりヌクレオチド配列解析を行い、GenBank アクセッション番号(ACCESSION NO. NM_081945 に示されるヌクレオチド配列のOpen ReadingFrameを有するcDNA(配列番号1)が、pENTR/D-TOPOベクターに組み込まれていることを確認した。

次に発現用ベクターpcDNA3.1/DEST40(インビトロジェン社製)へGATEWAYTMシステムを用いて遺伝子の乗せ替えを行った。すなわち、GATEWAYTM LR ClonaseTM Enzyme Mix(インビトロジェン社製)4 μ l、LR Reaction Buffer 4 μ l、pENTR/D-TOPO-NM_081945 0.3 μ g、pcDNA3.1/DEST40 0.3 μ gをTEバッファーで20 μ lに調整し、25 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。反応後、2 μ lのProteinase Kを加え、37 $^{\circ}$ Cにて10分間反応させる。得られた反応物を用いて大腸菌OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli(インビトロジェン社製)を形質転換し、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アンピシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、100mlの50 μ g/mlのアンピシリンを含む液

5
49

体LB培地中で37℃で一晩培養し、Plasmid MAXI Kit (QIAGEN社製) を利用することによりプラスミドDNA (pCDNA3.1-DEST40-NM_031945) を単離精製した。

同様に発現用ベクターpEF/DEST51 (インビトロジェン社製) へGATEWAY™システムを用いて遺伝子の乗せ替えを行った。すなわち、GATEWAY™ LR Clonase™ Enzyme Mix (インビトロジェン社製) 4μl、LR Reaction Buffer 4μl、pENTR/D-TOPO-NM_031945 0.3μg、pEF/DEST51 0.3μgをTEバッファで20μlに調製し、25℃で1時間反応させる。反応後、2μlのProteinase Kを加え、37℃にて10分間反応させる。得られた反応物を用いて大腸菌OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製) を形質転換し、50μg/mlのアンプシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アンプシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、100mlの50μg/mlのアンプシリンを含む液体LB培地中で37℃で一晩培養し、Plasmid MAXI Kit (QIAGEN社製) を利用することによりプラスミドDNA (pEF-DEST51-NM_031945) を単離精製した。

b) プラスミド pEF-DEST51- NM_031945 のBALB-3T3細胞及び293T細胞へのトランスフェクション

BALB-3T3細胞 (理研 clone A31) を、10% ウシ血清 (GIBCO製) (以下「BS」という) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (以下「DMEM」という: SIGMA社製) を入れた細胞培養用150mmDish (培養面積148cm²; IWAKI社製) 830枚中でセミコンフルエントになるまで37℃、5% 炭酸ガス下で培養した後、pEF-DEST51- NM_031945 をBALB-3T3細胞にトランスフェクションした。BALB-3T3細胞へのトランスフェクションは (株) Gene Therapy Systems製のGeneporter™ 2 Transfection Reagentを用いてリポフェクションにより行った。すなわち、細胞を無血清培地 (DMEM) で一度洗浄したのち、20mlの無血清培地 (DMEM) を加えた。次に50mlファルコンチューブ中に

New DNA Diluentを0.6mlと、上記方法にて回収したプラスミドDNA (pEF-DEST51-NM_031945) 24 μ gを加え、混合した。別の50mlファルコンチューブ中に無血清培地 (Opti-MEM I; GIBCO 社製) 0.35 mlと、Geneporter™ 2 Reagent 84 μ lを加え、混合した。DNA溶液とGeneporter™ 2溶液を混合し、室温にて20分間放置した。その後、DNA-Geneporter™ 2混合液を細胞に加え (1 ml/dish)、37℃、5% CO₂下で培養した。3時間後 10% ウシ血清を含むDMEM 20ml/dishに培地交換して、37℃、5% CO₂下で一晩培養した。

また、プラスミドpEF-DEST51-NM_031945を293T細胞に以下のように導入した。293T細胞への導入は、LIPOFECTAMINE 2000試薬 (Invitrogen社) を用いて行った。293T細胞を2.5 $\times 10^5$ 個/9.2cm²の密度でまき込み、37℃、5%炭酸ガス下で一晩培養した。5mlポリプロピレン製チューブで、10 μ lのLIPOFECTAMINE 2000試薬と250 μ lのOPTI-MEM I Reduced-Serum Medium (Invitrogen社) を混合し、室温で5分間反応させた。別の5mlポリプロピレン製チューブで、4 μ gのプラスミドpEF-DEST51-NM_031945と250 μ lのOPTI-MEM I Reduced-Serum Mediumを混合した。LIPOFECTAMINE溶液とDNA溶液を混合し、室温で20分間反応させた。一晩培養した293T細胞の培養上清を除き、2ml/9.2cm²の割合で抗生物質が入っていない10%ウシ胎児血清 (Moregate社) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (GIBCO社) を添加した。LIPOFECTAMINE-DNA混合液を293T細胞へ添加し、37℃、5%炭酸ガス下で2日間培養した。

c) 細胞膜画分の調製 (10L分)

上記の方法にて培養した細胞をPBS (-) 緩衝液 (大日本製薬 (株) 製) で洗浄した。セルスクレーパー (IWAKI 社製) を用いて細胞を回収し、5mM Trisバッファー pH7.4 230mlに懸濁した。4℃にて30分間細胞溶液を放置した。Dounce Type B ホモジェナイザー (50ストローク)

にて細胞を破砕した。1000Gで10分間、遠心分離機（KUBOTA製）にて遠心し、上清を回収した。

上清を78000G 100分間、超遠心分離機（BECKMAN製）にて遠心し、沈殿を回収した。沈殿に57%スクロース in Tris Buffer を14ml 加え、重層し、78000G、16時間、4℃でシヨ糖密度勾配にて遠心し、上層の膜面分を回収した。膜面分に5mM Tris バッファー pH7.4 55ml を加え、78000G、60分、4℃で遠心し、沈殿を回収した。沈殿に5mM Tris バッファー pH7.4 1500 μ l を加え、Dounce Type B ホモジェナイザー（10ストローク）にて細胞溶解液を均一化した。発現確認の項で述べたウエスタンブロッティング法により、細胞膜面分を測定した。

【実施例8】 マウスの免疫及び細胞融合

a) 免疫

実施例7で得られたヒト・オキユロスバニン遺伝子発現細胞 1×10^7 cell を5週令のBALB/cマウス雌（日本エスエルシーより購入）腹腔内に投与した。2,4,6,8週間後、同様のヒト・オキユロスバニン遺伝子発現細胞（ 1×10^7 cell /マウス）を腹腔内に投与し追加免疫した。

b) 細胞融合

追加免疫4日後のマウスより脾臓を摘出し、これを10mM HEPES緩衝液（pH7.4）、0.02mg/ml 炭酸水素ナトリウム、300 μ g/ml L-グルタミン酸を含む無血清MEM培地（イーグルMEM培地「ニッスイ」（1）：日本製薬（株）社製9.4g/L）（以下「無血清MEM培地」という）10ml 中に入れ、21Gの注射針とピンセットを使い脾臓細胞を掻き出した。この細胞懸濁液を遠心して脾臓細胞を沈殿させた後、この脾臓細胞を無血清MEM培地で2回洗浄してから、無血清MEM培地に懸濁して細胞数を測定した。

一方、15% FBS（GIBCO社製）、306 μ g/ml グルタミン酸、0.05mM β -メルカプトエタノールを含むミエローマ増殖培地（以下「ME培地」という）にて、37℃、7% 炭酸ガス存在下で細胞濃度が 1×10^6 細胞/ml を越えないように培養したミエローマ細胞SP2/0を同様に無血清MEM培地で洗浄し、無血清MEM培地に懸濁して細胞数を測定した。

脾臓細胞の 1/5 個相当の SP2/0 細胞懸濁液と、全脾臓細胞懸濁液を混合し、遠心後、上清を完全に除去した。以下の細胞融合の操作は、ペレットの入ったプラスチック遠心管を室温で実施した。このペレットに、40% (w/v) ポリエチレングリコール 4000 (Merck 社製) 1ml を、遠心管を振りながらゆっくり添加した後、予め 37℃ に加温しておいた無血清 MEM 培地 9ml を 3 回に分けてゆっくり添加した。遠心後、上清を除去し、20% FBS を含むヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン培地（以下「HAT 培地」という；SIGMA 社製） 2.5×10^4 cells/ml になるように、ピペットの先でゆっくり攪拌しながら添加した。細胞培養用 96 穴マイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注し、37℃、7% 炭酸ガス下で培養した。1 日後、HAT 培地を全 well に $100 \mu\text{l}$ 添加し、その後も 2、3 日毎に交換した。このようにして得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供した。

c) 限界希釈

上記 b) で得られた融合細胞を含む培養液を、HT 培地 (2nd cloning 以降は HY 培地) で細胞の密度が 1 cell/well (10 cells/ml)、5 cells/well (50 cells/ml) となるように段階希釈した。こうして調整した各試料をあらかじめ $100 \mu\text{l}$ の HY 培地を各 well に分注しておいた 96well プレートに、 $100 \mu\text{l}$ /well ずつ分注し、37℃、7% 炭酸ガス下で 10 日間培養した。

d) 選別

d-1) ELISA

実施例 7 で取得した細胞膜画分を $1 \mu\text{g/ml}$ で $50 \mu\text{l}$ /well ずつ 96 穴 BIA プレート (COSTAR 社製) へ分注した。1 日間 4 度で放置後、プレート内の抗原液をよく振り捨て、PBS(-) に 1% BSA を添加した溶液を $80 \mu\text{l}$ /well 添加し、プレートシールをし、使用時まで 4℃ で保存した。使用時に室温に戻し、0.1% Tween20 入り PBS (PBS-T) を通した Scravasher (Bio-Tec 社製) でプレートを 3 回洗浄した。一次抗体として細胞融合後 10-12 日経過した細胞培養上清 $50 \mu\text{l}$ を加え、室温で一時間静置した。一次抗体反応終了後、PBS-T で 3 回洗浄し、PBS-T に 0.5% BSA を添加した溶液 (抗体希釈液) で 5000 倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体 (BIO SOURCE 社製) を $50 \mu\text{l}$ /well ずつ添加し、室温で一時間静置した。二次抗体反応終了後、室温に戻したアルカリホスファターゼ用

発色基質 p-ニトロフェニルリン酸 $2\text{Na}_6\text{H}_2\text{O}$ (pNPP、和光純薬工業社製) を 1mg/ml 濃度で pNPPBuffer (97ml/l ジエタノールアミン、 0.1g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ PH9.8) に溶解し、 $100\mu\text{l/well}$ 加えた。プレートリーダー (ナルジェンクイインターナショナル社製) で 405nm 、 630nm の吸光度を測定した。

d-2) フローサイトメーター

実施例7で取得した HEK293 培養細胞を、 10% FBS を含む DMEM 培地中で、 37°C 、 5% 炭酸ガス下で培養し増殖させ、トランスフェクション後 24 時間培養してから、 2×10^7 細胞/ ml に調製した細胞懸濁液を、V 字底 96 穴マイクロプレート (Corning 社製) に $50\mu\text{l}$ / ウェルずつ分注し、遠心分離 ($1000 \times g$ 、 20°C 、5 分) した。上清を除去し、上記 c) で培養する融合細胞の培養上清を $50\mu\text{l}$ / ウェル加えて攪拌した後、氷上で 0.75 時間静置してから、遠心分離 ($1000 \times g$ 、 20°C 、5 分) して上清を除去した。ペレットを $150\mu\text{l}$ / ウェルのフローサイトメトリー用緩衝液 (5% FBS を含む MEM) で 2 回洗浄した後、33 倍希釈したフルオレッセイン-5-イソチオシアネート (Fluorescein-5-isothiocyanate; 以下「FITC」という) 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 IgG 画分 (和光純薬工業社製) $100\mu\text{l}$ を二次抗体として加え、氷上で 0.75 時間静置した。遠心分離 ($1000 \times g$ 、 20°C 、5 分) して上清を除去してから、ペレットをフローサイトメトリー用緩衝液 $150\mu\text{l}$ / ウェルで 2 回洗浄し、ペレットをフローサイトメトリー用緩衝液 $500\mu\text{l}$ / ウェルに懸濁したものをフローサイトメトリー用試料とした。各試料中の細胞の FITC 蛍光強度をフローサイトメーター (FC500; BECKMAN 社製) で測定した (励起波長: 488nm 、検出波長: 530nm)。その結果、融合細胞培養上清を添加しなかった HEK293 transient 発現細胞よりも高値の FITC 蛍光強度を示した試料に対応する融合細胞を選別した。

e) クローニング

上記 d) で選別される細胞群について、上記 c) から d) の一連の工程を 2 回繰り返すことにより、HEK293 transient 発現細胞と結合するが抗ヒト・オキユロスバニン発現プラスミド導入前の細胞と結合しない単一の抗体を産生するハイブリドーマを数クローン得た。このようにしてクローニングされたハイブリドーマ株のひとつは、O3B8-2C9-4F3 と命名され、独立行政法人

産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2004年2月17日付けで、寄託番号FERM BP-08627として寄託されている。

【実施例9】 抗ヒト・オキユロスバニンモノクローナル抗体の精製

実施例8で作製されたマウス-マウスハイブリドーマを、 1×10^6 cells/mlとなるようHY培地に懸濁し、37℃、7% CO₂下で8日間静置した。こうして得られた培養液を遠心分離(1600rpm, 5min)し、上清を回収してIgGの粗精製を以下の条件で行った。

結合バッファー: pH7.0 (20mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 20mM Na₂HPO₄ · 2H₂O)

溶出バッファー: pH3.0 100mM グリシン-HCl

中和バッファー: pH9.0 1M Tris-HCl

ProteinG担体(Amersham Biosciences社製を必要量分取し、エタノール除去後、超純水で2回wash、結合バッファーで1回wash後、結合バッファーを加えて、50%ゲルスラリーとした。ハイブリドーマ上清にProteinGゲルスラリーを加え、一昼夜4℃でrotate後、結合バッファーで3回洗浄した。洗浄後、溶出バッファーを加え、抗体を溶出させた。溶出液は溶出バッファーの1/10量の中和バッファーを入れたチューブ内に受けた。溶出液はサンプルチューブ型膜外濾過器(amicon Ultrafree-MC:Millipore社製の上部に入れて、5000×g、4℃、20分間で遠心し、濾過器下部に回収されたる液を除去しつつ、濾過器上部の液量が50μlを下回らないよう溶出液を添加した。溶出液を全て添加した後、PBS(-)を溶出液の3倍分のvolumeを加え、Buffer交換し、この濾過器上部に残った液を抗抗ヒト・オキユロスバニン抗体試料とした。

【実施例10】 細胞傷害活性

生物活性の指標として、抗体依存性細胞傷害活性を測定した。実施例7で作製されたヒト・オキユロスバニン発現細胞をトリパンブルー染色法で計数後、10%ウシ胎児血清(Moregate社製)を含むRPMI1640培地(インビトロジェン社製、以下RPMI培地)で 8×10^5 cells/0.4mlに調製した。Chromium-51(クロム酸ナトリウム、アマシャムバイオサイエンス社製)40μlを添加後、37℃、5%二酸化炭素存在下

、2時間インキュベートした。RPMI 培地 8 ml を添加して撹拌後 1500 rpm で5分間遠心分離し、この洗浄操作をさらに2回繰り返した。このようにして得られた Chromium-51 標識ヒト・オキユロスバニン発現細胞を RPMI 培地 4 ml に再懸濁し、あらかじめ RPMI 培地で $5 \mu\text{g/ml}$ に調製した精製マウス抗ヒト・オキユロスバニン抗体 $50 \mu\text{l}$ を添加した 96 穴丸底マイクロプレートに $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 cells) ずつ播種して 4°C で 30 分間静置した。陰性コントロールウェル もしくは バックグラウンド測定用ウェルには精製マウス抗ヒト・オキユロスバニン抗体の代わりに RPMI 培地を添加した。

エフェクター細胞は以下のように調製した。すなわち BALB/c-nu/nu マウス (メス・7週齢) より定法に従って脾臓細胞を採取し、トリパンブルー染色法で計数後 RPMI 培地で 1.5×10^7 cells/ml に調製した。先の 96 穴丸底マイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ (1.5×10^6 cells) ずつ播種してプレートを 1500 rpm で5分間遠心し、 37°C 、5% 二酸化炭素存在下 4 時間インキュベートした。陽性コントロールウェルには、Chromium-51 標識ヒト・オキユロスバニン発現細胞を完全に殺傷するためエフェクター細胞の代わりに 2% Trilon X-100 を添加した。バックグラウンド測定用ウェルにはエフェクター細胞の代わりに RPMI 培地を添加した。4 時間のインキュベート後、各ウェルから $50 \mu\text{l}$ の培養上清を採取して 96 穴ルーマプレート (パーキンエルマー社製) に移した。 50°C で一晚乾燥させ、各ウェルの Chromium-51 量をマイクロプレートシンチレーションカウンター (Top Count NTX、パーキンエルマー社製) で測定した。

各ウェルの細胞死誘導率は以下の計算式より算出した。細胞死誘導率 (%) = (各テストウェルのカウント - バックグラウンド測定用ウェルのカウント) / (陽性コントロールウェルのカウント - バックグラウンド測定用ウェルのカウント) $\times 100$

陰性コントロールと比較し、精製マウス抗ヒト・オキユロスバニン抗体の添加により、ヒト・オキユロスバニン発現細胞への細胞死の誘導が認められた (図 5)。

産業上の利用の可能性

本発明により、ヒト・オキユロスバニンがメラノーマで発現量が顕著に増加していることが見出され、該遺伝子を用いた癌の検出方法、癌の検出用キットが提供され、更に、オキユロスバニンに対する細胞傷害活性を有する抗体、該抗体を含む癌治療用医薬組成物が提供された。

配列表フリーテキスト

配列番号 5 : ヒト・オキユロスバニン増幅用 P C R センスプライマー

請 求 の 範 囲

1. ヒト・オキユロスバニンと特異的に結合し、該蛋白質を発現している細胞に対し細胞障害活性を持つ抗体。
2. 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び／又は配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質と特異的に結合し、該蛋白質を発現している細胞に対し細胞傷害活性を持つ抗体。
3. 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害活性であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の抗体。
4. 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害活性であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の抗体。
5. 細胞傷害活性が補体依存性細胞性細胞傷害活性であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の抗体。
6. 細胞傷害活性がアポトーシス誘導であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の抗体。
7. モノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項1乃至6のいずれか一つに記載の抗体。
8. マウスハイブリドーマO3B8-2C9-4F3 (FERM BP-08627) から産生されることを特徴とする、請求項7に記載の抗体。
9. ヒト化されていることを特徴とする、請求項1乃至8のいずれか一つに記載の抗体。
10. 完全ヒト抗体であることを特徴とする、請求項1乃至7のいずれか一つに記載の抗体。
11. IgG抗体であることを特徴とする、請求項1乃至10のいずれか一つに記載の抗体。
12. 下記の工程1)乃至4)を含む、癌の検出方法：
 - 1) 被験者より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
 - 2) 正常人より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
 - 3) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分における、下記のa)又はb)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量

測定する工程；

a) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

b) 上記a)に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

4) 上記工程1) 由来の全RNA画分と上記工程2) 由来の全RNA画分との間における上記工程3) によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記工程1) に記載の被験者の癌を検出する工程。

13. 下記の工程1) 乃至3) を含む、癌の検出方法：

1) 被験者より採取した検体における、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び／又は配列番号4に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質の発現量を測定する工程；

2) 正常人から採取した検体における、上記工程1) に記載の蛋白質の少なくともいずれか一つの発現量を測定する工程；

3) 上記工程1) で検出された蛋白質の発現量と上記工程2) で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の癌を検出する工程。

14. 癌が皮膚癌であることを特徴とする、請求項12又は13に記載の方法

15. 癌がメラノーマであることを特徴とする、請求項12又は13に記載の方法。

16. ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が、ノーザンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイ又はランオン・アッセイであることを特徴とする、請求項12、14及び15のいずれか一つに記載の方法。

17. ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が検体由来の相補的DNA群又は該DNA群の各DNAの部分配列からなるDNAで作製された遺伝子チップ又はアレイを用いることを特徴とする、請求項12、14及び15のいずれか一つに記載の方法。

18. 蛋白質の発現量の測定方法が、該蛋白質に特異的に結合する抗体又はリ

ガンドを用いることを特徴とする、請求項 13 乃至 15 のいずれか一つに記載の方法。

19. 蛋白質の発現量の測定方法が、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法又は固相酵素免疫定量法（ELISA 法）であることを特徴とする、請求項 13 乃至 15 のいずれか一つに記載の方法。

20. 下記の 1) 乃至 3) からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含む癌の検出用キット：

1) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを特異的に増幅するための 15 乃至 30 塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；

2) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための 15 ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；

3) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドが固定された固相化試料。

21. 下記の 1) 及び 2) の少なくとも一つを含む癌の検出用キット：

1) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び／又は配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；

2) 上記 1) に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

22. 癌が皮膚癌であることを特徴とする、請求項 20 又は 21 に記載のキット。

23. 癌がメラノーマであることを特徴とする、請求項 20 又は 21 に記載のキット。

24. 請求項 1 乃至 11 に記載の抗体の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、癌の治療用医薬組成物。

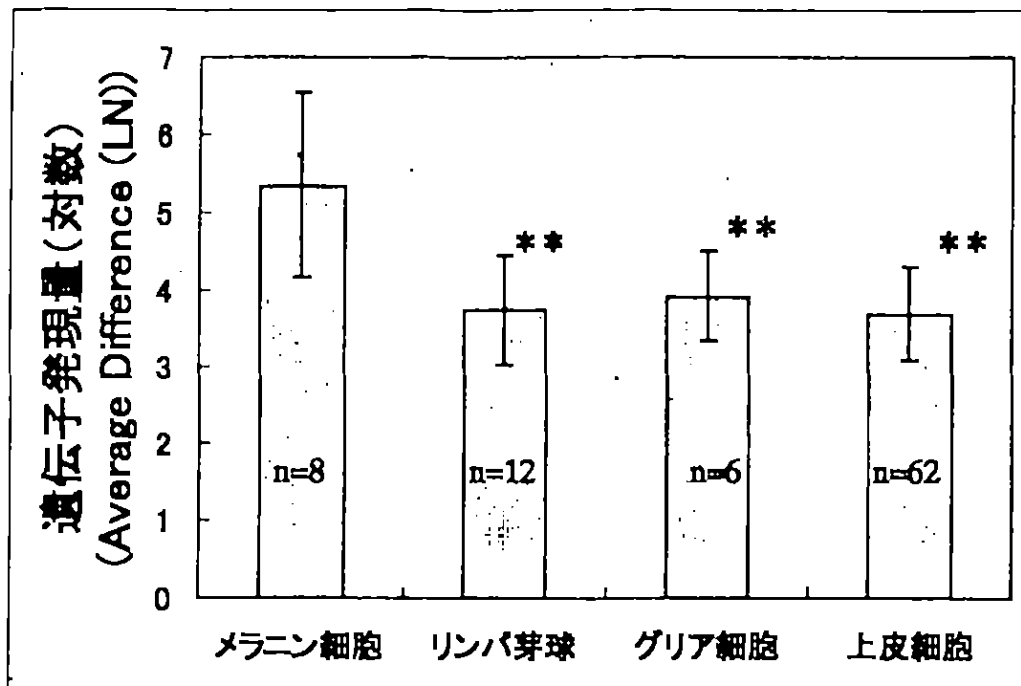
25. 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列又は該配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを含む癌の治療用医薬組成物。

26. 癌が皮膚癌であることを特徴とする、請求項 24 又は 25 のいずれか

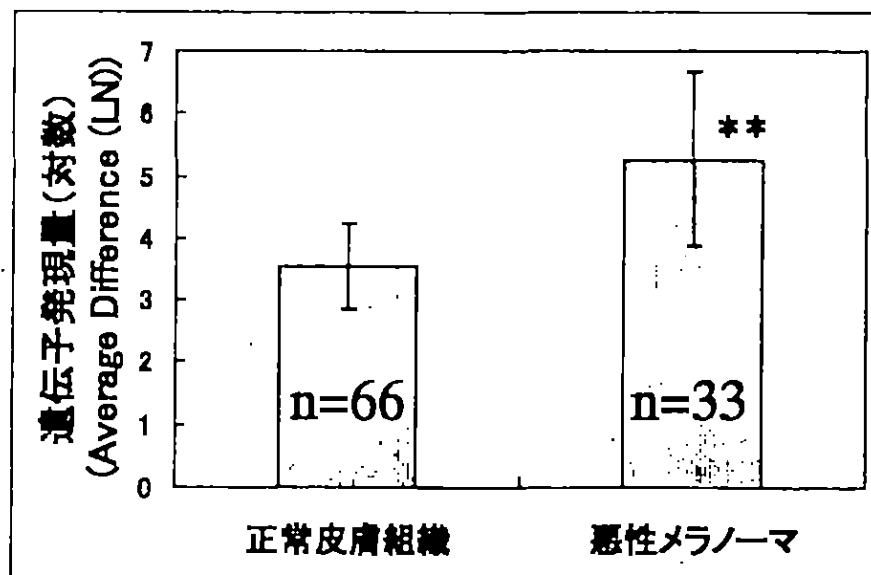
一つに記載の医薬組成物。

27. 癌がメラノーマであることを特徴とする、請求項24又は25のいずれか一つに記載の医薬組成物。

図1



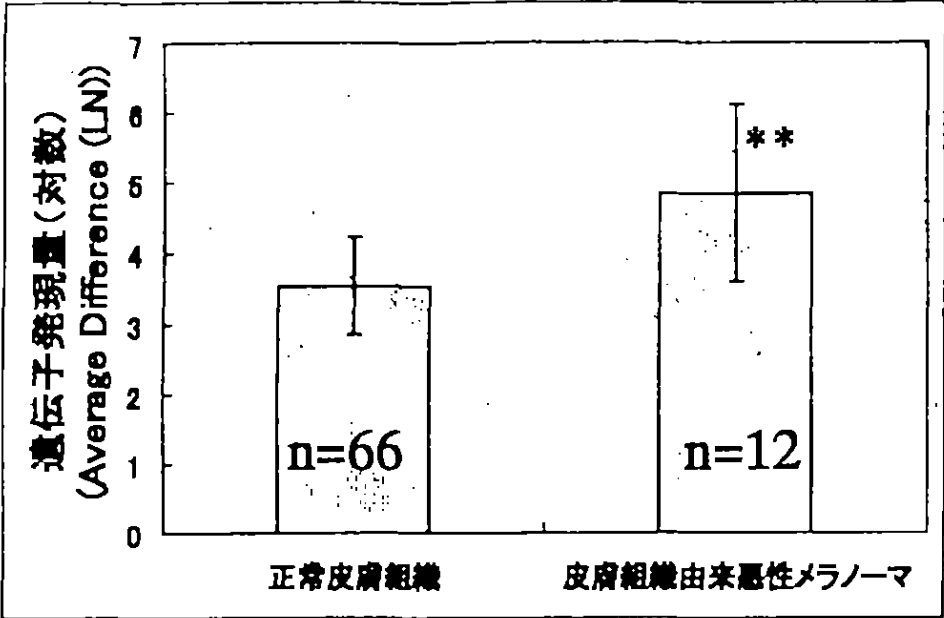
**: $p<0.001$



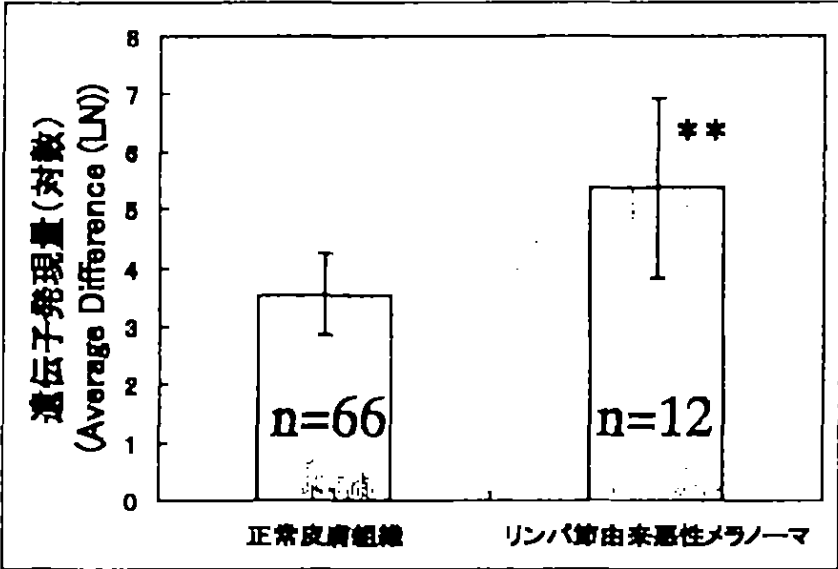
1/5

**: $p<0.001$

図2

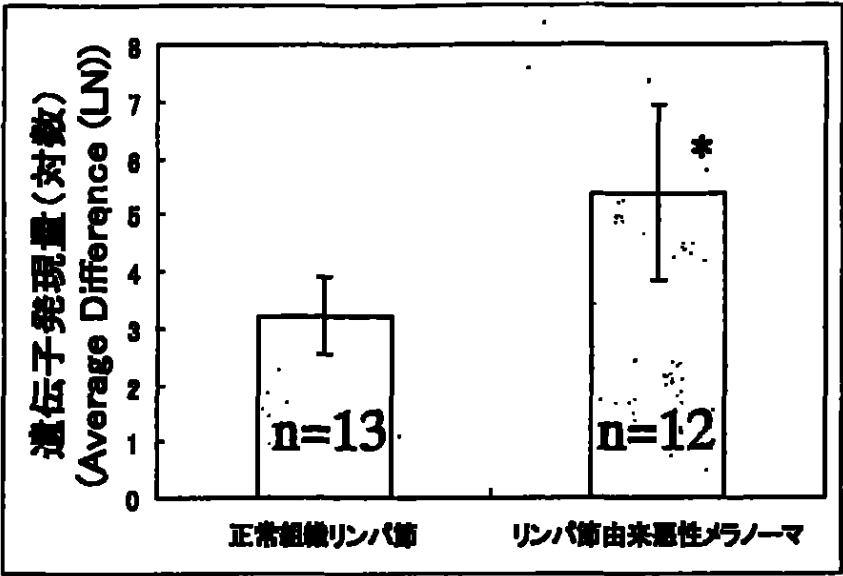


** : $p < 0.001$



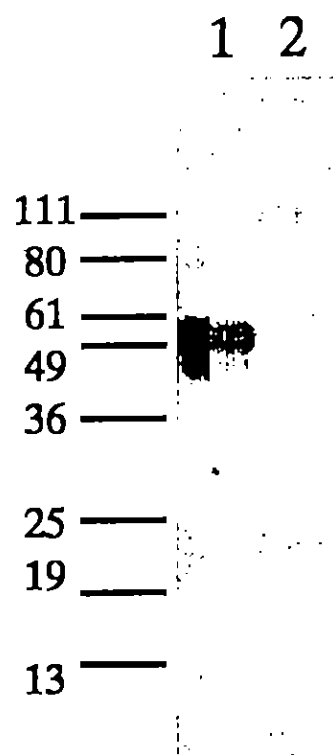
** : $p < 0.001$

図3



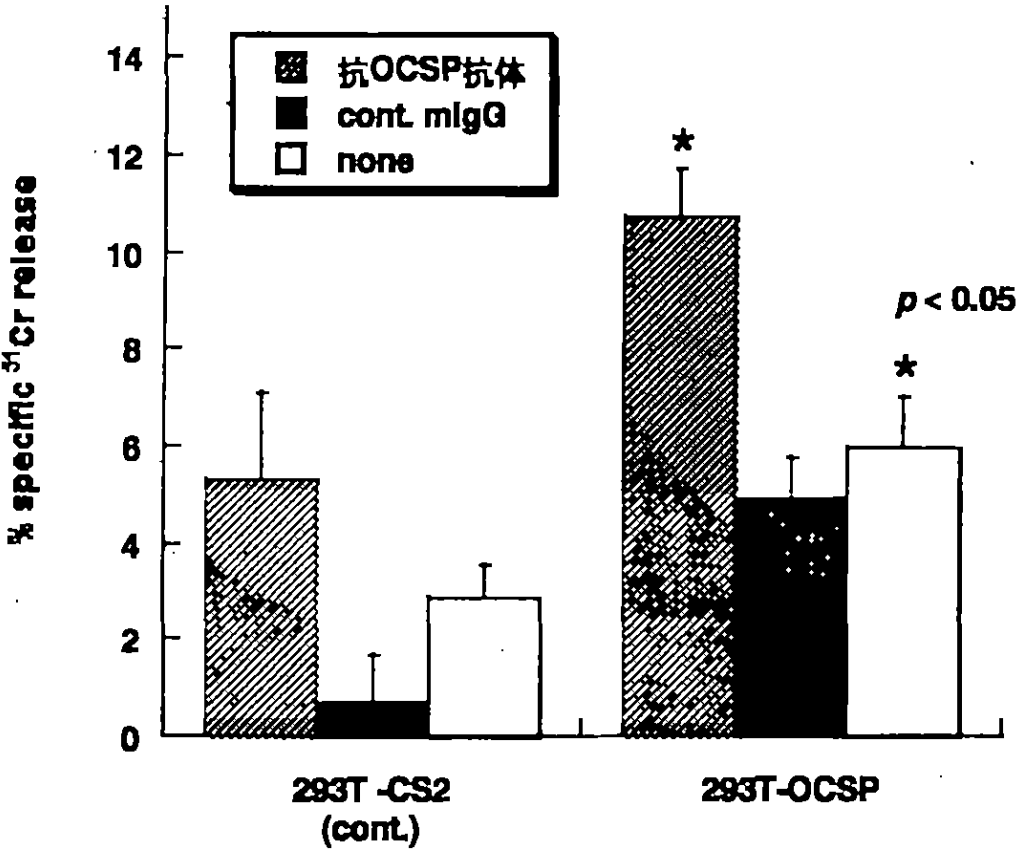
*: $p < 0.01$

図4



レーン1: pDEST40 NM_031945を細胞へ導入
レーン2 何も導入していないコントロール

図5



SEQUENCE LISTING

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Antibodies for the cancer specific antigen

<130> FP0408

<140>

<141>

<150> JP2003-083648

<151> 2003-03-10

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1086

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1065)

<223> Inventor: Ichikawa, Kimihisa; Takahashi, shu; Agatsuma Toshinori;
Fukuchi, Keisuke; Hirai Takehiro

<400> 1

atg gag gag ggg gag agg agc ccc tta ctc tcc cag gaa acf gca ggc 48
Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly
1 5 10 15

cag aag ccc ctc tct gtc cac agg cca ccc acc tca ggc tgc cta ggt 96
Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly
20 25 30

cca gtc ccc agg gag gac cag gcc gag gcc tgg ggc tgc agc tgc tgt 144
Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys Cys
35 40 45

ccc ccg gag acc aag cac cag gcc ttc agt ggc act ccc aag aaa gga 192
Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys Gly
50 55 60

cca gcc cct tcc ctc tcc cca ggg agc agc tgc gtc aag tat ctc atc 240
Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu Ile
65 70 75 80

ttc ctc tcc aac ttc ccc ttc tcc ctc ctc ggg ctc ctc gcc ctc gcc 288
Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala
85 90 95

atc ggg ctc tgg ggc ctc gct gtc aag ggg tct ctc gga agt gat ctc 336
Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp Leu
100 105 110

ggg ggg ccc ctc ccc aca gac ccc atg ctc ggg ctc gca ctc gga ggg 384

Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly Gly
 115 120 125

cig gtc gtc agc gca gca agc ctc gct ggc tgc ctc ggc gcc ctc tgc 432
 Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu Cys
 130 135 140

gag aac acc tgc ctc tta cgt ggc ttc tcc ggc ggc atc ctt gcc ttc 480
 Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala Phe
 145 150 155 160

cig gtc ctt gag gcc gtc gca ggc gcc ctc gtc gtc gcc ctc tgc ggc 528
 Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp Gly
 165 170 175

ccg ctc caa gac agc ctc gag caa acc ctc cgt gtc gcc atc gcc caa 576
 Pro Leu Gln Asp Ser Leu Glu His Thr Leu Arg Val Ala Ile Ala His
 180 185 190

tac cag gac gac cta gac ctc cgc ttc ctc ctc gac caa gtc cag ctc 624
 Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu
 195 200 205

ggc ctc agc tgc tgc gca gct gcc tcc tac cag gac tgc cag cag aac 672
 Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln Asn
 210 215 220

cig tac ttt aac tgc agc tcc ccc ggc gtc cag gcc tgc agc ctt ccc 720
 Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu Pro

68

59

225	230	235	240
gcc tcc tgc tgc atc gac ccc cgc gaa gat gga gcc. tct gtc aac gac 768			
Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Gln Asp Gly Ala Ser Val Asn Asp			
245	250	255	
cag tgc ggc ttc ggg gtc ctg cgc ctg gat gcg gac gca gct cag aga 816			
Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln Arg			
260	265	270	
gtg gtg tac ctg gag ggc tgc ggc ccg ccg ctc cgg cgg tgg ctg cgc 864			
Val Val Tyr Leu Gln Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu Arg			
275	280	285	
gcg aac ctg gct gcc tcg ggc ggc tac gca atc gcg gtc gtc ctg ctg 912			
Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu Leu			
290	295	300	
cag ggc gcg gag ctc ctg ctg gcc gcc cgg cta ctc ggg gcc ctc gct 960			
Gln Gly Ala Gln Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu Ala			
305	310	315	320
gcc cgc agt ggg gcg gcg tac ggc ccc gga gca cgc ggg gag gac cgc 1008			
Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala Arg Gly Gln Asp Arg			
325	330	335	
gct ggc ccc cag agc ccc agc ccc ggc gcc ccg ccc gct gcc aaa ccc 1056			
Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys Pro			
340	345	350	

gcc cgg ggc .
Ala Arg Gly
355

1065

<210> 2
<211> 355
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly
1 5 10 15

Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly
20 25 30

Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys Cys
35 40 45

Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys Gly
50 55 60

Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu Ile
65 70 75 80

Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala
85 90 95

Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp Leu
100 105 110

Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly Gly
115 120 125

Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu Cys
130 135 140

Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala Phe
145 150 155 160

Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp Gly
165 170 175

Pro Leu Gln Asp Ser Leu Glu His Thr Leu Arg Val Ala Ile Ala His
180 185 190

Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu
195 200 205

Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln Asn
210 215 220

Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu Pro
225 230 235 240

Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn Asp

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

<210> 3

<211> 1801

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (66).. (1129)

<400> 3

cacagaggag ccagcgaacc tcctccggcg ccgttctgg gggtttctg tccagcgc 60

aagg atg gag gag ggg gag agg agc ecc tta ctg tcc cag gaa act gca 109

Met Glu Glu Gly Gln Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala

1 5 10 15

ggc cag aag ecc ctg tct gtc cac agg cca ecc acc tca ggc tgc cta 167

Gly Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu

20 25 30

ggt cca gtc ecc agg gag gac cag gcg gag gcc tgg ggc tgc agc tgc 206

Gly Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys

35 40 45

tgt ecc ccg gag acc aag cac cag gcc ttg agt ggc act ecc aag aaa 263

Cys Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys

50 55 60

gga cca gcc cct tcc ctg tcc cca ggg agc agc tgc gtc aag tat ctg 301

Gly Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu

65 70 75

atc ttc ctg tcc aac ttc ccc ttc tcc ctg ctg ggg ctg ctg gcc ctg 349

Ile Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu
 80 85 90 95

gcc atc ggg ctc tgg ggc ctg gct gtc aag ggg tct ctg gga agt gat 397
 Ala Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp
 100 105 110

ctg ggg ggg ccc ctg ccc aca gac ccc atg ctg ggg ctg gca ctg gga 445
 Leu Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly
 115 120 125

ggg ctg gtc gtc agc gca gcg agc ctg gct ggc tgc ctg ggc gcc ctc 493
 Gly Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu
 130 135 140

tgc gag aac acc tgc ctg tta cgt ggc ttc tcc ggg ggc atc ctt gcc 541
 Cys Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala
 145 150 155

ttc ctg gtc ctt gag gcc gtc gcg ggg gcc ctg gtc gtc gcc ctc tgg 589
 Phe Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp
 160 165 170 175

ggc ccg ctg caa gac agc ctg gag cac acc ctg cgt gtc gcc atc gcc 637
 Gly Pro Leu Gln Asp Ser Leu Glu His Thr Leu Arg Val Ala Ile Ala
 180 185 190

cac tac cag gac gac cca gac ctg cgc ttc ctc ctc gac caa gtc cag 685
 His Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln

195	200	205	
cic ggg ctc agg tgc tgc gga gct gcc tcc tac cag gac tgg cag cag			733
Leu Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln			
210	215	220	
aac ctc tac ttt aac tgc agc tcc ccc ggg gtc cag gcc tgc agc ctt			781
Asn Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu			
225	230	235	
ccc gcc tcc tgc tgc atc gac ccc cgc gaa gat gga gcc tct gtc aac			829
Pro Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Gln Asp Gly Ala Ser Val Asn			
240	245	250	255
gac cag tgc ggc ttc ggg gtc ctc cgc ctc gat gcg gac gca gct cag			877
Asp Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln			
260	265	270	
aga gtc gtc tac ctc gag ggc tgc ggc ccg ccg ctc cgg cgg tgg ctc			925
Arg Val Val Tyr Leu Gln Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu			
275	280	285	
cgc gcg aac ctc gct gcc tgc ggc ggc tac gca atc gcg gtc gtc ctc			973
Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu			
290	295	300	
ctc cag ggg gcg gag ctc ctc ctc gcc gcc cgg cta ctc ggg gcc ctc			1021
Leu Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu			
305	310	315	

gct gcc cgc agt ggg gcg gcg tac gcc ccc gga gcg cac ggg gag gac 1069
 Ala Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala His Gly Gln Asp
 320 325 330 335

cgc gct ggc ccc cag agc ccc agc ccc ggc gcc ccg ccc gct gcc aaa 1117
 Arg Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys
 340 345 350

ccc gcc cgg ggc tga ggcacgccc cgaggiccga gacggccacg cacaggata 1172
 Pro Ala Arg Gly
 355

cagggggcgc ctcggcccg ctaaaagcg ctgcctgcgc cgcgcgcgc gccgatttc 1232

gcctgggtt cgggtgaatt cgcgcagga cctaccagc tgcctaat cgtcgtcc 1282

ggtccccca tgcagcccc caacgaggg cgcgcggga agccacgga ctggcggag 1362

gagcagcgg ggcgggagga atctcggag ctgacctca cctcagacc cccatccca 1412

ccccagcgc acgttccca cctctgga cctccccc ctggggcgc cacccttct 1472

ggctcgtga tggggagct aggtccag cctctccct ccagtgcat ttctggggg 1532

atagtaaaig ttctatcgg ggtatcat cctacgtaa agacccaat ctcaaaaaa 1592

aaaaaaaa

1601

<210> 4

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly
 1           5           10           15
Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly
          20           25           30
Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys Cys
          35           40           45
Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys Gly
          50           55           60
Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu Ile
          65           70           75           80
Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala
          85           90           95
Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp Leu
          100          105          110
Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly Gly
          115          120          125
Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu Cys
          130          135          140
Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala Phe
          145          150          155          160
Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp Gly
          165          170          175

```

Pro Leu Gln Asp Ser Leu Glu His Thr Leu Arg Val Ala Ile Ala His
 180 185 190
 Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu
 195 200 205
 Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln Asn
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu Pro
 225 230 235 240
 Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn Asp
 245 250 255
 Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln Arg
 260 265 270
 Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu Arg
 275 280 285
 Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu Leu
 290 295 300
 Gln Gly Ala Gln Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala His Gly Glu Asp Arg
 325 330 335
 Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys Pro
 340 345 350
 Ala Arg Gly
 355

<210> 5

<211> 27

65
64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR sense
primer for OCSP

<400> 6

caccatggag gagggggaga gagccc

27

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gccccgggca agtttggcag cgg

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003048

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/32, C12N15/12, C12Q1/68, G01N33/574, C12P21/08,
A61K31/7088, A61K39/395, A61K48/00, A61P17/00, A61P35/00,
A61P43/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/32, C12N15/12, C12Q1/68, G01N33/574, C12P21/08,
A61K31/7088, A61K39/395, A61K48/00, A61P17/00, A61P35/00,
A61P43/00

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

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

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u>	Wistow G et al.: Expressed sequence tag analysis of human RPE/choroids for the NEIBank Project: over 6000 non-redundant transcripts, novel genes and splice variants., Mol Vis., 2002, Vol.8, pages 205-20	<u>1-13, 16-21,</u> <u>24, 25</u>
A		14, 15, 22, 23, 26, 27
<u>Y</u>	Mammalian Gene Collection Program Team., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2002, Vol.99, No.26, pages 16899-903	<u>1-13, 16-21,</u> <u>24, 25</u>
A		14, 15, 22, 23, 26, 27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family group.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"X" another application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)

"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 May, 2004 (24.05.04)

Date of mailing of the international search report
15 June, 2004 (15.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003048

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	Longo M. et al., Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells., Blood., 2001, Vol.98, No.13, pages 3717-26	<u>1-13,16-21,</u> <u>24,25</u> 14,15,22,23, 26,27
<u>Y</u> A	Azorsa DO et al., A general approach to the generation of monoclonal antibodies against members of the tetraspanin superfamily using recombinant GST fusion proteins., J.Immunol. Methods., 1999, Vol.299, No.1-2, pages 35 to 48	<u>1-13,16-21,</u> <u>24,25</u> 14,15,22,23, 26,27
<u>Y</u> A	JP 8-191692 A (Bristol-Myers Squibb Co.), 30 July, 1996 (30.07.96), & AU 2834995 A & IL 114809 A & CA 2155397 A1 & EP 699756 A1 & US 5728821 A1 & US 5792456 A1	<u>1-13,16-21,</u> <u>24,25</u> 14,15,22,23, 26,27
<u>Y</u> A	WO 01/09187 A2 (MEDAREX INC.), 08 February, 2001 (08.02.01), & CA 2380813 A & AU 6375000 A & EP 1210372 A1 & CN 1399645 T & JP 2003-516718 A	<u>1-13,16-21,</u> <u>24,25</u> 14,15,22,23, 26,27
P, X	WO 03/25138 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY, INC.), 27 March, 2003 (27.03.03), & CA 2381699 A & AU 6902200 A & US 2002/15970 A1 & EP 1204764 A1 & JP 2003-517816 A & US 2003/124579 A1	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003048

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item I.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/003048

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ¹ C07K16/32, C12N15/12, C12Q1/68, G01N33/574, C12P21/08, A61K31/7088, A61K39/395, A61K48/00, A61P17/00, A61P35/00, A61P43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ¹ C07K16/32, C12N15/12, C12Q1/68, G01N33/574, C12P21/08, A61K31/7088, A61K39/395, A61K48/00, A61P17/00, A61P35/00, A61P43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 箇所の範囲の番号
<u>Y</u> A	Wistow G et al, Expressed sequence tag analysis of human RPE/choroid for the NEIBank Project: over 6000 non-redundant transcripts, novel genes and splice variants, Mol Vis., 2002, Vol. 8, p. 205-20.	1-13, 16-21, <u>24, 25</u> 14, 15, 22, 23, 26, 27
<u>Y</u> A	Mammalian Gene Collection Program Team, Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences., Proc Natl Acad Sci U S A., 2002, Vol. 99, No. 26, p. 16899-903.	1-13, 16-21, <u>24, 25</u> 14, 15, 22, 23, 26, 27
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に基拠を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展覧等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 24.05.2004	国際調査報告の発出日 15.6.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 ・日本特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 大笠 紀子	4B 9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	Longo N et al, Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor- endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells., Blood, 2001, Vol. 98, No. 13, p. 3717-26.	1-13, 16-21, <u>24, 25</u> 14, 15, 22, 23, 26, 27
<u>Y</u> A	Azorsa DO et al, A general approach to the generation of monoclonal antibodies against members of the tetraspanin superfamily using recombinant GST fusion proteins., J Immunol Methods, 1999, Vol. 229, No. 1-2, p. 35-48.	1-13, 16-21, <u>24, 25</u> 14, 15, 22, 23, 26, 27
<u>Y</u> A	JP 8-191692 A (プリストルマイヤーズスクイブカンパニー) 1996.07.30 &AU 2834995 A &IL 114809 A &CA 2155397 A1 &EP 699756 A1 &US 5728821 A1 &US 5792456 A1	1-13, 16-21, <u>24, 25</u> 14, 15, 22, 23, 26, 27
<u>Y</u> A	WO 01/09187 A2 (MEDAREX INC) 2001.02.08 &CA 2380813 A &AU 6375000 A &EP 1210372 A1 &CN 1399645 T &JP 2003-516718 A	1-13, 16-21, <u>24, 25</u> 14, 15, 22, 23, 26, 27
P, X	WO 03/25138 A2 (BOS BIOTECHNOLOGY, INC.) 2003.03.27 &CA 2381699 A &AU 6902200 A &US 2002/15970 A1 &EP 1204764 A1 &JP 2003-517816 A &US 2003/124579 A1	1-27

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/003048

第I欄 ニクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に記述するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に記述するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

ANTICUERPO CONTRA ANTIGEN ESPECIFICO DE TUM R C MO**OBJETIVO****CAMPO TECNICO**

5

La presente invención se refiere a un anticuerpo útil en el tratamiento del cáncer, una composición farmacéutica para tratar cáncer caracterizada porque contiene el anticuerpo como un ingrediente activo, un método para detectar cáncer y un equipo para detección de cáncer.

10

TECNICA ANTERIOR

Se sabe que las células tumorales expresan proteínas antigénicas las cuales son intrínsecas al tipo particular de células tumorales (en lo sucesivo algunas veces referidas como "antígenos relacionados con tumor"). Se han realizado intentos por desarrollar nuevas terapias para tratar tumores al señalar antígenos relacionados con tumor. Los anticuerpos monoclonales que producen una respuesta de antígeno-anticuerpo específica para dichos antígenos relacionados con tumor son conocidos por inducir diversos tipos de respuestas inmunes *in vivo* (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), etc.) para atacar células cancerosas, induciendo así la

muerte celular. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales útiles para tratamiento de tumores.

Sin embargo, la gama de anticuerpos monoclonales útiles para el tratamiento de tumores es limitada. Los anticuerpos monoclonales
5 actualmente disponibles son capaces de tratar solamente unos cuantos tipos de tumores que incluyen cáncer de mama metastásico, mielosis leucémica aguda, linfoma crónico intratable, linfoma que no es de Hodgkin, y mielomas múltiples. Se desea el desarrollo de anticuerpos monoclonales aplicables al tratamiento de otros tumores.

10 Para obtener un anticuerpo monoclonal útil para tratamiento de tumores, es necesario identificar una proteína específicamente expresada en una célula tumoral y obtener un anticuerpo monoclonal contra este antígeno de proteína.

La proteína oculospanina humana se obtuvo como un clon de
15 Marca de Secuencia Expresada (EST) derivado de un gen expresado en el epitelio del pigmento retinal y la membrana coroide ocular (Molecular Vision (2002) 8, 25-220). El gen de oculospanina humana tiene un marco de lectura abierto de 1068 pb. La oculospanina humana consta de 355 aminoácidos y se estima que tiene un peso molecular de 36.4 kDa con base en la secuencia de
20 ADN. Sin embargo, todavía se desconoce la relación entre la oculospanina humana y tumores.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención provee un método para detectar cáncer al descubrir un gen específicamente expresado en una célula cancerosa y
5 detectar la expresión del gen, un equipo para detección de cáncer para uso en el método de detección, un anticuerpo el cual se une específicamente a un producto de expresión del gen, un anticuerpo que tiene actividad citotóxica y una composición farmacéutica para tratar cáncer que contiene el anticuerpo como un ingrediente activo.

10 Los inventores de la presente han identificado un gen específicamente expresado en tejido canceroso humano y encontraron que el nivel de expresión del gen de oculospanina humana, el cual tiene una función desconocida, es significativamente mayor en células de melanoma. Con base en este hallazgo, lograron proveer un método para detectar cáncer utilizando
15 el gen, un equipo de detección para cáncer, y una composición farmacéutica para tratar cáncer que contiene un anticuerpo de oculospanina antihumana, completando así la presente invención.

De manera más específica, la presente invención provee:

(1) Un anticuerpo el cual se une específicamente a oculospanina
20 humana y tiene actividad citotóxica contra una célula que expresa esa proteína;

(2) Un anticuerpo el cual se une específicamente a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia

ID No. 2 del listado de secuencias y/o una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia ID No. 4 del listado de secuencias y que tiene actividad citotóxica contra una célula que expresa esta(s) proteína(s);

(3) Un anticuerpo de acuerdo con la sección (1) o (2),
5 caracterizado porque la actividad citotóxica es citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos;

(4) Un anticuerpo de acuerdo con la sección (1) o (2), caracterizado porque la actividad citotóxica es citotoxicidad dependiente de complemento;

10 (5) Un anticuerpo de acuerdo con la sección (1) o (2), caracterizado porque la actividad citotóxica es citotoxicidad mediada por célula dependiente de complemento;

(6) Un anticuerpo de acuerdo con la sección (1) o (2), caracterizado porque la actividad citotóxica es inducción de apoptosis;

15 (7) Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las secciones (1) a (6), caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal;

(8) Un anticuerpo de acuerdo con la sección (7), caracterizado porque el anticuerpo se produce mediante hibridoma de ratón O3B8-2C9-4F3 (FERM BP-08627);

20 (9) Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las secciones (1) a (8), caracterizado porque el anticuerpo es humanizado;

(10) Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las secciones (1) a (7), caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo humano completo;

(11) Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las secciones (1) a (10), caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG;

(12) Un método para detectar cáncer, que comprende los siguientes pasos 1) a 4) de:

1) extraer una fracción de ARN total de un espécimen tomado de un sujeto de prueba;

2) extraer una fracción de ARN total de un espécimen tomado de un sujeto saludable;

3) medir el nivel de expresión de un polinucleótido representado por los siguientes incisos a) o b) en las fracciones de ARN total derivadas de los pasos 1) y 2):

a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la Secuencia ID No. 1 del listado de secuencias;

b) un polinucleótido el cual hibrida con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a aquella del polinucleótido de acuerdo con a) bajo condiciones astringentes;

4) analizar la diferencia en nivel de expresión del polinucleótido entre las fracciones de ARN total derivadas del paso 1) y paso 2), medidas en el paso 3) y detectar así cáncer en el sujeto de prueba del paso 1);

(13) Un método para detectar cáncer, que comprende los pasos

1) a 3) de:

1) medir el nivel de expresión de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la Secuencia ID No. 2 del
5 listado de secuencias y/o el nivel de expresión de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la Secuencia ID No. 4 en un espécimen tomado de un sujeto de prueba;

2) medir el nivel de expresión de por lo menos una de las proteínas de acuerdo con el paso 1) en un espécimen tomado de un objeto
10 saludable; y

3) analizar una diferencia en nivel de expresión entre la proteína detectada en el paso 1) y la proteína detectada en el paso 2), y detectar así cáncer en el sujeto de prueba;

(14) Un método de acuerdo ya sea con la sección 12 o 13,
15 caracterizado porque el cáncer es cáncer de piel;

(15) Un método de acuerdo ya sea con la sección 12 o 13, caracterizado porque el cáncer es melanoma;

(16) Un método de acuerdo con cualquiera de las secciones (12), (14) o (15), caracterizado porque el nivel de expresión del polinucleótido se
20 mide a través de Northern blotting, dot blotting, slot blotting, RT-PCR, ensayo de protección de ribonucleasas o un ensayo de transcripción (*run-on*);

(17) Un método de acuerdo con cualquiera de las secciones (12), (14) o (15), caracterizado porque el nivel de expresión del polinucleótido se

mide utilizando un chip o disposición génica preparada a partir de ADN que comprende ADN complementarios derivados del espécimen o secuencias parciales de los ADN complementarios;

(18) Un método de acuerdo con cualquiera de las secciones (13) a (15), caracterizado porque el nivel de expresión de la proteína se mide utilizando un anticuerpo o un ligando el cual se une específicamente a la proteína;

(19) Un método de acuerdo con cualquiera de las secciones (13) a (15), caracterizado porque el nivel de expresión de la proteína se mide a través de Western blotting, dot blotting, slot blotting o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (método ELISA);

(20) Un equipo de detección para cáncer que comprende por lo menos un componente seleccionado de los siguientes incisos 1) a 3):

1) un iniciador de oligonucleótido de 15 a 30 bases de longitud para amplificar específicamente un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la Secuencia ID No.1 del listado de secuencias;

2) una sonda de polinucleótidos de no más de 15 nucleótidos continuos capaces de hibridar con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la Secuencia ID No. 1 del listado de secuencias bajo condiciones astringentes, y detectar así el polinucleótido; y

3) un espécimen inmovilizado que tiene un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la Secuencia ID No. 1 del listado de secuencias inmovilizado en la misma;

5 (21) Un equipo de detección para cáncer que comprende por lo menos uno de los siguientes componentes 1) y 2):

1) un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la Secuencia ID No. 2 del listado de secuencias y/o una secuencia de aminoácidos representada por la Secuencia ID No. 4 del listado de secuencias, y detectar
10 así la(s) proteína(s);

2) un anticuerpo secundario capaz de unirse a un anticuerpo de acuerdo con la sección 1) anterior;

(22) Un equipo de acuerdo con las secciones (20) o (21), caracterizado porque el cáncer es cáncer del piel;

15 (23) Un equipo de acuerdo con las secciones (20) o (21), caracterizado porque el cáncer es melanoma;

(24) Una composición farmacéutica para tratar cáncer que comprende por lo menos uno de los anticuerpos de acuerdo con las secciones (1) a (11);

20 (25) Una composición farmacéutica para tratar cáncer que comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos representada por la

Secuencia ID No.1 del listado de secuencias o una secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos de la Secuencia ID No. 1.

(26) Una composición farmacéutica de acuerdo con la sección (24) o (25), caracterizada porque el cáncer es cáncer de piel; y

5 (27) Una composición farmacéutica de acuerdo con la sección (24) o (25), caracterizada porque el cáncer es melanoma.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

10 La figura 1, figura superior, es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen de oculospanina humana en diversos tipos de células; y la figura inferior es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen de oculospanina humana en muestras de piel de una persona saludable y en muestras de melanoma;

15 la figura 2, figura superior, es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen de oculospanina humana en muestras de piel de una persona saludable y en muestras de melanoma derivadas de tejido de piel; y la figura inferior es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen de oculospanina humana en muestras de piel de una persona saludable y en
20 muestras de melanoma derivadas de tejido de nodo linfático;

la figura 3 es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen de oculospanina humana en muestras derivadas de nodo linfático de una

persona saludable y en muestras de melanoma derivadas de tejido de nodo linfático;

la figura 4 muestra la expresión de los productos génicos de oculospanina humana en células NIH3T3; y

5 la figura 5 es una gráfica que muestra la actividad citotóxica dependiente de anticuerpo de un anticuerpo de oculospanina anti-humana en una célula que expresa oculospanina humana.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

10

En la especificación de la presente invención, un compuesto que tiene un efecto terapéutico para el cáncer es un compuesto que tiene una actividad para suprimir el crecimiento del cáncer y/o una actividad para reducir cáncer. En la especificación de la presente invención, los términos "cáncer" y

15 "tumor" tienen el mismo significado. El término "gen" como se utiliza en la presente, incluye no solamente ADN, sino también ARNm del mismo, ADNc y ARNc del mismo. Por consiguiente, el término "gen de oculospanina humana" como se utiliza en la presente, incluye ADN, ARNm, ADNc, y ARNc del gen de oculospanina humana. El término "polinucleótido" como se utiliza en la

20 presente, tiene el mismo significado que el de un ácido nucleico y por lo tanto incluye ADN, ARN, sonda, oligonucleótido e iniciador. Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente. El término "fracción de ARN" como se utiliza en la presente, se refiere a una fracción que

contiene ARN. Además, el término "célula" utilizado en la presente incluye una célula dentro de un cuerpo animal y una célula cultivada. El término "canceración de una célula" utilizado en la presente, se refiere a la proliferación anormal de células, que es ocasionada por su falta de

5 sensibilidad a inhibición de contacto y su proliferación independiente de andamiaje. Una célula que presenta dicha proliferación anormal es referida como una "célula cancerosa". En la especificación, una proteína que tiene la misma función que aquella de oculospanina humana, tal como una actividad de canceración, también es referida como una "oculospanina humana".

10 Nótese que el término "oncogen" como se utiliza en la presente invención incluye un gen precanceroso y un proto-oncogen diferente al oncogen.

El término "citotoxicidad" utilizado en la presente se refiere a un cambio patológico a una célula ocasionada por cualquier razón. Por lo tanto, la citotoxicidad incluye no solamente daño directo externamente infligido, sino

15 también diversos cambios estructurales y funcionales que pueden ocurrir dentro de una célula, que incluyen rompimiento de ADN, dimerización de bases, rompimiento cromosómico, mal funcionamiento del aparato mitótico celular, y una reducción en actividades enzimáticas. El término "actividad citotóxica" utilizado en la presente se refiere a cualquier actividad que

20 ocasione citotoxicidad, como se mencionó anteriormente.

El término "hibrida bajo condiciones astringentes" se refiere a hibridación que se realiza a 68°C en una solución de hibridación comercialmente disponible, especialmente ExpressHyb (fabricada por

Clontech), o hibridación la cual se realiza a 68°C en presencia de NaCl en 0.7 a 1.0 M utilizando un filtro que tiene ADN inmovilizado en el mismo, seguido de lavado a 68°C con solución de 0.1 a 2X SSC (la solución 1X SSC contiene 150 mM de NaCl y 15 mM de citrato de sodio), dando como resultado 5 hibridación. El término anterior también incluye hibridación bajo condiciones equivalentes a las anteriores.

1. Oculospanina humana

10 (1) Confirmación de expresión específica del gen de oculospanina humana

Como resultado del análisis de los niveles de expresión del gen de oculospanina humana en diversos tipos de células humanas, se encontró que el gen se expresa en un nivel de expresión significativamente mayor en 15 melanocitos comparado con otros tejidos. Además, los inventores de la presente encontraron que el nivel de expresión del gen de oculospanina humana en melanoma es significativamente mayor que en melanocitos normales. Para explicarlo de manera más específica, encontraron lo siguiente: cuando se compara el nivel de expresión de oculospanina humana en 20 melanocitos, linfoblastos, células glia y células epiteliales, se encuentra que el nivel de expresión en melanocitos es significativamente superior. Además, cuando se compara el nivel de expresión de oculospanina humana en células de piel normales con el de melanoma, el nivel de expresión es

significativamente superior en el melanoma. A partir de estos hallazgos, se puede concluir que la oculospanina humana puede estar implicada en la canceración de células y/o en la proliferación de células cancerosas. Esto sugiere que el estado de canceración y/o estado de proliferación de células cancerosas ocasionado por la expresión excesiva de oculospanina humana se puede determinar al medir el nivel de expresión de oculospanina humana en células individuales y/o tejidos. Un ejemplo de dicho cáncer es cáncer de la piel, en particular, melanoma. Sin embargo, este descubrimiento aplica a cánceres diferentes a cáncer de piel, siempre que la oculospanina humana se exprese en el cáncer a un nivel significativamente superior que en otros tejidos.

La secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) del gen de oculospanina humana está representada por la Secuencia ID No.1 del listado de secuencias y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la Secuencia ID No. 2. Además, el ADNc del gen de oculospanina humana ha sido registrado en GenBank como ARNm de oculospanina (OCSP) de *Homo sapiens* bajo el No. de acceso NM_031945. La secuencia de nucleótidos de ADNc registrada en GenBank está representada por la Secuencia ID No. 3 del listado de secuencias. El ORF está representado por los nucleótidos Nos. 65 a 1129 de la Secuencia ID No. 3. Además, la secuencia de aminoácidos de oculospanina humana registrada en GenBank está representada por la Secuencia ID No. 4 del listado de secuencias. Una proteína que comprenda una secuencia de aminoácidos que

tiene uno o varios aminoácidos reemplazados, eliminados o añadidos a la secuencia de aminoácidos de oculospanina humana y que presente la misma actividad biológica que aquella de la oculospanina humana, también se incluye en la presente como una oculospanina humana.

5

2. Método para detectar cáncer

La oculospanina humana, debido a que se expresa altamente en células cancerosas, especialmente melanoma, se piensa que está involucrada en la canceración de células, particularmente células de piel, y/o proliferación de células cancerosas. El término "especimen" se refiere a una muestra tomada de un sujeto de prueba o un espécimen clínico, e incluye muestras de tejidos, excremento o similares, tales como muestras de sangre, fluidos corporales, glándula prostática, testículos, pene, vesícula, riñón, cavidad oral, faringe, labio, lengua, gingival, nasofaringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, colon, hígado, vesícula biliar, páncreas, nariz, pulmón, hueso, tejido suave, piel, mama, útero, ovario, cerebro, tiroides, nodo linfático, músculo, y tejido adiposo. En la presente invención, la piel y el nodo linfático son muestras de tejido preferidos.

20

(1) Método para detectar cáncer utilizando el nivel de expresión del gen de oculospanina humana

Un método para detectar cáncer utilizando el nivel de expresión del gen de oculospanina humana específicamente comprende los siguientes

5 pasos 1) a 4):

1) un paso para extraer una fracción de ARN total de un espécimen tomado de un sujeto de prueba;

2) un paso para extraer una fracción de ARN total de un espécimen tomado de una persona saludable;

10 3) un paso para medir el nivel de expresión del gen de oculospanina humana en las fracciones totales de ARN de acuerdo con los pasos 1) y 2); y

4) un paso para analizar la diferencia en el nivel de expresión del gen entre la fracción de ARN total derivada de los pasos 1) y 2), medida en el
15 paso 3) y detectar así el cáncer del sujeto de prueba del paso 1).

Los pasos individuales explicaran más específicamente de la siguiente manera.

a) Paso 1): Extracción de una fracción de ARN total de un
20 **espécimen tomado de un sujeto de prueba**

Al extraer la fracción de ARN total de un espécimen, se obtiene tejido humano a través de un método adecuado que cumpla los estándares éticos para la experimentación. El tejido obtenido se disuelve directamente en

un solvente de extracción de ARN (que contiene un inhibidor de ribonucleasa, tal como fenol). Alternativamente, se recolectan células del tejido obtenido al rasparlas utilizando un raspador para no romper las células, o extraerlas de manera suave del tejido utilizando una enzima proteolítica tal como tripsina, y
5 luego someter las células inmediatamente a un paso de extracción de ARN.

Ejemplos de métodos de extracción de ARN que se pueden utilizar incluyen: métodos de ultracentrifugación de tiocianato de guanidina/cloruro de cesio, métodos de tiocianato de guanidina/fenol caliente, métodos de clorhidrato de guanidina, y métodos de tiocianato de guanidina
10 ácido/fenol/cloroformo (Chomczynski, P. y Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987), 162, 156-159). De éstos, son particularmente adecuados los métodos de tiocianato de guanidina ácido/fenol/cloroformo. Alternativamente, se puede utilizar un reactivo de extracción de ARN comercialmente disponible, tal como ISOGEN (fabricado por Nippon Gene Co., Ltd). o reactivo TRIZOL (fabricado
15 por Gibco BRL), de acuerdo con el protocolo provisto con el reactivo.

A partir de la fracción de ARN total obtenida, si es necesario, es preferible purificar y utilizar el ARNm solo. Se puede emplear cualquier método de purificación adecuado. Por ejemplo, el ARNm se puede purificar adsorbiendo ARNm sobre una sonda oligo (dT) biotinilada, fijando el ARNm a
20 partículas paramagnéticas que tienen estreptavidina inmovilizada en las mismas a través de unión de biotina a estreptavidina, lavando las partículas, y eluyendo ARNm. Alternativamente, el ARNm se puede purificar adsorbiendo ARNm sobre una columna de celulosa de oligo (dT) y eluyendo ARNm de la

misma. Sin embargo, un paso de purificación de ARNm no es esencial en métodos de la presente invención. Siempre que se pueda detectar la expresión de un polinucleótido deseado, se puede utilizar una fracción de ARN total, como se puede realizar en los pasos posteriores.

5

b) Paso 2): Extracción de una fracción de ARN total de un espécimen tomado de una persona saludable

En la presente invención, una persona saludable significa una persona que no tiene cáncer. La determinación en cuanto a que si una

10 persona es una persona saludable o no, se puede realizar al medir la concentración de oculospanina humana y determinar si el valor de concentración medido cae o no dentro de una escala predeterminada para una persona saludable. Alternativamente, la correlación entre el nivel de expresión de oculospanina humana y el grado de formación de cáncer se

15 puede investigar por anticipado, y posteriormente, se puede realizar la determinación de si un sujeto de prueba es o no una persona saludable al medir el nivel de expresión de oculospanina humana en un espécimen tomado del sujeto de prueba. La preparación de una fracción de ARN total a partir de una persona saludable se puede realizar de la misma manera que se

20 describió anteriormente en el paso 1).

c) Paso 3): Medición del nivel de expresión del gen de oculaspanina humana en una fracción de ARN total de acuerdo con los pasos 1) y 2)

El nivel de expresión de oculaspanina humana se representa por el nivel de expresión de un polinucleótido que puede hibridar con un polinucleótido el cual comprende la secuencia de nucleótidos representada por la Secuencia ID No. 1 del listado de secuencias o un polinucleótido el cual comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos representada por la Secuencia ID No. 1 del listado de secuencias, bajo condiciones astringentes.

El nivel de expresión de oculaspanina humana, se puede determinar utilizando un espécimen inmovilizado, éste y otros métodos se describen a continuación.

(a) Ensayo que utiliza muestras inmovilizadas

(i) Muestras inmovilizadas

Los siguientes son ejemplos de muestras inmovilizadas.

i) Chips génicos

Se puede utilizar un chip génico en el cual está inmovilizado ya sea un oligonucleótido antisentido, el cual se sintetiza con base en una secuencia de EST (marca de secuencia expresada) a partir de una base de

datos, o una secuencia de ARNm. Ejemplos de dichos chips génicos incluyen chips génicos fabricados por Affymetrix (Lip Shutz, R.J. *et al.*, Nature Genet. (1999), 21, suplemento, 20-24), pero no se limitan a los mismos, y se pueden preparar con base en cualquier método conocido. Cuando se analiza el ARNm derivado de una célula humana, de preferencia se utiliza un chip génico derivado de secuencias humanas. Por ejemplo, se pueden utilizar las secuencias humanas de conjunto U95 o conjunto U133 fabricadas por Affymetrix. Sin embargo, los chips génicos adecuados no están limitados a éstos, y se puede utilizar un chip génico derivado por ejemplo de una especie animal estrechamente relacionada con un humano.

ii) Disposiciones o filtros de membrana en los cuales está inmovilizado un producto de ADNc o RT-PCR preparado a partir de ARN humano total o ARN total, tomado de un tejido específico de un sujeto humano

El producto de ADNc o RT-PCR puede ser un clon obtenido al realizar una reacción de transcripción inversa y PCR utilizando un iniciador preparado a base de una secuencia de una base de datos tal como una base de datos de EST humana. El producto de ADNc o RT-PCR puede haber sido seleccionado previamente mediante el uso de un método de substracción (Diatchenki, L, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, USA (1996) 93, 6025-6030) o un método de despliegue diferencial (Liang, P., *et al.*, Nucleic Acids Res., (1992) 23, 3685-3690) con base en el ARN total en el cual el nivel de expresión

difiere entre una persona que tiene un tumor y una persona que no tiene tumor. La disposición o filtro puede ser uno el cual esté comercialmente disponible, tal como aquellos provistos por IntelliGene (fabricado por Takara Bio). Alternativamente, el producto de ADNc o RT-PCR puede ser
5 inmovilizado utilizando un marcador comercialmente disponible tal como el formador de disposición GMS417 (fabricado por Takara Bio) para hacer una disposición o un filtro.

(ii) Preparación de una sonda y análisis

10 No un clon de ARNm específico sino todos los ARNm expresados son marcados y utilizados como una sonda marcada. Se puede utilizar ARNm crudo (no purificado) como un material de partida para preparar una sonda; sin embargo, de preferencia se utiliza poli (A)⁺ARN el cual ha sido purificado a través del método antes mencionado. Un método para preparar
15 una sonda marcada y un método para detectar y analizar la sonda utilizando diversos tipos de muestra inmovilizada, se describen adicionalmente de la siguiente manera.

i) Chip génico fabricado por Affymetrix

20 Se prepara una sonda de ARNc marcada con biotina de acuerdo con el protocolo (Affymetrix's Expression Analysis Technical Manual) provisto con el GeneChip fabricado por Affymetrix. Posteriormente, se realiza la hibridación y análisis para detectar y analizar la luz emitida de ácido adípico

utilizando un analizador Affymetrix (GeneChip Fluidics Station 400) de acuerdo con el protocolo (Expression Analysis Technical Manual) provisto con el GeneChip fabricado por Affymetrix.

5 ii) Disposición

Con el fin de detectar ADNc, se debe fijar una etiqueta al ADNc cuando se prepare a partir de poli (A)⁺ARN utilizando una reacción de transcriptasa inversa. Para obtener ADNc fluorescentemente marcado, se puede incluir d-UTP marcado con un colorante fluorescente tal como Cy3 o
10 Cy5 en la mezcla de reacción. Si ARN poli(A)⁺ derivado de una célula de melanoma y ARN poli (A)⁺ derivado de una célula utilizada como un control se marcan con colorantes diferentes, entonces se pueden utilizar simultáneamente ambos tipos de ARN poli (A)⁺ en una mezcla. Cuando se utiliza una disposición comercialmente disponible, por ejemplo, una
15 disposición fabricada por Takara Bio Co., Ltd, la hibridación y lavado se realizan de acuerdo con el protocolo provisto y posteriormente se detecta una señal fluorescente utilizando un detector de señal fluorescente (por ejemplo, el escáner de disposición GMS418 fabricado por Takara Bio Co., Ltd) y posteriormente se somete a análisis. La elección de disposición para uso
20 como se describe en la presente no está limitada a aquellas que están comercialmente disponibles. Se puede utilizar una disposición local y una disposición específicamente preparada de manera interna.

iii) Filtro de membrana

Al preparar ADNc de poli (A)⁺ARN mediante transcripción inversa, se puede preparar una sonda marcada añadiendo un radioisótopo (por ejemplo, d-CTP) a la reacción. La hibridación se realiza de acuerdo con métodos habituales. De manera más específica, la hibridación se puede realizar utilizando el sistema Atlas (fabricado por Clontech), que es una microdisposición formada utilizando un filtro comercialmente disponible, después de hibridación, se lava la microdisposición. Posteriormente, se realiza la detección y análisis utilizando un analizador (por ejemplo, Atlas Image
5
10 fabricado por Clontech).

En cualquiera de los métodos i) a iii), una sonda derivada de tejido humano se hibrida con las muestras inmovilizadas del mismo lote. La sonda que se utiliza puede ser cargada, pero las condiciones de hibridación utilizadas siguen siendo las mismas. Cuando se utilizan sondas fluorescentemente marcadas, si las sondas son marcadas con diferentes colorantes fluorescentes, entonces se pueden añadir simultáneamente sondas de diferentes tipos en forma de una mezcla e hibridar con las muestras inmovilizadas. Posteriormente, se puede leer simultáneamente la intensidad fluorescente (Brown, P.O. *et al.*, Nature Genet., (1999) 21, suplemento, p. 33-
15
20 37).

(b) Otros métodos de medición

Además de los métodos de medición antes mencionados, existen métodos de clonación por substracción (véase Experimental Medicine, Volumen Suplementario, New Genetic Engineering Handbook, publicado por Yodosha Co., Ltd. (1996, p32-35); métodos de despliegue diferencial (Basic Biochemical Experimental Method 4, nucleic acid/gene experiment, II. Applied series, Tokio Kagakudojin (2001), p125-128); y métodos que utilizan un gen reportero: cloranfenicol acetiltransferasa (tal como un vector pCAT3-Basic fabricado por Promega), β -galactosidasa (tal como un vector p β gal-Basic fabricado por Promega), fosfatasa alcalina secretada (tal como pSEAP2-Basic fabricada por Clontech); o proteína fluorescente verde (tal como pEGFP-1 fabricada por Clontech). Sin embargo, la elección del método de medición no está limitada a estos métodos.

Paso 4): Análisis de la diferencia en el nivel de expresión del gen entre la fracción de ARN total derivada de los pasos 1) y 2), medida en el paso 3) y detección de cáncer en un sujeto de prueba del paso 1)

Se analiza la diferencia en el nivel de expresión de oculospanina humana entre un espécimen derivado de una persona saludable y un espécimen derivado de un sujeto de prueba. Si un espécimen muestra un nivel de expresión significativamente alto de oculospanina humana, se determina que la posibilidad de tener cáncer, particularmente cáncer de piel, y especialmente melanoma, es alta, es decir, se puede detectar cáncer. El

término "nivel de expresión significativamente alto" se refiere al caso en el cual, cuando se realiza análisis utilizando GeneChip (fabricado por Affymetrix) y microdisposición Suite Ver. 3.0 (fabricado por Affymetrix), un valor de diferencia promedio de un gen derivado de una célula de melanoma es

5 significativamente alto en comparación con el de un melanocito normal.

Alternativamente, se mide el nivel de expresión de oculospanina humana, y posteriormente se evalúa para determinar si el valor de concentración medido cae o no dentro de una escala predeterminada para una persona saludable. Si el valor excede la escala, el sujeto tiene cáncer. El

10 diagnóstico de cáncer se puede realizar de esta manera. De otra forma, la correlación entre el nivel de expresión del gen de oculospanina humana y el grado de formación de cáncer en una persona saludable se investiga previamente, y posteriormente, se mide el nivel de expresión del gen de oculospanina humana de un espécimen tomado del sujeto de prueba.

15 También de esta manera se puede determinar si un sujeto de prueba es una persona saludable o no.

(3) Método para detectar cáncer utilizando el nivel de expresión de oculospanina humana (nivel de expresión de proteína)

20 De manera más específica, un método para detectar cáncer utilizando el nivel de expresión de oculospanina humana puede ser un método que incluye los pasos 1) a 3) siguientes.

1) medir el nivel de expresión de proteína de ocuspanina humana en un espécimen tomado de un sujeto;

2) medir el nivel de expresión de la misma proteína que se describió en el paso 1) en un espécimen tomado de una persona saludable;

5 3) analizar la diferencia entre el nivel de expresión de la proteína medida en los pasos 1) y 2) y detectar así que un sujeto tiene cáncer.

Los pasos individuales se describen con más detalle de la siguiente manera:

10 A) Medición del nivel de expresión de proteína de ocuspanina humana en un espécimen tomado de un sujeto.

(i) Preparación de una muestra a partir de un espécimen para medición de proteína

15 El espécimen es sometido a centrifugación de alta velocidad según sea necesario para remover sustancias insolubles, y posteriormente se prepara como una muestra para ELISA/RIA y Western Blot.

20 Para preparar una muestra para ELISA/RIA, el tejido de nodo linfático o piel tomado de un sujeto se utiliza directamente, o se diluye aproximadamente en una solución reguladora de pH antes de uso. Para Western blotting (electroforesis), se puede utilizar directamente una solución extraída de nodo linfático o piel como la muestra, o se diluye aproximadamente con una solución reguladora de pH, y se mezcla con una

solución reguladora de pH (fabricada por Sigma) que contiene 2-mercaptoetanol para electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida. Para dot o slot blotting, se puede utilizar una solución extraída de tejido de nodo linfático o piel no diluida o diluida aproximadamente en una solución reguladora de pH, las muestras son directamente adsorbidas a una membrana utilizando un dispositivo de blotting.

(b) Inmovilización de muestra

Una proteína en la muestra así obtenida puede ser específicamente detectada al precipitar la proteína utilizando un procedimiento tal como inmunoprecipitación o unión a ligando, ya sea sin inmovilización adicional o después de su inmovilización directa. Para inmovilizar una proteína, una membrana utilizada puede ser una tal como la que se utiliza en Western blotting, dot blotting o slot blotting. Ejemplos de dichas membranas incluyen membranas de nitrocelulosa (por ejemplo, fabricadas por BioRad), membranas de nylon tal como Hybond-ECL (fabricadas por Amersham Pharmacia), membranas de algodón tales como filtros absorbentes de blot (por ejemplo, fabricadas por BioRad) y membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (por ejemplo, fabricadas por BioRad).

Para detectar y cuantificar una proteína utilizando un método ELISA o RIA, una muestra o solución de muestra diluida (por ejemplo, diluida con solución salina regulada de fosfato (en lo sucesivo referida como "PBS") que contiene azida de sodio al 0.05%) se surte en una placa de 96 pozos, tal

como una Immunoplate, Maxisorp, (fabricada por Nunc) y se incuba sin agitación a una temperatura en la escala de 4°C a temperatura ambiente durante la noche, o a 37°C durante 1 a 3 horas, permitiendo así que la proteína adsorba la superficie de fondo de los pozos para inmovilizar la

5 proteína.

Se puede obtener el anticuerpo contra oculospanina humana utilizando un método habitual (véase, por ejemplo, New Biochemical Experimental Course 1, Protein 1, p. 389-397, 1992), que comprende inmunizar un animal con oculospanina humana o un polipéptido

10 arbitrariamente seleccionado de las secuencias de aminoácidos de oculospanina humana, tomando el anticuerpo producido en el cuerpo y purificándolo. De manera alternativa, se puede obtener un anticuerpo monoclonal de acuerdo con un método conocido en la técnica (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256, 495-497, 1975, Kennet, R. ed., Monoclonal

15 Antibody, p. 365-367, 1980, Prentice Hall, N.Y.), el cual comprende fusionar una célula productora de anticuerpos que produce un anticuerpo contra oculospanina humana con una célula de melanoma para formar una célula de hibridoma.

La proteína de oculospanina humana para uso como un antígeno

20 se puede obtener al introducir un gen de oculospanina humana en una célula hospedero mediante manipulación génica. Para explicarlo de manera más específica, la proteína de oculospanina humana se puede obtener al preparar un vector capaz de expresar el gen de oculospanina humana, introducir el

vector en la célula hospedero, expresar el gen, y purificar la proteína de oculospanina humana expresada.

(c) Medición del nivel de expresión de oculospanina humana

5 El nivel de expresión de oculospanina humana se puede representar por el nivel de expresión de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la Secuencia ID No. 2 del listado de secuencias.

10 El nivel de expresión se puede medir a través de un método conocido en la técnica, tal como un método de Western blotting o dot/slot blotting, utilizando anticuerpo de oculospanina antihumana.

b) Paso 2: Medición del nivel de expresión de la misma proteína como se describió en el paso 1 en un espécimen tomado de una persona
15 **saludable**

La medición del nivel de expresión de oculospanina humana en un espécimen de una persona saludable se puede realizar de la misma manera que se describió anteriormente en el paso 1).

c) Paso 3: Análisis de la diferencia entre el nivel de expresión de la proteína medida en los pasos 1) y 2) y detectar así que un sujeto tiene cáncer

Se analiza la diferencia en el nivel de expresión de oculospanina humana entre los especímenes de una persona saludable y un sujeto de prueba. Como resultado, si un espécimen muestra un nivel de expresión significativamente alto de oculospanina humana, se puede determinar que existe una alta probabilidad de que un sujeto tenga cáncer, particularmente cáncer de piel, y especialmente, melamona. De esta manera, se puede detectar cáncer.

De manera alternativa, el cáncer puede ser detectado al medir la concentración de oculospanina humana y analizar si el valor de concentración medida cae o no dentro de la escala predeterminada para una persona saludable. En este caso, si el valor de concentración de un sujeto es superior a la escala para una persona saludable, se determina que el sujeto tiene cáncer. Además, al investigar la correlación entre el nivel de expresión de oculospanina humana y el grado de formación de cáncer en una persona saludable, es posible determinar si un sujeto es o no saludable con base en el nivel de expresión de oculospanina humana en un espécimen tomado del sujeto.

3. Investigación del gen de oculospanina humana y oculospanina humana

El gen de oculospanina humana y oculospanina humana se expresan en un nivel significativamente alto en melanocitos en tejidos humanos normales, y se expresan en un nivel significativamente mayor en melanoma que en melanocitos normales.

En un método para examinar la función de oculospanina humana, primero se toma ADNc de longitud completa a partir de una genoteca de ADNc humano, derivado de células que expresan oculospanina humana, a través de un método conocido, tal como el método de hibridación de colonias. Posteriormente, el ADNc de longitud completa se introduce en una célula de humano o ratón, altamente expresado en la misma, y se realiza la evaluación para investigar si el ADNc afecta o no a la célula.

Para expresar el ADNc en un animal, se puede utilizar un método en el cual el ADNc de longitud completa obtenido se introduce en un vector de virus y el vector es administrado al animal. Ejemplos de transfección génica que utilizan un vector de virus incluyen métodos para introducir ADNc al integrarlo en un virus de ADN o un virus de ARN, tal como un retrovirus, adeno virus, virus adeno-asociado, virus del herpes, virus vaccinia, virus pox, o virus de polio. De éstos, se prefieren los métodos que utilizan retrovirus, adeno virus, virus adeno-asociado y virus vaccinia.

Ejemplos de transfección génica no viral incluyen administración de un plásmido de expresión directamente en el músculo (vacuna de ADN),

tratamiento con liposomas, lipofección, micro-inyección, tratamiento con fosfato de calcio, electroporación y similares. De estos, la vacuna de ADN y tratamiento con liposoma se prefieren.

Además, al transfectar el ADNc de longitud total en células
5 cultivadas, tal como células musculares, células del hígado, o células
adiposas derivadas de humano, ratón o rata; o en células del músculo
primarias, células del hígado, células adiposas o células de la piel, y expresar
el ADNc en el mismo a un alto nivel, es posible examinar las funciones de una
célula objetivo, más específicamente, la producción y consumo de azúcares y
10 lípidos, controlar el metabolismo glicolípido tal como acumulación de glicogen,
o para observar si existe cualquier efecto en la morfología de una célula. A la
inversa, al introducir en una célula un ácido nucleico anti-sentido al ARN total
de un gen a ser examinado, es posible examinar los efectos producidos en la
función y morfología de la célula objetivo.

15 Para introducir un ADNc de longitud total en un animal o célula,
el ADNc se integra en un vector que contiene secuencias promotoras
apropiadas y la transformación se lleva a cabo para transformar las células
hospedero con el vector. El promotor de expresión para utilizarse con una
célula de vertebrado puede tener un promotor que se ubica típicamente
20 corriente arriba del gen a ser expresado, un el sitio de empalme del ARN, un
sitio de poliadenilación, una secuencia de terminación de transcripción, etc.
Además, si es necesario, puede estar presente un punto de iniciación de
replicación. Ejemplos de dicho vector de expresión incluyen, pero no se limitan

99

a, pSV2dhf que tienen un promotor temprano de virus de simio 40 (SV40) (Subramani, S. *et al.*, Mol. Cell. Biol., (1981), 1, p854-864), vectores de retrovirus pLNCX, pLNSX, pLXIN, pSIR (fabricado por Clontech), y vector de cósmido pAxCw (fabricado por Takara Bio). Estos vectores de expresión

5 pueden integrarse en una célula de simio, tal como una célula COS (Gluzman, Y. Cell (1981), 23, p. 175-182, ATCC: CRL-1650), una cepa defectuosa de reductasa de ácido dihidrofolico (Urlab, G. y Chasin, L.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, p. 4126-4220) de una célula de ovario de hamster chino (CHO cell, ATCC:CCL-61), una célula 293 derivada de riñón embriónico de humano

10 de la (ATCC: CRL-1573) y similares, mediante métodos que incluyen un método de dietilaminoetil (DEAE)-dextrano (Lutham, H y Magnusson, G., Nucleic Acids Res. (1983), 11, p. 1295-1308), un método de co-precipitación de fosfato de calcio-ADN (Graham, F.L. y van der Eb, A. J. Virology (1973), 52, p. 456-457), y un método de electroporación (Neumann E. *et al.*, EMBO J. (1982), 1, p.841-845). Sin embargo, el método de integración y célula no se

15 limitan a aquéllos específicamente descritos. De esta manera, un transformante deseado puede obtenerse.

Además, utilizando manipulación génica en un animal saludable, un animal transgénico puede obtenerse el cual exprese altamente el gen

20 deseado. Esto puede utilizarse para examinar los efectos en morfología celular. Alternativamente, el estado de las células puede examinarse al preparar un animal con expresión bloqueada al expresar por bloqueo el gen objetivo que tiene melanoma.

4. Gen de oculospanina humana y/o equipo de detección de oculospanina humana.

El gen de oculospanina humana y/o oculospanina humana puede
5 detectarse utilizando un equipo que contiene por lo menos un componente
seleccionado del grupo que consiste en materiales 1) a 5) a continuación.

1) un iniciador de oligonucleótido que tiene una secuencia
continua de 15 a 30 bases en longitud para amplificar específicamente un
polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótido representada por la
10 secuencia ID No. 1 del listado de secuencia;

2) una sonda de polinucleótido que tiene una secuencia continua
de no menos de 15 nucleótidos capaces de hibridarse con un polinucleótido
que comprende la secuencia de nucleótido representada por la secuencia ID
No. 1 del listado de secuencia bajo condiciones estrictas, permitiendo así la
15 detección del polinucleótido;

3) un espécimen inmovilizado al cual un polinucleótido que
comprende la secuencia de nucleótido representada por la secuencia ID No. 1
del listado de secuencias es inmovilizado.

4) un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que
20 comprende la secuencia de aminoácido representada por la secuencia ID No.
2 del listado de secuencias, permitiendo así la detección de la proteína; y

5) un anticuerpo secundario capaz de unirse a un anticuerpo de
conformidad con la sección 4) anterior.

El iniciador de conformidad con la sección 1) anterior puede construirse fácilmente con base en la secuencia de nucleótidos del gen de oculospanina humana (la secuencia de nucleótidos representada por la secuencia ID No. 1 del listado de secuencias) mediante un método usual, por ejemplo, mediante un método utilizando el software de construcción de iniciador comercialmente disponible (por ejemplo, Wisconsin GCG package Version 10.2) y someterse a amplificación. Como un ejemplo de dicho iniciador, más específicamente, un iniciador para amplificar un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la secuencia ID No. 1 del listado de secuencias, uso puede hacerse de la combinación de un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la secuencia ID No. 5 del listado de secuencias y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la secuencia ID No. 6 del listado de secuencias. La sonda de conformidad con la sección 2) anterior es un polinucleótido capaz de hibridarse específicamente con oculospanina humana y siendo de 100 a 1500 bases en longitud, preferiblemente 300 a 600 bases en longitud. Estos iniciadores y sondas pueden marcarse con una etiqueta apropiada (tal como una etiqueta de enzima, etiqueta radioactiva, o etiqueta fluorescente) o puede tener un enlazador agregado a la misma.

El espécimen inmovilizado de conformidad con la sección 3) anterior puede prepararse al inmovilizar una sonda de conformidad con la sección 2) en una fase sólida tal como una placa de vidrio, una membrana de

nylon, o similar. Un método para preparar dicho espécimen inmovilizado se describe en la sección "2. El método para detectar cáncer", Párrafo "(1) Método para detectar cáncer utilizando el nivel de expresión del gen de oculospanina humana, Sub párrafo "(1) Método para utilizar un espécimen inmovilizado". Ejemplos de especímenes inmovilizados incluyen chips
5 génicos, disposiciones del ADNc, oligo-disposición, y filtros de membrana.

Un equipo de conformidad con la presente invención puede contener una ADN polimerasa termoestable, dNTPs (una mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y una solución reguladora de pH. Ejemplos de ADN
10 polimerasas termoestables incluyen, ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa LA Taq (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), ADN polimerasa Tth, y ADN polimerasa Pfu. El tipo de solución reguladora de pH puede seleccionarse de conformidad con la ADN polimerasa que debe utilizarse y Mg^{2+} puede agregarse según sea necesario.

15 Los anticuerpos de conformidad con las secciones 4) y 5) anteriores pueden prepararse mediante un método descrito en la sección "2. El método para detectar cáncer", Párrafo "(3) Método para detectar cáncer al utilizar el nivel de expresión de oculospanina humana (nivel de expresión de proteína)" o un método descrito en la sección "5. Preparación de anticuerpo de
20 oculospanina anti-humano". El anticuerpo puede marcarse con una etiqueta apropiada (tal como una etiqueta de enzima, etiqueta radioactiva, o etiqueta fluorescente).

Un equipo de conformidad con la presente puede utilizarse para detección de un gen de oculospanina humana y/o una proteína de oculospanina humana, determinando así la presencia o ausencia de cáncer y analizando una sustancia capaz de suprimir el crecimiento de cáncer.

5

5. Preparación de un anticuerpo de oculospanina anti-humano

(1) Preparación de antígeno

Un antígeno para preparar un anticuerpo de oculospanina anti-
10 humano puede ser un polipéptido que comprende una oculospanina humana, una secuencia de aminoácido parcial de la misma, que tiene una secuencia de aminoácido parcial o continua que comprende al menos 6 bases, o derivados de la misma que tienen una secuencia de aminoácido arbitraria o un portador agregado a las mismas.

15 La proteína de oculospanina humana puede purificarse directamente desde los tejidos de tumor de humano o células, sintetizada *in vitro*, o producida en células hospedero mediante manipulación génica. Más específicamente, al producir oculospanina humana mediante manipulación
génica, un gen de oculospanina humana se integra en un vector de expresión,
20 y de aquí en adelante la oculospanina humana se sintetiza en una solución que contiene enzimas, substratos y sustancias energéticas requeridas para su transcripción y traducción. Alternativamente, una célula hospedero procariótica o eucariótica puede transformarse con el vector de expresión y

- posteriormente puede aislarse la oculospanina humana. La secuencia de nucleótidos del ADNc de oculospanina humana se describe en: Graeme Wistow, Steven L. Bernstein, M. Keith Wyatt, Robert N. Fariss, Amita Behal, Jeffrey W. Touchman, Gerard Bouffard, Don Smith, y Katherine Peterson
- 5 (2002), análisis de marca de secuencia expresada de RPE/coroides de humano para el proyecto de NEI Bank: más de 6000 transcritos no redundantes, genes novedosos y variantes de empalme, visión molecular 8:205-220, y se registra en GenBank bajo el no. de sección NM_031945. El ORF del ADNc se muestra en la secuencia ID No.1 del listado de secuencias.
- 10 El ADNc de oculospanina humana puede obtenerse a partir de una genoteca de ADNc que expresa oculospanina humana al utilizar un iniciador para amplificar específicamente el ADNc de oculospanina humana de la genoteca de ADNc como una plantilla a través de una reacción en cadena de polimerasa (de aquí en adelante mencionada como "PCR", (véase, Saiki, R.
- 15 K., *et al.*, (1988), Science 239, 487-49) de aquí en adelante mencionado como un "método de PCR".

La síntesis *in vitro* para un polipéptido puede realizarse utilizando, por ejemplo, el sistema de traducción rápido (RTS) fabricado por Roche Diagnostics; sin embargo, los métodos de síntesis adecuados no se

20 limitan a este método particular. En el caso de RTS, el gen deseado se clona en un vector de expresión, bajo el control de un promotor de T7, y el vector de expresión se agrega a un sistema de reacción *in vitro*. Como consecuencia, se transcribe primero el ARNm desde el ADN de plantilla mediante ARN

polimerasa T7 y se realiza posteriormente la traducción mediante ribosomas en una solución que contiene un lisado de *Escherichia coli*. De esta manera, un polipéptido objetivo puede sintetizarse en la solución de reacción (Biochemica, 1, 20-23 (2001), Biochemica, 2, 28-29 (2001)).

- 5 Ejemplos hospederos procarióticos adecuados incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para transformar un gen deseado en estas células hospedero, las células hospedero se transforman con un vector plásmido derivado de especies compatibles con el hospedero, y que contienen un replicón, es decir, un punto de iniciación de replicación, y una secuencia
- 10 regulatoria. Además, se prefiere que el vector tenga una secuencia capaz de impartir un fenotipo seleccionable para la célula a ser transformada.

Como una célula hospedero, una cepa de *Escherichia coli*, por ejemplo, una cepa K12 puede utilizarse y plásmidos de la serie pBR322 y pUC pueden utilizarse generalmente como vectores. Sin embargo, la elección de la

15 célula hospedero y vector no se limita a la misma y cualquier cepa conocida adecuada y vector pueden utilizarse.

Los promotores adecuados para utilizarse en *Escherichia coli*, incluyen el promotor de triptofano (*trp*), promotor de lactosa (*lac*), promotor de triptofan lactosa de (*tac*), promotor de lipoproteína (*lpp*), y promotor de

20 Tu(*tufB*) de factor de extensión de cadena de polipéptido y similares. Cualquiera de estos promotores puede utilizarse para producir el polipéptido deseado.

Como una célula hospedero, una cepa *Bacillus subtilis* puede utilizarse, por ejemplo, la cepa 207-25 se prefiere. El vector pTUB 228 (Ohmura, K. *et al.*, (1984), J. Biochem. 95, 87-93) puede utilizarse; sin embargo, la elección del hospedero *Bacillus subtilis* y vector no se limita a esta combinación particular. Al enlazar una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de péptido de señal para α -amilasa *Bacillus subtilis*, la proteína de interés puede expresarse y secretarse desde la célula.

Ejemplos de células hospedero eucarióticas incluyen células de vertebrados, insectos y levadura. Ejemplos de células de vertebrados incluyen, pero no se limitan a, una célula de simio, célula COS (Gluzman, Y. (1981), Cell 23, 175-182, (ATCC CRL-1650)), célula de fibroblasto de ratón NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), y una cepa defectuosa de reductasa de ácido dihidrofólico (Urlaub, G. y Chasin, L. A. (1980), Proc., Natl. Acad. Sci, USA 77, 4126-4220) de célula de ovario de hamster chino (CHO cell, (ATCC CCL-61)).

Un promotor de expresión para utilizarse con una célula de vertebrado, puede ser uno que tiene un promotor ubicado corriente arriba del gen a ser expresado, un sitio de empalme de ARN, un sitio de poliadenilación, y una secuencia de terminación de transcripción. Además, un sitio de iniciación de replicación puede estar presente. Ejemplos de los vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a, pCDNA3.1 (fabricado por Invitrogen) que tiene un promotor precoz de un citomegalo virus y PSV2dhfr (Subramani, S. *et al.*, (1981), Mol. Cell. Biol.. 1, 854-864) con un promotor precoz SV40.

Cuando se utiliza una célula COS o una célula NIH3T3 como la célula hospedero, vectores de expresión adecuados con un sitio de iniciación de replicación SV40, capaces de auto-proliferación en la célula COS o la célula NIH3T3 y adicionalmente pueden tener un promotor de transcripción, 5 señal de terminación de transcripción, y sitio de empalme de ARN. El vector de expresión puede integrarse en la célula COS o la célula NIH3T3 mediante tratamiento de DEAE-dextrano (Luthman, H y Magnusson, G. (1983), *Nucleic Acids Res.* 11, p. 1295-1308), co-precipitación de fosfato de calcio-ADN (Graham, F. L. y van der. Eb, A. J. (1973), *Virology*, 52, p.456-457), 10 electroporación (Neumann, E, et al., (1982), *EMBO J.* 1, p.841-845) u otros. De esta manera, una célula transformante deseada puede obtenerse. Además, cuando se utiliza una célula CHO como una célula hospedero, si un vector es capaz de expresar un funcionamiento neo génico como un marcador de resistencia a G418 antibiótico, tal como pRSVneo (Sambrook, J, et al., 15 (1989): *Molecular Cloning A Laboratory Manual* "Cold Spring Harbor, Laboratory, NY) o PSV2neo (Southern, P.J., y Berg, P. (1982), *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341) se co-transfecta con el vector de expresión, y posteriormente se selecciona una colonia resistente a G418, una célula transformada que produce establemente el polipéptido deseado también 20 puede obtenerse.

El transformante obtenido en la manera mencionada anteriormente puede cultivarse de conformidad con un método usual para obtener el polipéptido deseado expresado dentro de la célula o secretado

fuera de la célula y de este modo presente en el medio de cultivo. Como un medio de cultivo, varios tipos de medios utilizados usualmente pueden seleccionarse de manera apropiada dependiendo del tipo de célula hospedero empleada. Más específicamente, para las células COS, el medio RPMI 1640 o el medio Eagle modificado por Dulbecco (de aquí en adelante mencionado como "DMEM") puede utilizarse. Si es necesario, componentes de suero tales como suero de ternera fetal puede agregarse al medio.

Una proteína recombinante producida dentro de una célula o secreta fuera de una célula transformante y presente en el medio de cultivo puede separarse y purificarse mediante varios métodos de separación conocidos en base a las propiedades físicas y propiedades químicas de la proteína. Ejemplos de dichos métodos de separación incluyen tratamiento con un agente de precipitación de proteína general, ultrafiltración, cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de absorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por afinidad, varios tipos de métodos cromatográficos líquidos tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), diálisis y combinaciones de estos métodos. Si una marca hexa-his se fusiona a la proteína de recombinación que se expresa, la proteína recombinante puede purificarse eficazmente mediante una columna de afinidad de níquel. Si los métodos antes mencionados se utilizan en combinación, una gran cantidad de polipéptido deseado puede obtenerse con una alta pureza y un alto rendimiento.

P
109

(2) Producción de anticuerpo monoclonal de oculospanina anti-
humano

Un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a la oculospanina humana, es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a oculospanina humana. Un método adecuado para obtener dicho anticuerpo monoclonal es el siguiente:

Para producir el anticuerpo monoclonal, los pasos necesarios requeridos incluyen:

(a) purificar la biomacromolécula que debe utilizarse como un antígeno;

(b) inmunizar un animal al inyectar el antígeno en el animal, tomando una muestra de sangre y verificando el título del anticuerpo para determinar el tiempo al cual debe extirparse el bazo y preparar las células que producen el anticuerpo;

(c) preparar las células de mieloma de hueso (de aquí en adelante mencionada como "mieloma");

(d) fusionar las células que producen el anticuerpo y el mieloma;

(e) seleccionar hibridomas que producen un anticuerpo deseado;

(f) segregar (clonar) a las mismas en clones de células individuales;

(g) opcionalmente, cultivar el hibridoma para producir una gran cantidad de anticuerpo monoclonal o criar un animal con el hibridoma transplantado en el mismo; y

(h) analizar la actividad fisiológica y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal así producido, o características del anticuerpo monoclonal como un agente de etiquetado.

El método para producir un anticuerpo monoclonal se describe con mayor detalle a continuación de conformidad con los pasos mencionados anteriormente. Sin embargo, los métodos para producir anticuerpo monoclonal no se limitan al método descrito. Por ejemplo, una célula productora de anticuerpos diferente a una célula de bazo y mieloma.

10 (a) Purificación del antígeno.

Como el antígeno, la proteína de oculospanina humana preparada de conformidad con el método antes mencionado o una parte (fragmento) del mismo puede utilizarse. Alternativamente, el antígeno utilizado puede ser una fracción de membrana preparada a partir de una célula recombinante que expresa oculospanina de humano o una célula recombinante que expresa oculospanina humana o un fragmento de péptido químicamente sintetizado de una proteína de conformidad con la presente invención obtenida mediante un método conocido por los expertos en la técnica.

20

(b) Preparación de una célula productora de anticuerpo.

Un antígeno obtenido en el paso (a) se mezcla con el adyuvante completo o incompleto de Freund o un agente auxiliar tal como sulfato

potasio aluminio. La mezcla se utiliza como un inmunogen y se inyecta en un animal. Un animal experimental adecuado puede ser un animal conocido por ser adecuado para utilizarse en un método de preparación de hibridoma. Ejemplos específicos de dichos animales incluyen ratones, ratas, cabras, cameros, vacas, y caballos. Sin embargo, en vista de la disponibilidad de las células de mieloma que deben fusionarse con las células que producen anticuerpos tomadas del animal, ratones o ratas, se prefieren como animales a ser inmunizados. La elección de las cepas de ratones o ratas utilizados en la práctica no se limita en particular. Ejemplos de cepas de ratón adecuadas incluyen A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BR, C57L, DBA, FL HTH, HTI, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, y 129. Ejemplos de cepas de rata incluyen Low, Lewis, Sprague, Daweley, ACI, BN, y Fischer. Estos ratones y ratas se encuentran disponibles de distribuidores de cría de animales experimentales tales como Clea Japan Inc., Charles River Japan Inc., Japan SLC Inc., y The Jackson Laboratories. En vista de la compatibilidad de fusión con células de mieloma como se discute anteriormente, "BALB/c" con una línea de ratón y "Low" como una línea de rata se prefieren particularmente como el animal inmunizado. En consideración a la homología de un antígeno entre un humano y un ratón, un ratón con una función biológica reducida para remover un autoanticuerpo, en otras palabras, un ratón que sufre de una enfermedad autoinmune se utiliza preferiblemente. Nótese que un ratón o una rata que debe inmunizarse

preferiblemente tiene que tener de 5 a 12 semanas de edad, más preferiblemente 6 a 8 semanas de edad.

Un animal puede inmunizarse con oculospanina humana o una versión recombinantemente producida del mismo mediante métodos conocidos, tales como los métodos específicamente descritos en, por ejemplo, Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield Illinois (1964), etc. De estos métodos de inmunización, un método preferiblemente utilizado en la presente invención, es, por ejemplo, realizado de la siguiente manera. En primer lugar, un antígeno, es decir, una fracción de proteína de membrana, o una célula que expresa un antígeno, se inyecta en un animal intradérmicamente o intraperitonealmente. Para mejorar la eficacia de inmunización, ambos métodos de inyección se utilizan juntos. Más específicamente, cuando la inyección intradérmica se realiza en la primera mitad de las inyecciones y la inyección intraperitoneal se realiza en la segunda mitad de las inyecciones o únicamente en el último momento, la eficacia de inmunización puede incrementarse particularmente. El régimen de dosificación del antígeno difiere dependiendo del tipo y diferencias individuales, etc., del cuerpo del animal a ser inmunizado. Sin embargo, el antígeno preferiblemente se inyecta de 3 a 6 veces en intervalos de 2 a 6 semanas, y más preferiblemente 3 a 4 en intervalos de 2 a 4 semanas. Se prefiere no incrementar excesivamente el número de dosificaciones, ya que entonces el

antígeno puede desperdiciarse. También, se prefiere no extender demasiado la longitud del intervalo de dosificación, ya que la actividad de las células disminuye debido a la edad del animal. La dosis del antígeno difiere dependiendo del tipo y diferencias individuales, etc., del cuerpo del animal; sin embargo, la dosis generalmente cae dentro de la escala de alrededor de 0.05 a 5 ml, preferiblemente de alrededor de 0.1 a 0.5 ml. La inmunización de refuerzo se realiza 1 a 6 semanas después de que se administra el antígeno, preferiblemente después de 2 a 4 semanas, más preferiblemente después de 2 a 3 semanas. Si se realiza la inmunización de refuerzo después de más 6 semanas o en una semana, la inmunización de refuerzo será menos efectiva. Nótese que la dosis del antígeno a inyectarse como un refuerzo difiere dependiendo del tipo y tamaño del cuerpo del animal; sin embargo, por ejemplo, para ratones, generalmente cae dentro de la escala de alrededor de 0.05 a 5 ml, preferiblemente alrededor de 0.1 a 0.5 ml, y más preferiblemente alrededor de 0.1 a 0.2 ml. Se prefiere no administrar una cantidad innecesariamente grande de antígeno ya que posteriormente el efecto de inmunización disminuye y no es favorable para el animal a ser inmunizado.

Uno a 10 días, preferiblemente 2 a 5 días, más preferiblemente 2 a 3 días después de la inmunización de refuerzo, las células del bazo o linfocitos que contienen las células que producen anticuerpos se remueven del animal inmunizado bajo condiciones asépticas. En este momento, se determina un título del anticuerpo. Si un animal que tiene un título de anticuerpo suficientemente elevado se utiliza como la fuente de suministro

para las células que producen el anticuerpo, la eficacia de las siguientes operaciones puede mejorarse. Como un método para determinar el título del anticuerpo a utilizarse en la presente, varios tipos de tecnologías conocidas son apropiadas, tales como los métodos de RIA, métodos de ELISA, métodos de anticuerpos fluorescentes y métodos de reacción de aglutinación de células de la sangre pasiva. En vista de la sensibilidad de detección, velocidad, exactitud, y la posibilidad de operación automática, los métodos de RIA y los métodos de ELISA se prefieren.

La determinación de un título de anticuerpo de conformidad con la presente invención puede realizarse mediante un método de ELISA de la siguiente de manera. En primer lugar, el antígeno purificado parcialmente o purificado se adsorbe en una superficie sólida tal como una placa de 96 pozos, para ELISA. Posteriormente, la superficie sólida que no tiene antígeno adsorbido en la misma se cubre con una proteína no relacionada con el antígeno, tal como albúmina de suero de bovino (de aquí en adelante mencionada como "BSA"). Después de lavar la superficie, la superficie se lleva en contacto con la muestra diluida en serie (por ejemplo, suero de ratón) que sirve como un anticuerpo primario, permitiendo así a un anticuerpo monoclonal contenido en la muestra unirse al antígeno. Además, un anticuerpo secundario, es decir, un anticuerpo marcado con enzima contra un anticuerpo de ratón, se agrega para unirse al anticuerpo de ratón. Después de lavar el complejo resultante, un substrato para la enzima se agrega y el

cambio en absorbancia, que ocurre debido a un cambio de color inducido por degradación del sustrato, se mide para calcular el título del antígeno.

Las células productoras de anticuerpo se separan de las células del bazo y linfocitos de conformidad con métodos conocidos (por ejemplo, descritos en Kohler *et al.*, Nature, 256, 495, 1975; Kohler *et al.*, Eur J. Immunol., 6, 511, 1977; Milstein *et al.*, Nature, 266, 550, 1977; Walsh, Nature, 266, 495, 1977). Más específicamente, en el caso de células del bazo, las células productoras de anticuerpo pueden separarse mediante un método general que comprende homogeneizar tejido, filtrar el homogeneizado, a través de una malla de acero inoxidable, y suspender las células obtenidas en el medio esencial mínimo de Eagle (MEM).

(c) Preparación de células de mieloma de hueso (de aquí en adelante mencionada como "mieloma")

La elección de células de mieloma que se utilizan para fusión celular no se limita particularmente y las células adecuadas pueden seleccionarse a partir de cepas celulares. Para conveniencia cuando el hibridoma se selecciona de células fusionadas, se prefiere utilizar una cepa defectuosa de HGPRT (hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido. Mas específicamente, ejemplos de cepas defectuosas de HGPRT incluyen X63-Ag8(X63), NSI-Ag4/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), P2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), F0, SI49/5XXO y BU.1 derivadas de ratones,

210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3) derivadas de rata; y U266AR(SKO-007), GM1500 GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2), y 8226AR/NIP4-1(NP41) derivadas de humanos. Estas cepas defectuosas de HGPRT se encuentran disponibles de American Type Culture Collection (ATCC), etc.

5 Estas cepas se subcultivan en un medio apropiado tal como un medio 8-azaguanina [RPMI-1640 complementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, y suero de ternera fetal (de aquí en adelante mencionado como "FCS") y 8-azaguanina adicional se agrega al mismo]; medio Dulbecco modificado por Iscover (de aquí en adelante mencionado como "IMDM"), o medio Eagle modificado por Dulbecco (de aquí en adelante mencionado como "DMEM"). En esta caso, de 3 a 4 días antes de realizar la operación de fusión celular, la células se transfieren a un medio regular [por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co. Inc.) que contiene 10% de FCS] y se subcultiva en el mismo para obtener no menos de 2×10^7 de células por medio del día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

La fusión entre las células que producen anticuerpos y las células de mieloma se realiza apropiadamente de conformidad con métodos conocidos (incluyendo: Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A., y Mayer, M.M. Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964)), bajo condiciones de manera que la velocidad de

supervivencia de células no se reduzca excesivamente. Ejemplos de dichos métodos incluyen métodos químicos en donde las células productoras de anticuerpo y células de mieloma se mezclan en una solución de polímero de alta concentración, por ejemplo, polietilenglicol; y métodos físicos utilizando estimulación eléctrica. De estos métodos, el método químico se explica más específicamente de la siguiente manera. Cuando el polietilenglicol se utiliza como la solución de polímero de alta concentración, las células productoras de anticuerpo y células de mieloma se mezclan en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1500 a 6000, más preferiblemente 2000 a 4000, a una temperatura de 30 a 40°C, preferiblemente de 35 a 38°C, durante 1 a 10 minutos, más preferiblemente de 5 a 8 minutos.

(e) Selección de poblaciones de hibridoma

El método para seleccionar el hibridoma obtenido mediante fusión celular no se restringe particularmente. Generalmente, se hace uso de un método de selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) [Kohler *et al.*, Nature, 256, 495 (1975); Milstein *et al.*, Nature 266,550 (1977)]. Este es un método efectivo cuando se obtiene el hibridoma utilizando células de mieloma de una cepa defectuosa de HGPRT incapaz de sobrevivir en presencia de aminopterina. Mas específicamente, al cultivar células no fusionadas e hibridoma en el medio de HAT, únicamente el hibridoma que

tiene la resistencia a la aminopterina se selecciona y se le permite permanecer y proliferar.

(f) Segregación a un solo clon celular (Clonación)

5 Como un método de clonación para hibridoma, los métodos conocidos tales como método de metilcelulosa, método de agarosa suave, o método de dilución de limitación puede utilizarse [véase, por ejemplo, Barbara, B.M. y Stanley, M.S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1980)]. Ejemplos de un método de

10 clonación incluyen un método de dilución de limitación en donde las células hibridoma se diluyen para contener una sola célula hibridoma por pozo de una placa y cultivarse; un método de agarosa suave en donde las células hibridoma se cultivan en un medio de agarosa suave y las colonias se recuperan; un método para tomar células hibridoma individuales por medio de

15 un micromanipulador y cultivarlas; y un "método de clasificación de clones" así llamado en donde las células hibridoma se separan una por una por medio de un clasificador celular. De estos métodos, el método de dilución de limitación se prefiere. En este método, la cepa de célula fibroblasto derivada de feto de rata o células alimentadoras tales como células del bazo de ratón saludable,

20 células de la glándula del timo, o las células ascito se siembran. Las células hibridoma se diluyen en un medio para proporcionar una proporción de dilución de 0.2 a 0.5 células por 0.2 ml. La solución de suspensión de hibridoma diluida se transfiere en pozos para proporcionar 0.1ml por pozo y se



cultivan continuamente durante aproximadamente 2 semanas con cambios del alrededor de 1/3 del medio con medio fresco en intervalos predeterminados (por ejemplo, cada 3 días). De esta manera, pueden proliferarse los clones de hibridoma.

5 Las células hibridoma en el pozo para los cuales el título del anticuerpo se ha confirmado se someten a clonación de repetición mediante el método de dilución de limitación, 2 a 4 veces. Las células hibridoma, con un título de anticuerpo que se confirma para ser estables, se seleccionan como un anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumano que produce las cepas

10 de hibridoma. Una de las cepas de hibridoma clonadas así obtenidas se designa como "O3B8-2C9-4F3" y esto se ha depositado en el International Patent Organism Depositary de the National Institute of Advanced Industrial Science Technology (localizado al Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) el 17 de febrero de 2004 bajo la deposición No. FERM BP-

15 08627.

(g) Preparación de anticuerpo monoclonal para cultivar células hibridoma.

Las células hibridoma así seleccionadas se cultivan para obtener

20 de manera eficaz anticuerpos monoclonales. Sin embargo, antes de cultivar, se desea que una célula hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal deseado se analice. La clasificación se realiza mediante un método conocido.

La determinación del título del anticuerpo puede realizarse en la presente invención mediante, por ejemplo, un método de ELISA de conformidad con el siguiente procedimiento.

En primer lugar, la oculospanina o células de humano
5 parcialmente purificadas o purificadas que expresan la oculospanina humana se adsorben en una superficie sólida de una placa de 96 pozos para ELISA. Posteriormente, la superficie sólida que no tiene antígeno adsorbido en la misma se cubre con una proteína no relacionada con el antígeno, por ejemplo, albúmina de suero de bovino (de aquí en adelante mencionada como "BSA").
10 Después de lavar la superficie, la superficie se lleva en contacto con una muestra diluida en serie (por ejemplo, suero de ratón) como un primer anticuerpo, permitiendo así la unión de un anticuerpo de oculospanina de anti-humano en la muestra para el antígeno. Además, un anticuerpo contra el anticuerpo de ratón y marcado con una enzima, que sirve como un anticuerpo
15 secundario, se agrega para unir el anticuerpo de ratón. Después de lavar el complejo resultante, un substrato para la enzima se agrega y el cambio de absorbancia, que ocurre debido al cambio de color inducido por la degradación del substrato, se determina para calcular el título del anticuerpo. De esta manera, el título del anticuerpo se calcula. Nótese que dicha
20 operación de clasificación puede realizarse después o antes de la clonación de la célula híbrida según se mencionó anteriormente.

Un hibridoma obtenido mediante el método antes mencionado puede almacenarse en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un refrigerador a 80°C o menos.

Después de terminar la clonación, el hibridoma se transfiere de un medio HT a un medio general y se cultiva. Se realiza el cultivo a gran escala mediante cultivo de rotación utilizando una botella de cultivo grande o mediante cultivo revolvedor. El sobrenadante obtenido del cultivo a gran escala se purifica mediante un método conocido para los expertos en la técnica, tal como filtración por gel, para obtener un anticuerpo monotonal que se une específicamente a una proteína de acuerdo con la presente invención. El hibridoma pueda inyectarse en la cavidad abdominal de un ratón de la misma línea como el hibridoma (por ejemplo, BALB/c) o un ratón Nu/Nu para proliferar el hibridoma. De esta manera, el fluido de ascito que contiene una gran cantidad de anticuerpo monoclonal de conformidad con la presente invención puede obtenerse. Cuando se inyectan las células hibridoma en la cavidad abdominal, si un aceite mineral, tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristina) (3 a 7 días antes) se ha administrado previamente, el fluido de ascito puede obtenerse en una gran cantidad. Para explicar más específicamente, un agente inmunosupresor se inyecta previamente en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma. Veinte días después de la inactivación de las células T, 10^6 a 10^7 de células de clon hibridoma se suspenden en un medio libre de suero (0.5 ml) y la suspensión se inyecta en la cavidad abdominal. Cuando el abdomen se expande y se

a) método de precipitación de sulfato de amonio-método cromatográfico de intercambio iónico-método de filtración de gel; (b) método de precipitación de sulfato de amonio-método cromatográfico de intercambio iónico-método cromatográfico por afinidad; y (c) método de precipitación de sulfato de amonio-método de filtración de gel-método cromatográfico por afinidad, etc. De estas combinaciones, para obtener el anticuerpo monoclonal con alta pureza en un alto rendimiento, la combinación de c) se prefiere en particular.

Como un método de purificación simple, un equipo de purificación de anticuerpo comercialmente disponible (por ejemplo, un equipo MAbTrap GII fabricado por Pharmacia) y los similares pueden utilizarse.

El anticuerpo monoclonal así obtenido tiene una especificidad de antígeno elevada para oculospanina humana.

15 (h) Análisis de anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal así obtenido se verifica para isotipo y subclase del mismo de la siguiente manera. Los métodos de identificación adecuados incluyen el método de Ouchterlony, métodos de ELISA y métodos de RIA. El método de Ouchterlony es simple; aunque, si el anticuerpo monoclonal se obtiene a una baja concentración debe concentrarse. Alternativamente, cuando un método de ELISA o un método de RIA se utiliza, el sobrenadante de cultivo puede hacerse reaccionar directamente con una fase sólida de absorción de antígeno. Además, si varios tipos de anticuerpos

que corresponden a los isotipos de inmunoglobulina y subclases se utilizan como anticuerpos secundarios, el isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal puede identificarse. Como un método simple adicional, un equipo de identificación comercialmente disponible (por ejemplo, un equipo Mouse
5 Typer fabricado por BioRad) y similar puede utilizarse.

La cuantificación de una proteína puede realizarse mediante el ensayo de Folin Lowry basada en la absorción de 280 nm [1.4 (OD280) = inmunoglobulina 1 mg/ml].

10 (3) Preparación de anticuerpo de oculospanina anti-humano humanizada

La inmunoglobulina G (de aquí en adelante simplemente mencionada como "IgG") consiste en dos cadenas de polipéptido ligeras (de aquí en adelante mencionadas como "cadenas ligeras") cada una con un peso
15 molecular de alrededor de 23,000 y dos cadenas pesadas (de aquí en adelante mencionadas como "cadenas pesadas") cada una con un peso molecular de alrededor de 50,000. Cada una de las cadenas pesadas y cadenas ligeras tiene una estructura de repetición, en donde la secuencia de aminoácido formada de aproximadamente 110 residuos se conserva, esto
20 constituye una unidad básica (de aquí en adelante mencionada como un "dominio") de la estructura tridimensional de IgG. La cadena pesada y la cadena ligera constituyen 4 y 2 dominios continuos independientes, respectivamente. Tanto en la cadena pesada como en la cadena ligera, la

llena con el fluido de ascito, el fluido de ascito se toma. En virtud de este método, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse a una concentración de 100 veces superior a la del medio del cultivo.

Un anticuerpo monoclonal obtenido en el método antes
5 mencionado puede purificarse mediante los métodos descritos en, por ejemplo, Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978). Para explicar más específicamente, los ejemplos de dichos métodos incluyen métodos de precipitación de sulfato de amonio, métodos de gel-filtración, métodos
10 cromatográficos de intercambio iónico, y métodos cromatográficos por afinidad. De estos, el método de precipitación de sulfato de amonio, si se repite 3 a 4 veces, preferiblemente 3 a 6 veces, purifica exitosamente el anticuerpo monoclonal. Sin embargo, en este método, la producción del anticuerpo monoclonal purificado es extremadamente bajo. Por lo tanto, el
15 anticuerpo monoclonal se purifica de manera cruda al realizar el método de precipitación de sulfato de amonio una o dos veces y posteriormente se somete a por lo menos un método, y preferiblemente dos métodos, seleccionados de la filtración por gel, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía por afinidad y similares. De esta manera, el anticuerpo
20 monoclonal altamente purificado puede obtenerse en un alto rendimiento. El método de precipitación de sulfato de amonio puede realizarse en la siguiente combinación y en el siguiente orden:

variación en el dominio amino terminal entre diferentes anticuerpos es mayor a la variación en los otros dominios. Este dominio se llama un dominio variable (de aquí en adelante mencionado como un "dominio V"). En la amino terminal de IgG, los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera se relacionan complementariamente para formar una región variable. En contraste, los dominios restantes constituyen un dominio constante. El dominio constante tiene una secuencia intrínseca para cada especie animal. Por ejemplo, la región constante de IgG de ratón difiere de la IgG de humano. Por lo tanto, una IgG de ratón se reconoce como una sustancia extraña por el sistema inmunológico humano. Como resultado, una respuesta anticuerpo anti-ratón de humano (de aquí en adelante mencionada como "HAMA") se cria (véase, Schroff *et al.*, Cancer res., 45, 879-85 (1985). Debido a esto, el anticuerpo de ratón no puede administrarse repetidamente a un sujeto humano. Para administrar dicho anticuerpo a un humano, es necesario modificar las moléculas del anticuerpo para que no provoquen la respuesta de HAMA mientras mantienen la especificidad del anticuerpo.

De acuerdo con los resultados de cristalografía de rayos X, un dominio tiene una estructura cilíndrica longitudinal en donde dos capas de hojas β antiparalelas cada una formada de 3 a 5 cadenas β se superponen. En la región variable, tres bucles se reúnen para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los bucles se menciona como una región determinante de complementariedad (de aquí en adelante mencionada como "CDR"), en donde

la variación en la secuencia de aminoácido es más importante. Las porciones diferentes a CDR de la región variable generalmente juegan un papel para soportar la estructura de CDR, y se llaman "estructuras" Kabat *et al.* recolectó numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Con base en el grado de conservación de las secuencias, se clasifican en secuencias primarias individuales en CDR y la estructura, y se elaboran de una lista de los mismos (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat *et al.*). Además, las estructuras se clasifican en una pluralidad de subgrupos con base en características comunes de las secuencias de aminoácido. Además, se ha encontrado que existe una estructura correspondiente entre un humano y un ratón.

De los estudios de las características estructurales de IgG, un método para preparar un anticuerpo humanizado se ha concebido como se describe a continuación.

Inicialmente, un anticuerpo quimérico se propuso en donde la región variable de un anticuerpo derivado de un ratón se conecta a una región constante derivada de un humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984)). Sin embargo, dicho anticuerpo quimérico aún contiene muchos residuos aminoácidos de no humano. Por lo tanto, cuando el anticuerpo quimérico se administra durante un largo periodo, una respuesta de HAMA puede inducirse posiblemente (véase Begent *et al.*, Br. J. Cancer, 62, 487, (1990)).

Como un método para reducir además los residuos de aminoácido derivados de una fuente de mamífero no humano, que posiblemente provoca una respuesta de HAMA en humanos, un método para integrar únicamente la porción de CDR en un anticuerpo derivado de humano se propuso (véase Nature, 321, 522-525, (1986)). Sin embargo, para mantener la actividad de inmunoglobulina contra un antígeno, el transplante de CDR solo fue generalmente insuficiente.

Chothia *et al.*, encontró lo siguiente con base en los datos obtenidos mediante cristalografía de rayos X en 1987:

- 10 (i) en la secuencia de aminoácido de CDR, existe un sitio que se une directamente a un antígeno y un sitio responsable de mantener la estructura de CDR por sí mismo, y las estructuras tridimensionales de CDR que pueden adoptarse se clasifican en una pluralidad de patrones típicos (estructuras canónicas); y
- 15 (ii) las clases de estructuras canónicas se determinan no solamente por la CDR, si no también por el tipo de aminoácido presente en un sitio específico de la porción de marco (véase J. Mol. Biol., 196, 901-917, (1987)).

Basándose en estos hallazgos, se sugiere que cuando el método de transplante de CDR se empleó, los residuos de aminoácido de una parte del marco se deben transplantar en un anticuerpo de humano además de la secuencia de la CDR (véase la publicación Nacional Japonesa de la Solicitud de Patente Internacional No. 4-502408).

Generalmente, un anticuerpo derivado de mamífero no humano del cual la CDR será transplantada se define como un "donador", mientras que el anticuerpo de humano dentro del cual la CDR será transplantada se define como un "aceptor". La presente invención sigue estas definiciones.

5 Un punto que debe ser considerado para llevar a cabo el transplante de la CDR es que la actividad de la molécula de inmunoglobulina se mantiene al conservar la estructura de la CDR tanto como sea posible. Para lograr esto, se debe poner atención a los siguientes dos puntos:

10 (i) el subgrupo de anticuerpos de los cuales se selecciona el aceptor; y

 (ii) que residuo de aminoácidos se selecciona del marco del donador.

 Queen *et al.* propone un método de diseño para el transplante de un residuo de aminoácido en un aceptor junto con la secuencia de la CDR
15 cuando el residuo de aminoácido del marco del donador corresponde a por lo menos una de las siguientes referencias (véase Publicación Nacional Japonesa de Solicitud de Patente Internacional No. 4-502408).

 (a) el aminoácido raramente está presente en la posición dentro del marco de un aceptor, mientras que el aminoácido correspondiente de un
20 donador normalmente está presente en la posición equivalente;

 (b) el aminoácido está presente cerca de una de las CDR; y

 (c) se predice que el aminoácido tiene un átomo de cadena lateral dentro de cerca de 3 angstroms desde la CDR en su modelo de

inmunoglobulina tridimensional y que el átomo principal lateral puede interactuar con un antígeno o la CDR de un anticuerpo humanizado.

El ADN que codifica para una cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo monoclonal de oculospanina humana de la presente invención se puede obtener al preparar ARNm de una célula hibridoma que produce el anticuerpo nomoclonal de oculospanina antihumana, convirtiendo el ARNm en ADNc usando transcriptasa inversa, y aislando cada ADN que codifica para la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo.

En la extracción del ARNm, el método tiocianato de guanidina-fenol caliente, y el método tiocianato de guanidina-clorhidrato de guanidina se pueden emplear; sin embargo, el método tiocianato de guanidina-cloruro de cesio también es adecuado. La preparación de ARNm de un célula se realiza primero preparando el ARN total y purificando el ARNm usando un portador de purificación del ARN poli(a)⁺ tal como perlas de oligo (dT)-celulosa u oligo (dT)-látex o directamente purificando el ARNm de un lisado celular a través del uso del portador. Para la preparación de ARN total, se puede hacer uso del método de centrifugación de densidad-gradiente de sacarosa [véase Dougherty, W. G. y Hiebert, E. (1980) Virology 101, 466-474], el método tiocianato de guanidina-fenol, el método tiocianato de guadinina-trifluoro de cesio, y el método SDS fenol y similares; sin embargo el método que usa tiocianato de guanidina y cloururo de cesio también es adecuado [véase Chirgwin, J. M., *et al.* (1979) Biochemistry 18, 5294-5299].

Después de que se ha sintetizado el ADNc de cadena sencilla a través de una reacción de transcriptasa inversa usando ARN poli(a)⁺ que se obtiene como anteriormente se mencionó como un templado, el ADNc de doble cadena se puede sintetizar a partir del ADNc de cadena sencilla. Este método puede ser el método de nucleasa S1 [véase Efstratiadis, A., *et al.* (1976) *Cell*, 7, 279-288], el método Gubler/Hoffmann [véase Gluber, U. y Hoffman, B. J. (1983) *Gene* 25, 263-269], el método Okayama/Berg [véase Okayama, H. y Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170] u otros; sin embargo, el método que se usa en la presente invención de manera adecuada es el método llamado RT-PCR en donde una reacción de cadena de polimerasa (en adelante referida como "PCR") [véase Saiki, R. K., *et al.* (1988) *Science* 239, 487-49] se realiza usando un ADNc de cadena sencilla como un templado.

El ADNc de doble cadena obtenido de esta manera se integra en un vector de clonación para obtener un vector recombinante, que entonces es introducido en un microorganismo, tal como *Escherichia coli*, para formar un transformante. El transformante se puede seleccionar al usar resistencia de tetraciclina o resistencia de ampicilina como un marcador. *Escherichia coli* se puede transformar a través del método Hanahan [véase Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580], más específicamente, al preparar una célula competente en presencia de cloruro de calcio, cloruro de magnesio o cloruro de rubidio, y agregar el vector de ADN recombinante a la célula competente. Obsérvese que cuando se usa un plásmido como un vector, el plásmido debe

tener cualquiera de los genes de resistencia al fármaco mencionados anteriormente. Está de más decir que, un vector de clonación diferente a un plásmido, tal como un fago del grupo lamda, se puede usar.

5 Como un método de selección de una cepa que tiene un ADNc, que codifica para cada una de las subunidades de un anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumana deseado de la cepa transformante obtenida anteriormente, cualquiera de los métodos descritos posteriormente se puede emplear. Cuando un ADNc deseado es amplificado específicamente por el método RT-PCR, tal operación del método se puede saltar.

10

(a) Método de uso de una reacción de cadena de polimerasa

Cuando la secuencia de aminoácidos de una proteína deseada ha sido aclarada en su totalidad o en parte, los iniciadores de oligonucleótido de una cadena sentido y una cadena antisentido correspondientes a una parte
15 de la secuencia de aminoácidos, son sintetizados. Entonces, la reacción de cadena de polimerasa [Saiki, R. K., *et al.* (1988) Science 239, 487-49] se realiza al usar estos iniciadores en combinación para amplificar un fragmento de ADN que codifica para subunidades de cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo de oculospanina antihumana deseado. Como el ADN
20 templado usado en la presente, se puede hacer uso de ADNc sintetizado a partir de ARNm de un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumana a través de una reacción de transcriptasa inversa.

El fragmento de ADN preparado de esta manera se puede integrar directamente en un vector de plásmido mediante el uso de un equipo comercialmente disponible, etc. Alternativamente, se puede usar el fragmento de ADN para seleccionar un clon deseado a través del marcado del fragmento con ^{32}P , ^{35}S , o biotina, y la realización de la hibridización de la colonia o hibridización de placa usando esto como una sonda.

Por ejemplo, un método para examinar una secuencia de aminoácidos parcial de cada subunidad del anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumana de la presente invención preferiblemente se realiza a través del aislamiento de cada subunidad mediante el uso de un método conocido tal como electrofóresis o cromatografía de columna y después el análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal de cada subunidad usando un secuenciador de proteína automático (por ejemplo, PPSQ-10, fabricada por Shimadzu Corporation).

Un método para aislar el ADNc que codifica para cada subunidad de la proteína de anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumana del transformante deseado obtenido como anteriormente se mencionó, se realiza de acuerdo con un método conocido [véase Maniatis, T., *et al.*, (1982) en "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.], y más específicamente, se puede realizar a través de separar fracciones que corresponden al ADN vector a partir de una célula y cortar una región de ADN que codifica para una subunidad deseada desde el ADN vector (ADN plásmido).

(b) Método de clasificación usando una sonda de oligonucleótido sintetizado

Cuando la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de una proteína deseada es aclarada (cualquier secuencia es tomada a partir de cualquier región de la proteína deseada mientras sea una secuencia específica que tenga una pluralidad de aminoácidos contiguos), un oligonucleótido es sintetizado (en este caso, se puede hacer uso de cualquier secuencia de nucleótidos que se supone se basa en el grado de frecuencia de los codones en uso o una pluralidad de secuencias de nucleótidos de secuencia de nucleótidos concebibles en combinación; en este último caso, el número de tipos de secuencias de nucleótidos se puede reducir por inosina de integración) para que corresponda a la secuencia de aminoácidos, usada como una sonda (marcada con ^{32}P , ^{35}S o biotina); hibridizada con un filtro de nitrocelulosa sobre el cual el ADN de una cepa transformante se desnaturaliza e inmoviliza, y después la cepa positiva obtenida es aislada.

La secuencia del ADN obtenida de esta manera se puede determinar por el método de modificación química Maxam – Gilbert [véase Maxam, A. M. y Gilbert, W. (1980) en "Methods in Enzymology" 65, 499-576] y el método de terminación de cadena de dideoxinucleótido [Messing, J y Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276].

Recientemente, un sistema de determinación de secuencia de base automática usando un colorante fluorescente se ha usado ampliamente

(por ejemplo, robots de secuencia "CATALYST 800" y secuenciador de ADN modelo 373 etc. fabricado por PerkinElmer Japan Co., Ltd.).

Usando tal sistema también hace posible la determinación de manera eficiente y segura de una secuencia de nucleótidos del ADN. Con base en los datos de la presente invención de esta manera determinados incluyendo la secuencia de nucleótidos de ADN y las secuencias de aminoácidos N-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera, es posible determinar la secuencia de aminoácidos en su totalidad de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de la presente invención.

La cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina cada una constituyen una región variable y una región constante. La región variable constituye también regiones determinantes de complementariedad (en adelante referida como "CDR", existen 3 sitios en cada una de la cadena pesada y la cadena ligera) y regiones de marco adyacentes a estas CDR (4 sitios en cada una de la cadena pesada y cadena ligera).

La secuencia de aminoácidos de la región constante es común a los anticuerpos que pertenecen a la misma clase de inmunoglobulina sin considerar el tipo de antígeno. En la región variable, la secuencia de aminoácidos de una CDR es intrínseca a cada anticuerpo. Sin embargo, de acuerdo a un estudio que compara la secuencia de aminoácidos de numerosos anticuerpos, se sabe que la posición de la CDR y la longitud de una secuencia de marco son similares entre las subunidades de diferentes anticuerpos mientras pertenezcan al mismo subgrupo [véase Kabat, E. A., et

al. (1991) en "Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol. II": U.S. Department of Health and Human Services]. Por lo tanto, es posible determinar la posición de las CDR y regiones de marco y además la región constante en cada secuencia de aminoácidos, al comparar las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumana de la presente invención con los datos de la secuencia de aminoácidos conocidos. Observe que la longitud de la cadena de FRH₁, es decir, la región de marco localizada en el lado proximal al N terminal, a veces es más corta que longitud general de 30 aminoácidos.

En algunos casos, la región de marco es conocida por tener un mínimo de 18 aminoácidos [véase Kabat *et al.* citado anteriormente]. A partir de esto, en el anticuerpo de la presente invención, la longitud de la cadena de la región de marco en N terminal de la cadena pesada se establece en 18 a 30 aminoácidos, preferiblemente 30 aminoácidos, mientras la función del anticuerpo de oculospanina antihumana no se dañe.

En resumen, sólo a través de modificación de manera artificial de un péptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos como cada una de las CDR de las cadenas ligeras o cadenas pesadas o una secuencia de aminoácidos parcial contigua de las mismas, como se determinó anteriormente, con lo cual se aproxima la estructura a la estructura terciaria de la CDR tomada realmente desde dentro de la molécula de anticuerpo de oculospanina antihumana, una actividad de unión capaz de unirse a la oculospanina humana se puede impartir a la CDR [véase, por ejemplo, USP

No. 5331573]. Por tanto, un péptido que contiene la misma secuencia de aminoácidos como aquella de una CDR o una secuencia de aminoácidos parcial de la misma también se incluye siendo una molécula de la presente invención.

5 Una secuencia de aminoácidos modificada se puede preparar al suprimir por lo menos uno o más aminoácidos de su secuencia de aminoácidos original de acuerdo con la mutagénesis de cartucho [véase Toshimitu Kishimoto, "New Biochemical Experimental Lecture 2, Nucleic acid III, Recombinant DNA technique", p 242-251].

10 Varios tipos de secuencias ADN se pueden producir de acuerdo con un método habitual para la síntesis de manera química de un ácido nucleico, por ejemplo, el método triéster fosfito [véase Hunkapiller, M., *et al.* (1984) Nature 310, 105-111]. Observe que los codones que corresponden a un aminoácido deseado ya son conocidos *per se*. Cualquier codón puede ser
15 seleccionado. Alternativamente, el codón que será usado se puede determinar de acuerdo con un método habitual considerando la frecuencia con la cual se usan los codones por la célula hospedero. La modificación parcial de las secuencias de nucleótidos de codones, se puede realizar de acuerdo con un método habitual, más específicamente, de acuerdo con un método de
20 mutagénesis específica del sitio [véase Mark, D.F., *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666] usando un iniciador oligonucleótido sintético que codifica una modificación deseada.

Además, es posible verificar si un cierto tipo de ADN puede hibridizar con un ADN que codifica para una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumana de la presente invención al someter el ADN al siguiente experimento realizado usando un ADN de sonda marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, de acuerdo con el método de iniciador aleatorio [véase Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6-13] o el método de traducción nick [véase Maniatis, T., *et al.* (1982) en "Molecular Cloning A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.].

Para explicar más específicamente, el ADN tiene que ser revisado si es adsorbido sobre, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o nylon. Después de ser desnaturalizada con álcali, si es necesario, la membrana se calienta o irradia con UV, inmovilizando de esta manera el ADN sobre la membrana. La membrana es humedecida con una solución de pre-hibridización que contiene 6X SSC (1X SSC contiene cloruro de sodio 0.15 M, solución de citrato trisódico 0.015) y solución de Denhardt al 5%, y dodecilsulfato de sodio al 0.1% (SDS), y se mantiene a 55°C durante 4 horas o más. Posteriormente, la sonda preparada en avance se añade a la solución de pre-hibridización para tener una actividad específica final de 1×10^6 cpm/ml y la temperatura se mantiene a 60°C durante la noche. Después, la membrana es lavada con 6X SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos varias veces, se lava adicionalmente con 2X SSC durante 20 minutos y se somete a una auto-radiografía.

Usando los métodos anteriormente mencionados, el ADN que hibridiza con el ADN que codifica una cadena pesada o una cadena ligera del anticuerpo de oculospanina antihumana humanizado de la presente invención se puede aislar a partir de una genoteca de ADNc aleatoria o una genoteca genómica [véase Maniatis, T., *et al.* (1982) en "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.].

Cada una de las secuencias de ADN obtenidas de la manera mencionada anteriormente se puede integrar en un vector de expresión, que entonces se puede introducir en una célula hospedera procariótica o célula eucariótica. De esta manera, el gen (que tiene el ADN) se puede expresar en la célula hospedera. El método de expresión es el mismo que el método descrito en la sección "5. La preparación de un anticuerpo de oculospanina antihumana", párrafo "(1) preparación de antígeno" que se expone posteriormente.

Una fracción que contiene una proteína de anticuerpo de oculospanina antihumana producida dentro o fuera de la célula transformante se puede tratar a través de varios procedimientos de aislamiento de proteína conocidos basados en el uso de propiedades físicas y/o químicas para aislar y purificar la proteína. Ejemplos de estos métodos incluyen el tratamiento con un agente de precipitación de proteína generalmente usado, ultra-filtración, cromatografía, tal como cromatografía con tamiz molecular (filtración de gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, y

cromatografía de afinidad, o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), diálisis y combinaciones de los mismos.

Para humanizar el anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumana, la secuencia de aminoácidos de una región variable debe
5 diseñarse de tal manera que toda la secuencia de CDR y una secuencia de aminoácidos parcial de la secuencia FR determinada se transplanten en un marco de anticuerpo de humano, como sigue:

Convencionalmente, en el diseño de un anticuerpo humanizado, un subgrupo aceptor es seleccionado basado en las siguientes líneas de guía.

10 a) la combinación natural de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo de humano conocido que tiene una secuencia de aminoácidos de origen natural se usa como tal;

b) aunque la combinación de una cadena pesada y una cadena ligera como un subgrupo se mantiene; la cadena pesada y la cadena ligera se
15 pueden derivar de anticuerpos de humano diferentes. La cadena pesada y la cadena ligera que se usarán se pueden seleccionar a partir de secuencias de aminoácidos con alta identidad con aquellas de la cadena pesada y la cadena ligera de los donadores, respectivamente, y las secuencias consenso. En la presente invención, las líneas de guía anteriormente mencionadas se pueden
20 emplear. Sin embargo, existen métodos alternos como siguen:

c) sin considerar la combinación del subgrupo, se puede emplear un método para la selección de FR de la cadena pesada y la cadena ligera con alta identidad con aquellas de un donador de la genoteca de secuencias

primarias de un anticuerpo humano. En estos métodos de selección, el grado de identidad de los aminoácidos de la región FR entre un donador y un aceptor se puede establecer a 70% o más. Al emplear tal método, es posible reducir el número de residuos de aminoácidos de un anticuerpo que serán
5 transplantedos a partir de un donador, induciendo de esta manera menos respuesta HAMA.

Existe una operación (en adelante referida como "modelado molecular") para predecir la estructura terciaria de una molécula de anticuerpo a partir de su secuencia primaria; sin embargo, la exactitud de predicción de
10 esta operación es limitada. Por lo tanto, el papel de un residuo de aminoácido que solamente aparece raramente en el subgrupo al cual el donador pertenece no puede ser suficientemente especificado. Generalmente es difícil determinar cual residuo de aminoácido de un donador o un aceptor se debe seleccionar para tal posición del residuo de aminoácido de acuerdo con el
15 método descrito anteriormente por Queen y los co-trabajadores. Sin embargo, de acuerdo con el método de selección (c), es posible reducir la frecuencia con la cual tal determinación se debe realizar.

Los inventores de la presente han incrementado además tales métodos de humanización al proveer un método novedoso de identificación de
20 un aminoácido derivado del FR de un donador e importante para mantener la estructura y función de una CDR del donador.

Después de que una molécula aceptor de humano para cada una de la cadena ligera y cadena pesada se selecciona, el residuo de

aminoácido que será transferido desde el FR de un donador es seleccionado por el método mencionado posteriormente.

En las secuencias de aminoácidos del donador y el aceptor, cuando los residuos de aminoácidos correspondientes de sus FR difieren entre sí, se debe determinar que residuo de aminoácido debe ser seleccionado. Cuando se realiza tal selección, se debe tomar cuidado de manera que no se dañe la estructura terciaria de la CDR derivada del donador.

Queen *et al.* ha propuesto, en la Publicación Nacional Japonesa de la Solicitud de Patente Internacional No. 4-502408, un método para el transplante de un residuo de aminoácido en el FR en un aceptor junto con una secuencia de la CDR, si esto satisface por lo menos una de las siguientes condiciones.

1) El aminoácido está raramente presente en la posición dentro de una región FR de humano de un aceptor, mientras que el aminoácido correspondiente de un donador está normalmente presente en la posición equivalente;

2) el aminoácido es localizado extremadamente cerca a una de las CDR;

3) se predice que el aminoácido tiene un átomo de la cadena lateral dentro de cerca de 3 angstroms de la CDR en su modelo de inmunoglobulina tridimensional y el átomo de la cadena lateral puede interactuar con un antígeno o la CDR de un anticuerpo humanizado.

En lo anterior, un residuo que satisface el requerimiento 2) anterior a veces exhibe la propiedad del requerimiento 3). Por lo tanto, en la presente invención, el requerimiento 2) se omite y dos requerimientos se establecen nuevamente. Más específicamente, en la presente invención, si el
5 residuo de aminoácido en el FR del donador que será transferido junto con la CDR satisface lo siguiente:

- a) el aminoácido está raramente presente en la posición dentro de una región FR de un aceptor, mientras que el aminoácido correspondiente de un donador está normalmente presente en la posición equivalente;
- 10 b) en el modelo de estructura terciaria, el aminoácido presumiblemente interactúa con un átomo de aminoácido constituyente de la CDR y un antígeno o el bucle de la CDR que será transplantado;
- c) la posición mencionada anteriormente es aquella de un residuo de determinación de tipo canónica; o
- 15 d) la posición es aquella que forma una superficie de contacto entre una cadena pesada y una cadena ligera, entonces el residuo de aminoácido es transplantado desde el FR del donador.

En el requerimiento a), de acuerdo con la lista Kabat mencionada anteriormente, un aminoácido encontrado en una frecuencia de 90% o más en
20 una posición en la misma subclase del anticuerpo que se define como "normalmente presente", mientras que un aminoácido encontrado en una frecuencia de menos de 10% se define como "raramente presente".

En el requerimiento c), ya sea que se presente o no "la posición mencionada anteriormente es un residuo de determinación de la clase canónica", la determinación se puede realizar solamente de acuerdo con la lista Chothia mencionada anteriormente.

5 Los requerimientos b) y d), el modelado molecular de la región variable del anticuerpo se debe realizar en avance. Como el software para el modelado molecular, cualquier software disponible comercialmente se puede usar; sin embargo, preferiblemente AbM (fabricado por Oxford Molecular Limited Company) se usa.

10 La exactitud de predicción mediante el modelado molecular es de alguna manera limitada. Por lo tanto, en la presente invención, al considerar datos cristalográficos de rayos X para las regiones variables de diversos anticuerpos, la veracidad de la estructura predicha por el modelado molecular se puede evaluar dos etapas.

15 En la estructura terciaria de la región variable construida por el software de modelado molecular, tal como AbM, si la distancia entre los dos átomos es más corta que un valor de la suma del radio van der Waals de dos átomos más 0.5 angstroms, las dos moléculas se asume que se encuentran en contacto de van der Waals. Por otra parte, si la distancia entre los átomos
20 tienen polaridad, tal como el nitrógeno de amida u oxígeno de carbonilo, de las cadenas principal y lateral, es más corta que una distancia de una distancia de unión de hidrógeno promedio, 2.9 angstroms más 0.5 angstroms, se asume que la unión de hidrógeno puede existir entre los átomos. Además,

si la distancia entre los átomos cargados opuestamente es más corta que una distancia de 2.85 angstroms más 0.5 angstroms, se asume que un enlace iónico se forma entre los átomos.

Por otra parte, de los resultados experimentales cristalográficos de rayos X para varias regiones de varios anticuerpos, como la posición en el FR a donde el contacto con la CDR se puede encontrar con una alta frecuencia sin considerar el subgrupo, las siguientes posiciones se pueden especificar: en la cadena ligera, las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 23, 35, 36, 46, 48, 49, 58, 69, 71, y 88^a, y en la cadena pesada, las posiciones 2, 4, 27, 28, 29, 30, 36, 38, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 69, 71, 73, 78, 92, 93, 94, y 103^a (todos los números representan números de aminoácidos definidos en los documentos descritos por Kabat *et al.* La misma definición se aplicará posteriormente). Cuando el mismo estándar como aquel del modelado molecular se aplica, los residuos de aminoácido de estas posiciones se confirman que están en contacto con los residuos de aminoácido de la CDR en la posición 2/3 de la región variable conocida del anticuerpo. Con base en los hallazgos, la frase: "b) en el modelo estructural terciario, el aminoácido presumiblemente interactúa con un átomo de aminoácido constituyente de la CDR y el antígeno o el bucle de la CDR que será transplantado" significa lo siguiente.

En el modelado molecular, si una posición en el FR que se espera esté en contacto con la CDR coincide con cualquiera de las posiciones en las cuales el contacto entre el FR y la CDR se refiere que se presenta frecuentemente de acuerdo a la detección experimental a través de

cristalografía de rayos X, la selección del residuo de aminoácido del donador se prefiere. En otros casos, el requerimiento b) no se toma en consideración.

La frase: "d) la posición es aquella que forma una superficie de contacto entre la cadena pesada y la cadena ligera" significa el siguiente

5 requerimiento. A partir de los resultados experimentales cristalográficos de rayos X para las regiones variables de diversos anticuerpos, se confirma que el contacto de la cadena pesada-cadena ligera frecuentemente se observa en los residuos de aminoácido 36, 38, 43, 44, 46, 49, 87, 98° en la cadena ligera y en los residuos de aminoácido 37, 39, 45, 47, 91, 103 y 104° en la cadena

10 pesada. En los casos donde la posibilidad de contacto de la cadena pesada-cadena ligera se previene en el modelado molecular y la posición de contacto coincide con cualquiera de las posiciones mencionadas anteriormente, el trasplante del residuo de aminoácido del donar preferiblemente se realiza. En otros casos, el requerimiento d) no se toma en consideración.

15 El ADN que codifica regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de oculospanina antihumana humanizado de la presente invención se puede producir a través de los métodos descritos posteriormente.

Por ejemplo, una pluralidad de fragmentos de polinucleótidos

20 que comprenden una secuencia de nucleótidos parcial del ADN, de 60 a 70 nucleótidos de longitud, son sintetizados químicamente alternativamente a partir de las cadenas sentido y antisentido. Después, los fragmentos de polinucleótidos individuales son apareados y ligados usando ADN ligasa. De

esta forma, es posible obtener un ADN que tiene un ADN que codifica regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de oculospanina antihumana deshumanizado deseado.

En otro método, el ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos total de la región variable de un aceptor se extrae de linfocitos, el reemplazo de los nucleótidos se realiza en la región que codifica una CDR a través de un método conocido por aquellos con la experiencia en la técnica para introducir una secuencia de escisión de enzima de restricción. Después de realizar la escisión en la región con la enzima de restricción correspondiente, la secuencia de nucleótidos que codifica para una CDR del donador se sintetiza y liga usando ADN ligasa. De esta manera, es posible obtener el ADN que codifica para regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de oculospanina antihumana humanizado deseado.

Además, en la presente invención, es posible obtener el ADN que comprende ADN que codifica para regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de oculospanina antihumana humanizado deseado, preferiblemente de acuerdo con el método PCR de extensión de sobreposición (Horton *et al.*, Gene, 77, 61-68, (1989)) descrito posteriormente.

Para explicar más específicamente, dos secuencias de ADN diferentes, que codifican dos secuencias de aminoácidos diferentes, respectivamente y que se desea se ligen entre sí, se designan como (A) y

(B), esto se realiza por conveniencia. Un iniciador sentido de 20 a 40 nucleótidos (en adelante referido como un "iniciador (C)") que será apareado al lado 5' de la secuencia de ADN (A) y un iniciador antisentido de 20 a 40 nucleótidos (en adelante referido como un "iniciador (D)") que será apareado al lado 3' de la secuencia de ADN (B), son químicamente sintetizados. Además, un iniciador sentido del tipo quimérico (en adelante referido como "iniciador (E)") se forma a través del ligado de una secuencia de nucleótidos de 20 a 30 nucleótidos al lado 3' de la secuencia de ADN (A) y una secuencia de nucleótidos de 20 a 30 nucleótidos se liga al lado 5' de la secuencia del ADN (B). Un iniciador antisentido (en adelante referido como "iniciador (F)") complementario al iniciador (E) es sintetizado. Cuando una PCR se realiza usando un ADN de vector apropiado que contiene ADN (A) como un sustrato, el iniciador sentido (C) y el iniciador antisentido de tipo quimérico (F), el ADN en donde los 20 a 30 nucleótidos del extremo 5' de ADN (B) se une al extremo 3' del ADN (A), se puede obtener (el ADN formado nuevamente es designado como ADN (G)). Similarmente, cuando una PCR se realiza usando ADN de vector apropiado que contiene ADN (B) como un sustrato, el iniciador antisentido (D) y el iniciador sentido del tipo quimérico (E), el ADN en donde 20 a 30 nucleótidos del extremo 3' de ADN (A) se une al extremo 5' del ADN (B), se puede obtener (el ADN formado nuevamente se designa como ADN (H)). En el ADN (G) y (H), de 40 a 60 nucleótidos en el lado 3' del ADN (G) forman una secuencia complementaria con aquella formada por 40 a 60 nucleótidos del lado 5' del ADN (H). El ADN amplificado

(G) y (H) se mezcla y somete a PCR, el ADN (G) y (H) se forma en una cadena sencilla en una primera reacción de desnaturalización. Aunque la mayoría de las cadenas de ADN vuelven a sus estados originales después de una reacción de apareamiento, una parte del ADN se forma en un ADN de doble heterocadena mediante el apareamiento de la región de secuencia de nucleótido complementaria. Una parte de cadena sencilla que sobresale es llenada a través de una reacción de extensión posterior para obtener un ADN tipo quimérico (en adelante referido como ADN (I)) formado de ADN (A) y ADN (B) ligados entre sí. El ADN (I) se puede amplificar al realizar PCR usando ADN (I) como un substrato, el iniciador sentido (C) y el iniciador antisentido (D). En la presente invención, el ADN que codifica para una región de CDR de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal de ratón de oculospanina antihumana, el ADN que codifica para una región FR de inmunoglobulina de humano IgG, además el ADN que codifica para una señal de secreción de inmunoglobulina de humano IgG se puede usar como un ADN (A) y (B), en una base caso por caso, y sometido a la reacción de ligación mencionada anteriormente.

Observar que los codones correspondientes a un aminoácido deseado se conocen *per se* y se pueden seleccionar de manera arbitraria. Más específicamente, los codones se pueden determinar de acuerdo con un método habitual considerando la frecuencia con la cual se usa el codón por un hospedero. Una parte de la secuencia de nucleótidos de los codones se puede modificar de acuerdo con un método habitual tal como mutagénesis

específica del sitio (véase Mark, D.F., *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666) usando un iniciador de oligonucleótidos sintético que codifica una modificación deseada. Por lo tanto, si cada iniciador se diseña para introducir una mutación puntual y después se sintetiza químicamente, es posible obtener ADN que codifica para regiones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo de oculospanina antihumana deseado.

Al integrar cada uno de los ADN de la presente invención obtenidos de esta manera en un vector de expresión, una célula hospedera procariótica o eucariótica se puede transformar. Además, al introducir un promotor apropiado y una secuencia relacionada con la expresión fenotípica de estos vectores, cada gen se puede expresar en la célula hospedera correspondiente.

En virtud del método mencionado anteriormente, un anticuerpo de oculospanina antihumana recombinante se puede fabricar fácilmente con alta pureza y con un alto rendimiento.

(4) Preparación de anticuerpo de humano completo oculospanina antihumana

El anticuerpo de humano completo se refiere a un anticuerpo de humano que tiene solamente la secuencia génica de un anticuerpo derivado de un cromosoma de humano. El anticuerpo de humano completo de oculospanina antihumana se puede obtener a través de un método usando un

ratón que produce anticuerpo de humano que tiene un fragmento de cromosoma de humano que contiene los genes para una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo de humano [véase Tomizuka, K. *et al.*, *Nature Genetics*, 16, p. 133-143, 1997; Kuroiwa, Y. *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 26, p.3447-3448, 1998; Yoshida, H. *et al.*, *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 722-727, 2000, etc.] o se puede obtener a través de un método para obtener un anticuerpo de humano derivado de un despliegue de fago

seleccionado de una genoteca de anticuerpo de humano [Véase Wormstone, I. M. *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 43(7), p.2301-8, 2002; Carmen, S. *et al.*, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 1 (2), p. 189-203, 2002; Siriwardena, D. *et al.*, *Ophthalmology*, 109(3), p.427-431, 2002, etc.].

Como un método para confirmar si se ha unido o no específicamente el anticuerpo de oculospanina antihumana recombinante preparado de esta manera a oculospanina humana, el método ELISA usado en la evaluación del titulador de anticuerpo de un ratón inmunizado se emplea de manera adecuada.

20

6. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de oculospanina antihumana

De los anticuerpos de oculospanina antihumana obtenidos a través de un método descrito en la sección "5: Preparación de anticuerpo oculospanina antihumano", el anticuerpo que neutraliza la actividad biológica de oculospanina de humano o un anticuerpo específicamente que daña una célula cancerosa que expresa oculospanina de humano se puede obtener. Estos anticuerpos pueden inhibir la actividad biológica de oculospanina de humano en el cuerpo viviente, en otras palabras, la canceración de una célula. Por lo tanto, se pueden usar como un medicamento, en particular, como un agente terapéutico para el cáncer. La actividad de un anticuerpo de oculospanina antihumana en la neutralización de actividad biológica de oculospanina de humano *in vitro* se puede determinar a través de la capacidad de inhibir la canceración de una célula en donde se sobre-expresa la oculospanina de humano. Para explicar más específicamente, la actividad inhibidora se puede determinar mediante el cultivo de una cepa celular de fibroblasto de ratón, NIH3T3, que sobre-expresa la oculospanina de humano, añadiendo un anticuerpo de oculospanina antihumana al sistema de cultivo en varias concentraciones. De esta manera, las actividades inhibidoras contra la formación del locus, formación de colonia y crecimiento esferoide se pueden determinar. La actividad citotóxica de un anticuerpo de oculospanina antihumana contra una célula cancerosa *in vitro* se puede determinar a través de actividad citotóxica dependiente del anticuerpo, citotoxicidad dependiente del complemento o citotoxicidad medida por célula dependiente del complemento exhibida por el anticuerpo de oculospanina antihumana contra

una célula que sobre-expresa oculospanina de humano. Para ser más específico, células 293T que sobre-expresan oculospanina de humano son cultivadas; entonces, un anticuerpo de oculospanina antihumana se añade en diversas concentraciones al sistema de cultivo. Las células de bazo de ratón
5 además se añaden al sistema de cultivo y se cultivan durante un tiempo apropiado. Después, la relación de inducción de muerte celular para las células que sobre-expresan oculospanina de humano, se determina. El efecto de un anticuerpo de oculospanina antihumana en el tratamiento del cáncer se puede determinar *in vivo* usando un animal experimental, más
10 específicamente, a través de la administración del anticuerpo de oculospanina antihumana a un animal transgénico que sobre-expresa oculospanina de humano y que determina un cambio en las células cancerosas.

Un anticuerpo obtenido de esta manera para la neutralización de la actividad biológica de oculospanina de humano o un anticuerpo
15 específicamente que daña células cancerosas que expresan oculospanina de humano es útil como un medicamento, especialmente como una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o como un anticuerpo para su uso en el diagnóstico inmunológico de tal enfermedad. Como el tipo de cáncer, el cáncer de piel y melanoma, un tipo de cáncer de piel, se puede
20 mencionar; pero los cánceres que se pueden tratar o diagnosticar de acuerdo con la invención no se limitan a éstos ejemplos.

La presente invención provee una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de oculospanina antihumana en una cantidad útil para

el tratamiento, un diluyente farmacéuticamente aceptable, portador, solubilizante, emulsionante, conservador y/o agente auxiliar.

Una sustancia que se usa como una preparación farmacéuticamente aceptable en una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención preferiblemente no es tóxica para el paciente al cual se administrará la composición farmacéutica, en vista de la dosis y concentración.

Una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención puede contener sustancias, adecuada para la inclusión en una preparación, que sean capaces de cambiar, mantener y estabilizar el pH, presión osmótica, viscosidad, transparencia, condición isotónica, condición aséptica, estabilidad, solubilidad, proporción de liberación, proporción de absorción y permeabilidad. Ejemplos de tales sustancias para la inclusión en una preparación incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina, y lisina; agentes antioxidantes tales como agentes antibacterianos, ácido ascórbico, sulfato de sodio y sulfito ácido de sodio; agentes de regulación de pH tales como el fosfato, citrato, reguladores de pH de borato, hidrocarbonato, solución Tris-HCl; sustancias de relleno tales como manitol y glicina; agentes de quelación tales como tetraacetato de etilendiamina (EDTA); agentes formadores de complejos tales como cafeína, polivinilpirrolidina, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina; agentes de espesamiento tales como glucosa, manosa y dextrina; carbohidratos tales como monosacáridos, disacáridos,

glucosa, manosa, dextrina; polímeros hidrófilos tales como colorantes, saborizantes, diluyentes, emulsionantes, polivinilpirrolidina; conservadores tales como polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de base, cloruro de benzalconio, benzoato, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenillico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidrina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno; solventes tales como glicerina, propilenglicol, y polietilenglicol; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; polisorbatos tales como agentes de suspensión, PEG, éster sorbitan, polisorbato 20 y polisorbato 80, agentes tensioactivos tales como Triton, trometamina, lecitina, colesterol; agentes de incremento de estabilidad tales como sacarosa, y sorbitol; agentes de incremento de elasticidad; agentes de transporte, diluyentes; excipientes; y/o agentes auxiliares farmacéuticos tales como el cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol/sorbitol. La cantidad de estas sustancias añadidas a una preparación preferiblemente es de 0.01 a 100 veces, más preferiblemente 0.1 a 10 veces el peso del anticuerpo de oculospanina antihumana. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar de manera apropiada la formulación adecuada para la preparación de una composición farmacéutica dependiente de la enfermedad y vía de administración.

El excipiente y el portador usados en una composición farmacéutica pueden ser una sustancia líquida o sólida. Ejemplos de un excipiente y portador adecuados pueden incluir soluciones inyectables, solución salina, fluido espinal cerebral artificial y otras sustancias normalmente

usadas para la administración parenteral. Además, la solución salina neutral y la que contiene albúmina de suero se pueden usar como un portador. Una composición farmacéutica puede contener regulador de pH Tris de 7.0 a 8.5 y un regulador de pH acetato de pH 4.0 a 5.5, que se pueden complementar con sorbitol y otros compuestos. Una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención que tiene una composición seleccionada, se prepara con una pureza requerida en forma apropiada de fármaco, o como un producto liofilizado o un producto líquido. Para describir más específicamente esto, una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo de oculospanina antihumana se puede formar en un producto liofilizado usando un excipiente apropiado tal como sacarosa.

Una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención se puede preparar para el uso parenteral o para el uso oral para la absorción gastrointestinal. La composición y concentración de una preparación se puede seleccionar dependiendo del método de administración. Como un anticuerpo de oculospanina antihumana contenido en una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención exhibe una afinidad más alta para oculospanina humana; en otras palabras, entre mayor sea la afinidad de anticuerpo de oculospanina antihumana para oculospanina humana, como se expresa por la constante de disociación (valor K_d), es decir, entre menor sea el valor K_d , mayor será la eficacia de la composición farmacéutica de la presente invención a una dosis más baja. Por lo tanto, con base en esto, la cantidad de dosis de la composición farmacéutica de la

presente invención a una persona se puede determinar. El anticuerpo de oculospanina antihumana humanizado se puede administrar a una persona como una dosis sencilla en un intervalo de 1 a 30 días en una cantidad de cerca de 0.1 a 100 mg/kg.

- 5 Ejemplos de formas de una composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir inyecciones tales como infusiones, agentes supositorios, agentes permasales, agentes sublinguales, y agentes de absorción percutánea.

10 **7. Búsqueda de una sustancia que tenga interacción directa**

- De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se dirige a un método de diseño de fármaco para obtener una sustancia capaz de inhibir la actividad de oculospanina humana con base en la estructura terciaria de la proteína. Este método es conocido como un método de diseño de fármaco
- 15 racional y se usa para buscar un compuesto que tenga la capacidad de inhibir de manera eficiente o activar una función, tal como actividad enzimática o unirse a un ligando, cofactor o ADN. Como un ejemplo de tal compuesto, un inhibidor de proteasa que sirve como un agente anti-HIV comercializado actualmente es muy bien conocido. En el análisis de la estructura
- 20 tridimensional de oculospanina humana de acuerdo a la presente invención, un método bien conocido generalmente tal como cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear de manera concebible se puede usar. Además, en la búsqueda o diseño de una sustancia para inhibir la función de

oculospanina humana, un método de diseño de fármaco auxiliado con computadora (CADD) se puede usar. Como un ejemplo de este caso, un compuesto de bajo peso molecular (Publicación Internacional WO 99/58515) que inhibe la acción de AP-1 se sabe que podría actuar como un fármaco genómico novedoso para el tratamiento de artritis reumatoide crónica. En virtud de tal método, es posible obtener una sustancia que inhibe la función de oculospanina humana mediante la unión directamente a la oculospanina humana o a través de la inhibición de la interacción entre la oculospanina humana y otros factores.

10 Además, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido asociado con oculospanina humana de la presente invención, en otras palabras, una proteína miembro para controlar la actividad de oculospanina humana. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de clasificación de una proteína miembro para controlar la actividad de oculospanina humana.

15 Un aspecto de tal método de clasificación comprende una etapa de llevar una muestra de proteína de prueba en contacto con oculospanina humana, seleccionando de esta manera una proteína que se une a la oculospanina humana. Tal método incluye la purificación de una proteína al hacer uso de su afinidad para oculospanina humana purificada. Para describir más específicamente, primero, una secuencia formada de 6 histidinas se une a oculospanina humana como una marca de afinidad. La oculospanina humana resultante se incuba en una solución de extracto celular (es decir, una

fracción pasa a través de una columna cargada con níquel-agarosa) a 4°C durante 12 horas. Entonces, se añade de manera separada un portador de níquel-agarosa a la mezcla y la mezcla se incuba a 4°C durante una hora. Una vez que el portador de níquel-agarosa se lava suficientemente con una
5 solución reguladora de lavado, se añade 100 mM de imidazol a la mezcla para eluir una proteína que se une específicamente a la ocluspanina humana y contenida en la solución de extracto celular. La proteína purificada se analiza para determinar su estructura. Una proteína que puede purificarse como se describió anteriormente incluye una proteína que se une directamente a la
10 ocluspanina humana y una proteína que forma un complejo como una subunidad con una proteína que se une directamente a la ocluspanina humana, pero que no tiene actividad de unión a la ocluspanina humana, uniéndose así indirectamente a la ocluspanina humana [ver Experimental Medicine, Supplementary volume, Biomanual series 5, "Transcriptional factor
15 investigation method" pp. 215-219 (publicado por Yodosha Co., Ltd.)].

Como métodos alternativos, existe un método de clonación de conformidad con el Far-Western blot (Experimental Medicine, Supplementary volume, New Genetic Engineering Handbook, pp76-81, (publicado por Yodosha Co., Ltd.), y un sistema de dos híbridos que utiliza una célula de
20 levadura o de mamífero (Experimental Medicine, Supplementary volume, New Genetic Engineering Handbook, pp66-75, (publicado por Yodosha Co., Ltd.), y "Checkmate mammalian two hybrid system" (fabricado por Promega). Sin embargo, la presente invención no está restringida al uso de estos métodos.

Si está disponible ADNc de una proteína socia que interactúa directa o indirectamente con la oculospanina humana de esta manera, puede utilizarse en clasificado funcional de una sustancia que inhibe la interacción entre la oculospanina humana y la proteína miembro. Más específicamente, se puede preparar una proteína de fusión de oculospanina humana con glutathiona-S-transferasa. La proteína de fusión se deja unir a una microplaca cubierta con anticuerpo anti-glutathiona-S-transferasa y se pone en contacto una proteína miembro biotinilada con la proteína de fusión. La unión de la proteína miembro con la proteína de fusión puede detectarse utilizando fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina. Cuando se añade la proteína miembro biotinilada, se añaden sustancias de prueba al mismo tiempo para seleccionar una sustancia que promueva o inhiba la unión de la proteína de fusión y la proteína miembro. Mediante este método, se puede obtener un sustrato que actúe directamente sobre la proteína fusionada o una sustancia que actúe directamente sobre la proteína miembro.

Cuando la proteína fusionada se une indirectamente a la proteína miembro mediante otro factor, se lleva a cabo el ensayo en presencia de una solución de extracción celular que contiene este factor. En este caso, se puede seleccionar una sustancia que pueda actuar sobre el factor.

Cuando la proteína miembro obtenida tiene la actividad de suprimir la función de la oculospanina humana, es posible seleccionar un agente anti-cáncer, por ejemplo una sustancia candidato útil como agente terapéutico para cáncer de próstata, de conformidad con un método de prueba

utilizando un vector de expresión que comprenda el gen de ocluspanina humana, como se describió anteriormente. Adicionalmente, cuando la proteína miembro obtenida tiene la actividad de suprimir la función de la ocluspanina humana, se puede utilizar un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótido que codifique dicho supresor en terapia génica para el cáncer.

Dicho polinucleótido se puede obtener al analizar la secuencia de aminoácido del inhibidor identificado, sintetizar una sonda de oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido y clasificar una genoteca de ADNc o genoteca genómica. Adicionalmente, en el caso en el que se derive un péptido que tenga actividad inhibidora contra una función de la ocluspanina humana a partir de una genoteca de polipéptido artificial sintetizada aleatoriamente, se puede sintetizar químicamente ADN que comprenda una secuencia de nucleótido que codifique la secuencia de aminoácido del péptido.

En terapia génica, se integra un gen que codifique dicho inhibidor, por ejemplo, en un vector de virus y un paciente se puede infectar con un virus (atenuado) que comprenda el vector de virus recombinante resultante. En el cuerpo del paciente, se produce un factor anti-cáncer y funciona para suprimir la proliferación de células de cáncer. De esta manera, es posible tratar el cáncer.

Como método para introducir un agente terapéutico génico en una célula, se puede utilizar ya sea una transfección génica usando un vector de virus y una transfección génica no viral [Nikkei Science, 4, (1994), p. 20-45;

Experimental Medicine, extra number, 12(15) (1994); Experimental Medicine, Supplementary volume, "Basic Technology of gene Therapy" Yodosha, Co., Ltd (1996)].

Ejemplos de transfección génica utilizando un vector de virus
5 incluyen métodos para integrar ADN que codifique a un inhibidor o una versión
mutada del ADN en virus de ADN o utilizar un virus de ARN como retrovirus,
adenovirus, virus adeno-asociado, virus de herpes, virus de vaccinia, virus
pox, virus de polio, o virus sindbis e introducir el vector de virus en un cuerpo.
De éstos, se prefieren particularmente los métodos que utilicen retrovirus,
10 adenovirus, virus adeno-asociado y virus vaccinia. Ejemplos de transfección
génica no viral incluyen un método para administrar un plásmido de expresión
directamente en el músculo (método de vacunación de ADN), tratamiento de
liposoma, lipofección, microinyección, tratamiento con fosfato de calcio y un
método de electroporación. De estos, se prefieren el tratamiento de
15 vacunación de ADN y tratamiento de liposoma.

Para utilizar un agente terapéutico génico como medicina en la
práctica, existe un método *in vivo* para introducir ADN directamente en el
cuerpo y un método *ex vivo* que comprende tomar un cierto tipo de células del
cuerpo, introducir ADN a las células y retomar las células al cuerpo [Nikkei
20 Science, 4, (1994), p. 20-45; The Pharmaceutical Monthly, 36(1), 23-48
(1994); Experimental Medicine, Extra number, 12(15) (1994)].

Cuando se administra el agente terapéutico génico de
conformidad con el método *in vivo*, se administra a través de una ruta de

administración apropiada, como una vena, arteria, tejido subcutáneo, tejido intradérmico o músculo, que difiere dependiendo del tipo de enfermedad y síntomas. Cuando se administra el agente de conformidad con un método *in vivo*, el agente terapéutico génico generalmente se prepara en forma de una inyección; sin embargo, si es necesario, se puede añadir un portador utilizado de manera acostumbrada. Adicionalmente, cuando se prepara el agente en forma de un liposoma o liposoma fusionado con membrana (virus Sendai-liposoma, etc.), el agente de liposoma puede suministrarse como un agente en suspensión, agente liofilizado, o agente centrifugalmente concentrado y liofilizado.

Una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótido representada por SEQ. ID. No. 1 o una secuencia complementaria a una secuencia parcial de esta secuencia de nucleótidos se puede utilizar como una llamada terapia antisentido. Como una molécula antisentido, se puede hacer uso de ADN parcialmente complementario a la secuencia de nucleótido representada por SEQ. ID No. 1 del listado de secuencia y formada generalmente de 15 a 30 mer. También se puede hacer uso de un derivado de ADN estable como un derivado de fosforotioato, derivado de metilfosfonato o derivado fosfolino del ADN o un derivado de ARN como ARN 2'-O-alquilo. Dicha molécula antisentido puede introducirse en una célula mediante un método conocido en la técnica de la presente invención, por ejemplo al inyectar una cantidad extremadamente pequeña de la molécula antisentido, al formar una cápsula de liposoma o al expresarla mediante al uso de un vector

que tiene una secuencia antisentido. Dicha terapia antisentido es útil para tratar una enfermedad ocasionada por actividad excesiva de una proteína codificada por la secuencia de nucleótido representada por la SEQ. ID No. 1 de listado de secuencia.

- 5 Se puede preparar una composición que contenga el oligonucleótido antisentido útil como medicina mediante un método conocido que incluye mezclar un portador farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de dicho portador y el método de preparación se describen en Applied Antisense Oligonucleotide Technology (1998 Wiley-Liss, Inc.). Se puede administrar
- 10 oralmente una preparación que contenga un oligonucleótido antisentido al mezclarlo con un excipiente o diluyente apropiado farmacéuticamente aceptable, en forma de tabletas, cápsulas, polvo o jarabe, o administrarse parenteralmente en forma de una inyección, supositorio, parche o preparación externa. Estas preparaciones pueden prepararse mediante conocido utilizado
- 15 aditivos, excipientes que incluyen excipientes orgánicos como derivados de azúcar (por ejemplo lactosa, azúcar blanca (sacarosa), glucosa, manitol y sorbitol); derivados de almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de papa, α -almidón y dextrina); derivados de celulosa (por ejemplo, celulosa cristalina); goma arábiga, dextrano; y pullulan; y excipientes inorgánicos como
- 20 derivados de silicato (por ejemplo ácido silícico anhidro suave, silicato de aluminio sintetizado, silicato de calcio y aluminato metasilicato de magnesio); fosfatos (por ejemplo fosfato ácido de calcio); carbonato (por ejemplo carbonato de calcio) y sulfatos (por ejemplo, sulfato de calcio); agentes

lubricantes que incluyen estearatos de metal (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de calcio, y estearato de magnesio); talco; sílice coloidal; ceras (por ejemplo de abeja y cera de esperma de ballena), ácido bórico; ácido adípico; sulfatos (por ejemplo sulfato de sodio), glicol; ácido fumárico; benzoato de sodio; DL leucina; lauril sulfatos (por ejemplo lauril sulfato de sodio y lauril sulfato de magnesio); silicatos (por ejemplo silicato anhidro, silicato hidratado); y derivados de almidón mencionados anteriormente; agentes de unión incluyendo hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol y los mismos compuestos mencionados como excipientes; agentes de desintegración que incluyen derivados de celulosa (por ejemplo hidroxipropilcelulosa de grado de sustitución bajo, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio entrelazada; y celulosas de almidón químicamente modificadas (por ejemplo carboximetil almidón, carboximetil almidón de sodio y polivinilpirrolidona entrelazada); agentes de emulsión como sílice coloidal (bentonita y goma de abeja), hidróxidos de metal (por ejemplo, hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio), agentes tensioactivos aniónicos (por ejemplo lauril sulfato de sodio y estearato de calcio); agentes tensioactivos catiónicos (por ejemplo cloruro de benzalconio) y agentes tensioactivos no iónicos (por ejemplo polioxietilenaalquileter, éter del ácido graso de polioxietilensorbitán y éster de ácido graso de sacarosa); agentes de estabilización incluyendo paraoxibenzoatos (por ejemplo metilparabeno, propilparabeno); alcoholes (por ejemplo, clorobutanol, alcohol bencílico y alcohol feniletílico); cloruro de

benzalconio; fenoles (por ejemplo fenol y cresol); timerosal; dehidroacetato; y ácido sórbico; agentes de saborización incluyendo edulcorantes, sabores ácidos y sabores usados generalmente; y diluyentes.

Como método para introducir un compuesto de la presente
5 invención en un paciente, se puede utilizar un sistema de dispersión coloidal adicionalmente a los métodos mencionados anteriormente. El sistema de dispersión coloidal se espera que contribuya a incrementar la estabilidad del compuesto en el cuerpo y transportar eficientemente el compuesto a un órgano, tejido o célula específica. La elección de sistema de dispersión
10 coloidal no se limita en particular siempre y cuando se utilice en lo general y, por ejemplo, se puede utilizar un sistema de dispersión basado en lípidos que incluya complejos de polímeros, nanocápsulas, microesferas, perlas, o emulsionantes de aceite en agua, micelas, mezclas de micelas o liposomas. Un sistema de dispersión coloidal preferido consiste de liposomas múltiples o
15 vesículas de una membrana artificial, que es efectiva para transferir eficientemente un compuesto a un órgano, tejido o célula específica (Mannino *et al.*, *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume y Cevc, *Biochem. Et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen *et al.*, *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn y Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698).

20 Un liposoma unilamelar en la escala de 0.2 a 0.4 μm en tamaño es capaz de encapsular una proporción grande de macromoléculas contenidas en una solución reguladora acuosa. Se puede encapsular un compuesto en dicha membrana interior acuosa y transportarse a las células

cerebrales en forma biológica activa (Fraley *et al.*, Trends Biochem. Sci., 1981, 6, 77). El liposoma generalmente está compuesto de una mezcla de un lípido, particularmente un fosfolípido, más particularmente un fosfolípido que tenga una temperatura de transición de fase elevada, con uno o más tipos de esteroides, en particular colesterol. Ejemplos de un lípido útil para producir un liposoma incluye compuestos de fosfatidilo, como fosfatidil glicerol, fosfatidil colina, fosfatidil serina, esfingolípido, fosfatidiletanolamina, cereobrosida y gangliosida. De estos particularmente útil es diacilfosfatidil glicerol en el cual una parte de lípido tiene 14 a 18 átomos de carbono, en particular, 16 a 18 átomos de carbono y está saturada (es decir, no está presente un enlace doble dentro de la cadena de átomo de carbono C14-C18). Fosfolípidos típicos incluyen fosfatidil colina, dipalmitoil fosfatidil colina y diestearoil fosfatidil colina.

El sistema de dispersión coloidal que contienen liposomas puede utilizarse para un objetivo pasivo o activo. El objetivo pasivo puede lograrse utilizando una tendencia inherente a los liposomas, los cuales tienden a distribuirse en el sistema reticuloendotelial de un órgano que contiene sinusoides. Alternativamente, se puede lograr el objetivo activo al modificar un liposoma, por ejemplo al unir un ligando específico al mismo, como un revestimiento de proteína viral (Morishita *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 1993, 90, 8474), un anticuerpo monoclonal (o su porción de unión apropiada), azúcar, glicolípido o proteínas (o su fragmento de oligopéptido apropiado); o alternativamente, al modificar la composición de liposoma para distribuirlo en

órganos o tipos de células diferentes a aquellos en los que se ubican naturalmente los liposomas. La superficie del sistema de dispersión coloidal puede modificarse en varios métodos para su objetivo. En un sistema de suministro que utiliza un liposoma como medio de inserción, para mantener un

5 ligando para uso en la inserción al mantener una asociación estrecha con una bicapa de lípido, un grupo lípido se integra en la bicapa de lípido de liposoma. Para unir una cadena de lípido al ligando objetivo, se pueden utilizar varios grupos de eslabonamientos. Ejemplos de dicha unión de ligando objetivo a una molécula en la superficie celular específica que se encuentra en la célula

10 a la cual un oligonucleótido de conformidad con la presente invención se desea ser suministrada incluye (1) hormona, factor de crecimiento o un fragmento de oligopéptido apropiado del mismo que se une a un receptor celular específico expresado predominantemente mediante una célula a la cual se desea el suministro; y (2) un anticuerpo policlonal, anticuerpo

15 monoclonal o un fragmento apropiado del mismo (por ejemplo, Fab; F(ab)'2) que une específicamente a un epítopo antigénico encontrado predominantemente en una célula objetivo. Se pueden formar dos o más bioactivadores en un complejo dentro de un liposoma individual y ser administrados. Se puede añadir un agente medicinal para mejorar la

20 estabilidad intracelular y/o capacidad de inserción de los contenidos al sistema de dispersión coloidal.

Aunque se puede utilizar un gen terapéutico de la presente invención en una cantidad que varíe con la intensidad del síntoma, edad, etc.

En el caso de administración peroral, el límite inferior máximo permitido por dosis es 1 mg (preferiblemente 30 mg) y el límite superior máximo por dosis es 2,000 mg (preferiblemente 1,500 mg). En el caso de inyección, el límite inferior mínimo por dosis es 0.1 mg (preferiblemente 5 mg) y el límite superior máximo por dosis es 1,000 mg (preferiblemente 500 mg). Dicha dosis puede administrarse subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente.

Ahora, la presente invención se describirá más a detalle mediante ejemplos, que no deben interpretarse como restrictivos de la presente invención. Observe que las operaciones individuales respecto a la manipulación génica en los siguientes ejemplos se realizan de conformidad con los métodos descritos en "Molecular Cloning" (por Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989), o revisados utilizando agentes reactivos comercialmente disponibles o equipos de conformidad con los protocolos de los mismos.

15

EJEMPLO 1

Cribado de un gen expresado específicamente en una célula de cáncer

Se realizó el análisis de perfil de expresión utilizando una sonda EST (Affymetrix GeneChip HG-133 sonda 223795_at: fabricada por Affymetrix) que tiene una secuencia de nucleótido parcialmente traslapada con la secuencia representada por Seq. ID No. 1 del listado de secuencia,

20

mediante el uso de la base de datos (GeneExpress Software System versión 1.4.2) provista por la compañía Genelogic.

La expresión del gen de oculospanina humana en varias células se comparó cuantitativamente al considerar su transcripción. Como resultado, los niveles de expresión en 8 muestras de melanocito fueron significadamente elevadas, en comparación con los niveles en otras muestras de células, incluyendo 12 muestras de células sanguíneas, 6 muestras de células glía, 62 muestras de células epiteliales (valores P de los mismos fueron <0.0001 , $=0.0007$, y <0.0001 secuencialmente en orden, figura 1, panel superior).

A continuación, se compararon los niveles de expresión del gen de oculospanina humana en muestras derivadas del tejido. Más específicamente, se comparó la cantidad de transcripción con respecto a 66 muestras de piel de individuos sanos y 33 muestras de melanoma. Como resultado, la cantidad de transcripción en las muestras de melanoma fue significativamente más elevada (valor $P = 0.0001$, figura 1, panel inferior). Adicionalmente, cuando se compararon muestras de piel de 66 individuos sanos con 12 muestras de melanoma derivadas del tejido de piel con melanoma, la cantidad de transcripción en las muestras de melanoma fue significativamente mayor (valor $P = 0.007$, figura 2, panel superior).

Cuando se compararon las muestras de piel de 66 personas sanas con 12 muestras de melanoma derivadas de tejido del ganglio linfático, la cantidad de transcripción en las muestras de melanoma fue significativamente mayor (valor $P = 0.0003$, figura 2, panel inferior).

Adicionalmente, cuando se compararon las muestras de 13 personas saludables derivadas de ganglio linfático con 12 muestras de melanoma derivadas de tejido de ganglio linfático, la cantidad de transcripción en las muestras de melanoma fue significativamente mayor (valor $P = 0.0011$, el panel de la figura 3).

EJEMPLO 2

Adquisición de gen de oculospanina humana y construcción del plásmido de expresión

10

a) Reacción PCR

Como iniciador para amplificar el ADNc de oculospanina humana por PCR, se sintetizaron oligonucleótidos que tenían las siguientes secuencias de conformidad con un método acostumbrado.

15 5'-CACCATGGAGGAGGGGGAGAGGAGCCC-3' (Iniciador 1, Seq. ID No.5 del listado de secuencia).

 5'-GCCCCGGGCGGGTTTGGCAGCGG-3' (iniciador 2, Seq. ID No. 6 de listado de secuencias).

Observe que el iniciador 1 es un oligonucleótido construido al añadir 4 bases, CACC, como una secuencia KOZAK, corriente arriba del codón de inicio del gen de oculospanina humana, en otras palabras, un oligonucleótido construido al añadir las 4 bases, la secuencia CACC, al lado 5' de la secuencia de nucleótido que consiste de los nucleótidos No. 1 a 23 del

20

Seq. ID No. 1 de listado de secuencia. La secuencia CACC, ya que forma una cadena complementaria al término 3' del sector cuando se integra en el vector de clonación pENTR/D-TOPO, posibilita integrar el gen en el vector y mantener simultáneamente la orientación del gen. El iniciador 2 es un oligonucleótido compuesto de una cadena complementaria a una secuencia de nucleótido que consiste de nucleótidos No. 1043 a 1065 del Seq. ID No. 1 del listado de secuencia.

La reacción PCR se realizó utilizando ADN polimerasa PLATINUM *Pfx* (fabricada por Invitrogen) de conformidad con el protocolo proporcionado. Más específicamente, a 0.1 µl del ADNc de la primera cadena obtenida, 1.5 µl de cada uno de 10 pmol/µl del iniciador sintético 1 y el iniciador sintético 2, 5 µl de solución reguladora de amplificación 10X *Pfx*, 1.5 µl de mezcla 10 mM dNTP, 1 µl de 50 mM MgSO₄, 0.5 µg de ADN polimerasa PLATINUM *Pfx*, 10 µl de solución potenciadora 10X PCRx y 28.9 µl de agua esterilizada se añadieron para preparar 50 µl de una solución de reacción de PCR. La reacción de PCR se realizó utilizando una máquina Peltier Thermal Cycler TPC-200 ADN (fabricada por MJ Research), primero al calentar la solución PCR a 94°C durante 2 minutos, repetir 5 veces un ciclo térmico que consiste de reacciones a 94°C durante 30 segundos y 65°C durante 2 minutos; 5 veces un ciclo térmico que consistía de reacciones a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 40 segundos, y 68°C durante 1 minuto y 20 segundos; 5 veces un ciclo térmico que consistía de reacciones a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 40 segundos, y 68°C durante 1 minuto y

20 segundos; 35 veces un ciclo térmico que consistía de reacciones de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 40 segundos, y 68°C durante 1 minuto y 20 segundos y finalmente mantener la solución PCR a 68°C durante 10 minutos, y luego almacenar la solución a 4°C. Se obtuvo un ADNc al someter el producto de reacción a electroforesis con gel de agarosa al 1.5% y confirmar la amplificación de ADNc NM_031945 (1069bp), y purificar el ADN del gel de agarosa utilizando el paquete S.N.A.P. UV-Free Gel Purification Kit (fabricado por Invitrogen) de conformidad con el protocolo proporcionado. Se determinó la concentración de ADNc así purificado mediante el uso de ID Image Analysis Software Versión 3.5 (Kodak Digital Science EDAS290: fabricado por Kodak) con referencia a una escalera de ADN 1kb que se utilizó como una referencia de concentración.

b) Clonación de ADNc de oculospanina humana en el vector

15 pENTR/D-TOPO

Se clonó el ADNc de NM_031945 que se obtuvo en el ejemplo 2a) en el vector pENTR/D-TOPO utilizando el paquete pENTR Directional TOPO Cloning Kit (fabricado por Invitrogen) de conformidad con el protocolo proporcionado. Más específicamente, se mezcló ADNc NM_031945 con el vector pENTR/D-TOPO, se le unió topoisomerasa a ésta, en la solución reguladora de reacción suministrada con el equipo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se transformó *E. coli* One Shot TOP10 Chemically Competent (fabricada por Invitrogen) utilizando el producto de

reacción obtenido y cultivado en un medio de agar LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina. Las colonias *E. coli* resultantes, que mostraron resistencia a la kanamicina, se seleccionaron y cultivaron en un medio TB líquido que contenía 1 ml de 50 µg/ml de kanamicina a 37°C de la noche a la mañana. Se

5 aisló y purificó el ADN plásmido al utilizar un paquete Montage Plasmid Miniprep₉₈ Kit (fabricado por Millipore). Posteriormente el ADN plásmido así obtenido se sometió a una reacción utilizando el paquete Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de conformidad con el protocolo proporcionado, se analizó la secuencia de nucleótido utilizando un analizador

10 ABY PRISM 3100 DNA Analyzer (fabricado por Applied Biosystems). Como resultado, se confirmó que el ADNc (Seq. ID No. 1 del listado de secuencia) que tenía un marco de lectura abierto del nucleótido representado por el número de acceso GenBank NM_031945 se integró en el vector pENTR/D-TOPO.

15 Posteriormente, el gen se transfirió a un vector de expresión, ADNpc3.1/DEST40 (fabricado por Invitrogen), utilizando el sistema GATEWAYTM. Para explicar más específicamente, 4 µl de mezcla GATEWAYTM LR ClonaseTM Enzyme Mix (fabricado por Invitrogen), 4 µl de solución reguladora de reacción LR, 0.3 µg de pENTR/D-TOPO-NM_031945,

20 y 0.3 µg de ADNpc3.1/DEST40 se mezclaron y conformaron a una solución de reacción de 20 µl en solución reguladora de TE. La solución de reacción se permitió reaccionar a 25°C durante una hora. Después de la reacción, 2 µl de proteinasa K se añadieron y se realizó una reacción a 37°C durante 10

minutos. Utilizando productos de reacción resultante, *E. coli* OneShot TOP10 Chemically competent (fabricado por Invitrogen) se transformaron y cultivaron en un medio de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Las colonias de *E. coli* resultantes, que exhibieron resistencia a la ampicilina, se seleccionaron y cultivaron en 100 ml de medio LB líquido que contenía 50 µg/ml de ampicilina a 37°C de la noche a la mañana, y se aisló y purificó el ADN plásmido (ADNpc3.1/DEST40-NM_031945) mediante el uso del paquete Plasmid MAXI Kit (fabricado por QIAGEN).

10

EJEMPLO 3

Introducción del gen de oculospanina humana en células, confirmación de que el producto del gen de oculospanina humana se expresa, y preparación de una fracción de membrana a partir de oculospanina humana que expresa células para su uso como un inmunógeno

15

a) Transfección de células NIH3T3 con el plásmido ADNpc3.1/DEST40-NM_031945

Se transfectaron células NIH3T3 con plásmido ADNpc3.1/DEST40-NM_031945 obteniendo en el ejemplo 2 como sigue. La transfección de las células NIH3T3 se realizó mediante lipofección utilizando el agente reactivo Lipofectamine™ 2000 fabricado por Invitrogen. Para explicar más específicamente, primero, células NIH3T3 fueron desarrolladas

20

en una placa de 6 pozos hasta a un estado semi-confluyente. Posteriormente, las células se lavaron una vez con DMEM libre de antibiótico que contenía 10% de suero de ternera fetal, luego 200 µl de DMEM libre de antibiótico que contenía 10% de suero de ternera fetal que se añadió a las células. Luego a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron y mezclaron 100 µl de medio libre de suero (DMEM) y 2 µg de ADN plásmido (ADNpc3.0-DEST40-NM_031945) recuperado en la manera anteriormente dicha. A otro tubo Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron y mezclaron 96 µl de medio libre de suero (DMEM) y 4 µl de agente reactivo LipofectamineTM 2000. La solución ADN y la solución de Lipofectamine se mezclaron y dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de esto, se añadió la mezcla de solución de ADN-Lipofectamine a las células y se cultivó a 37°C en 5% CO₂. Después de 4 horas, se añadió 1 ml de DMEM que contenía 10% de ternera de suero fetal a las células que se cultivaron a 37°C de la noche a la mañana en 5% CO₂.

15

b) Confirmación de expresión del plásmido ADNpc3.1-DEST40-NM_031945 en células NIH3T3

Se recuperó el producto de cultivo celular así obtenido. El control negativo que no contenía ADNc o células NIH3T3 transfectadas con el ADNpc3.1-DEST40-NM_031945 obtenido se lavaron con una solución reguladora PBS(-) (fabricada por Invitrogen). Las células fueron dispersadas en una solución reguladora de muestra (fabricada por BioRad) que contenía 2-mercaptoetanol para uso en electroforesis con poliacrilamida SDS (SDS-

20

PAGE). Se realizó SDS-PAGE utilizando 12.5 % de gel de poliacrilamida (e PAGEL E-T12.5L; fabricada por ATTO corporation) bajo condiciones reductoras.

Después de la electroforesis, las bandas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (fabricado por Millipore) mediante el uso de un aparato de transferencia de gel-membrana (NP7513 fabricado por Marysol) en una solución reguladora de transferencia (192 mM glicina, 20% metanol, 25 mM Tris) bajo las siguientes condiciones: 4°C, 120 minutos y 200 mA.

Después de la transferencia, se sometió la membrana PVDF a un análisis de Western blot utilizando un anticuerpo Anti-V5-tag (fabricado por Invitrogen). Para explicar más específicamente, primero la membrana PVDF se bloqueó utilizando Blockace (fabricada por Yukijirushi Co.,) una vez a temperatura ambiente durante 30 minutos y se puso en una bolsa de plástico (nombre comercial: Hybribag fabricada por Cosmo Bio). A la bolsa, se añadieron el anticuerpo anti-V5-tag (dilución de 1000 veces) y 5 ml de Blockace y la bolsa se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Después de una hora, se retiró la membrana y se lavó con PBS que contenía 0.05% Tween 20 (en lo sucesivo referida como "0.05% Tween 20-PBS") una vez a temperatura ambiente durante 15 minutos y dos veces durante 5 minutos. Después de esto, la membrana se transfirió a una nueva bolsa de plástico. A la bolsa, se añadieron 30 ml de una solución que contenía un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano picante

(fabricado por Amersham Pharmacia) diluido 5000 veces con 0.05% Tween 20-PBS y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de una hora, se extrajo la membrana y se lavó con 0.05% Tween 20-PBS una vez durante 15 minutos y cuatro veces durante 5 minutos. Después del lavado, la

5 membrana se colocó en una película de envoltura y se detectó una banda que tenía el anticuerpo anti-V5-tag ligado a éste mediante uso de solución para detección de Western ECL blotting (fabricado por Amersham Pharmacia). La membrana se colocó en la película de envoltura y se empapó en la solución para detección de Western ECL blotting durante un minuto y luego se expuso

10 a una película de rayos X (un minuto). Como resultado, se detectó una banda específica a las células NIH3T3 que tenían ADN de plásmido ADNpcA3.1-DEST40-NM_031945 introducido en ésta debido a la presencia del anticuerpo anti-V5-tag (figura 4).

15 c) Transfección de células BALB-3T3 con el plásmido ADNpc3.1-DEST40-NM_031945

Se cultivaron células BALB-3T3 (Colección de Cultivos Tipo Estadounidense No. CCL-163) en tres bandejas de células (área de cultivo: 500 m² fabricadas por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) para el cultivo de células

20 en medio águila modificado de Dulbecco (en lo sucesivo referido como "DMEM" fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd, que contenía 10% de suero bovino (en lo sucesivo "BS") fabricado por Gibco), a 37°C en 5% de gas CO₂ hasta un estado semi-confluyente. Posterior a esto, se transfectaron las

células BALB-3T3 con el plásmido ADNpc3.1-DEST40-NM_031945. La transfección de las células BALB-3T3 se realizó mediante lipofección utilizando agente reactivo de transfección Geneporter™2 (fabricado por Gene Therapy Systems). Para explicar más específicamente, las células se lavaron una vez utilizando un medio libre de suero DMEM. A las células, se añadió 500 ml del medio libre de suero (DMEM). Luego, a un tubo Falcon de 50 ml, se añadieron y mezclaron 6 ml de diluyente New DNA y 240 µg de ADN plásmido ADNpc3.1-DEST40-NM_031945 recuperado por el método mencionado anteriormente. A otro tubo Falcon de 50 ml, se añadieron y mezclaron 4.8 ml de medio libre de suero (DMEM) y 1200 µl de agente reactivo Geneporter™. La solución ADN y la solución Geneporter™2 se mezclaron y permitieron reposar a temperatura durante 20 minutos. Después de esto, la mezcla de solución con ADN-Geneporter™ se añadió a las células (4 ml/bandeja) y se cultivaron a 37°C en presencia de 5% CO₂. Después de 4 horas, se añadió DMEM que contenía 20% de suero bovino en una cantidad de 50 ml/bandeja y se cultivó a 37°C en 5% CO₂ de la noche a la mañana.

d) Preparación de la fracción de membrana celular

Las células cultivadas mediante el método anterior se lavaron con solución reguladora PBS(-) (fabricado por Invitrogen). Las células se recolectaron utilizando un raspador de células (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), y se suspendieron en 7 ml de solución reguladora 5 mM Tris a pH 8.0. La solución celular resultante se permitió reposar a 4°C durante

130
179

30 minutos. Las células se trituraron utilizando un homogeneizador tipo B Dounce (30 carreras) y se centrifugó a 1000G durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 78,000G utilizando un aparato de centrifugado (fabricado por Hitachi) y el precipitado se recuperó. El precipitado

5 se sometió a un gradiente de densidad de azúcar para concentrar los fragmentos de membrana. Más específicamente, el precipitado se disolvió en 3 ml de una solución de 57% de azúcar de solución reguladora 0.25M Tris, pH 8.0. La solución resultante se transfirió a un tubo de centrifugado. Una alícuota de 3 ml de una solución de 57% de azúcar y solución reguladora 0.25M Tris,

10 pH 8.0 y 1.5 ml de una solución de 37.5% de azúcar y solución reguladora 0.25M Tris pH 8.0 se colocaron en capas secuencialmente sobre la solución de precipitado de células. Luego, se realizó el centrifugado utilizando un aparato de centrifugado a 75,500G durante 16 horas. Se tomó una alícuota de 1 ml de la parte superior de cada tubo. A cada alícuota (fracción), 10 mL de

15 solución reguladora 5 mM Tris pH 8.0 se añadieron y esto se sometió a ultracentrifugado a 78,000G durante una hora para recuperar el precipitado. Al precipitado 500 µl de solución reguladora 5 mM Tris, pH 8.0 se añadió y la solución de células se homogeneizó utilizando un homogeneizador tipo B Dounce (10 carreras). La fracción de membrana celular se identificó mediante

20 método de Western blotting descrito en la sección "Confirmación de Expresión" y se utilizó como un inmunógeno.

EJEMPL 4**Inmunización de ratones y fusión celular****(4-1) Inmunización**

5 1 ml (cantidad de proteína: 100 µg) de la solución de fracción de
membrana de las células que expresan oculospanina humana obtenidas en el
ejemplo 3 se inyectó peritonealmente en ratones BALB/C que tenían de 4 a 10
semanas de edad (comprados de Japan SLC Inc.). Después de dos semanas,
la misma solución de fracción de membrana (20 µg de proteína/ratón) se
10 inyectó en la cavidad abdominal como una inmunización de refuerzo.

(4-2) Fusión Celular

Se extirpó el bazo de un ratón a los tres días después de la
inmunización de refuerzo y se añadió a 10 ml de un medio RPMI 1640 libre de
15 suero (10.4 g/l, RPMI 1640 "Nissui"(1): fabricado por Nissui Pharmaceutical
Co., Ltd., en lo sucesivo como "medio RPMI libre de suero") que contenían
solución reguladora 20 mM HEPES (pH 7.3), 350 mg/ml, de carbonato ácido
de sodio, 0.05 mM β-mercaptoetanol, 50 unidades/ml penicilina, 50 µg/ml
estreptomina, y 300 µg/ml L de ácido glutámico, y el bazo se trituró en la
20 malla de un filtro celular (filtro celular, fabricado por Falcon) utilizando una
espátula. La solución de suspensión celular que pasó a través de la malla se
centrifugó para recolectar las células de bazo. Las células de bazo se lavaron

dos veces con medio RPMI libre de suero, se suspendieron en medio RPMI libre de suero y se contó el número de células.

Células de mieloma NSI (Colección de Cultivos Tipo Estadounidense TIB-18) se cultivaron en medios ASF 104 (fabricado por Ajinomoto; en lo sucesivo conocida como el "medio ASF con contenido de suero") que contenían 10% FCS (fabricado por Gibco BRL) a 37°C en 5% de gas CO₂ para que la densidad celular no excediera 1 x 10⁸ células/ml. Las células de mieloma así preparadas se lavaron con medio RPMI libre de suero en la misma manera como arriba y se suspendieron en medio RPMI libre de suero y el número de células se contó.

La solución de suspensión celular NSI que contenía alrededor de 3 x 10⁷ células y la solución de suspensión celular de bazo que contenía de alrededor de 3 x 10⁸ células y se sometieron a centrifugado, y luego el sobrenadante se removió completamente. La operación de fusión celular abajo se realizó manteniendo simultáneamente el tubo centrífugo plástico que contenía la pella en un vaso de precipitado que contenía agua caliente a 37°C. A la pella, 1 ml de 50% (p/v) de polietilenglicol 1500 (fabricado por Boehringer Mannheim) se añadió lentamente mediante pipeta agitando simultáneamente la pella utilizando la punta. Posterior a esto, 1 ml del medio RPMI libre de suero, calentado previamente a 37°C, se añadió gentilmente dos veces y 7 ml adicionales de medio RPMI libre de suero fueron añadidos. Después del centrifugado, se retiró el sobrenadante y 10 ml de medio hipoxantina aminopterina timidina (en lo sucesivo conocida como "medio HAT"; fabricado

por Boehringer Mannheim) que contenía 10% FCS se añadió mediante pipeta agitando gentilmente simultáneamente utilizando la punta. Después de que se añadieron 20 ml del medio HAT que contenían 10% FCS, la solución resultante se dispensó a una microplaca de cultivo celular de 96 pozos en una cantidad de 100 µl/pozo y cultivó en 37°C en 5% de gas CO₂ de gas. Siete a ocho días después, a los pozos que contenían medio con un matiz de amarillo, se añadió medio HAT fresco en una cantidad de 100 µl/pozo. Las células fusionadas así obtenidas se sometieron a clasificado al limitar el análisis de la ilusión como se menciona a continuación.

10

(4-3) Limitación de dilución

La glándula de timo se extirpó de un ratón BALB/c hembra que tenía de 4 a 10 semanas de edad (comprados con Japan SLC Inc.) y se trituró en la malla de un filtro celular (filtro celular fabricado por Falcon) utilizando una espátula. Las células que pasaron a través de la malla se lavaron dos veces con medio de hipoxantina timidina (en lo sucesivo como el "medio HT", fabricado por Boehringer Mannheim) que contenía 10% FCS. Las células de glándula de timo del ratón se suspendieron en 30 ml del medio HT que contenía de 10% FCS. La solución de suspensión así obtenida se utilizó como una solución celular alimentadora. La solución de cultivo que contenían las células fusionadas obtenidas en la sección (4-2) se diluyó de 10 a 100 veces con la solución celular alimentadora dependiendo de la densidad celular y diluida en serie adicionalmente con la solución celular alimentadora hasta que

20

la densidad de las células fusionadas fue de 5 células/ml, 1 célula/ml y 0.5 células/ml. Cada una de las muestras así preparadas se dispersó en una microplaca de cultivo celular de 96 pozos en una cantidad de 100 µl por pozo y se cultivó a 37°C en 5% de gas CO₂ durante 5 días.

5

(4-4) Clasificado

(4-4-1) ELISA celular

Las células que expresaban la oculospanina humana se
10 mantuvieron al cultivar en medio RPMI 1640 (fabricado por Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (fabricado por Moregate Biotech), 20 mM HEPES (fabricado por Sigma) y 55 µM 2-mercaptoetanol (fabricado por Invitrogen) a 37°C en 5% de gas CO₂. Las células que expresan oculospanina humana en la fase de crecimiento logarítmico se
15 sembraron en un matraz de cultivo celular a una densidad de 2×10^4 cm² y se cultivaron durante 3 días. Las células que expresan oculospanina humana así preparadas se transfirieron a un tubo de 50 ml y se centrifugaron utilizando HITACHI himac CF8DL a 1,000 rpm durante 5 minutos (condición de centrifugado 1). El sobre nadante se retiró y las células que expresan
20 oculospanina humana se suspendieron en un medio. Después de esto, el número de células vivas se contó utilizando 0.4% de solución de azul de trifano (fabricado por Sigma). La densidad de las células que expresan oculospanina humana vivas se ajustó utilizando el medio para que fuera de

10⁷ células por mililitro y el medio resultante se dispersó a una placa con fondo en U de 96 pozos en una cantidad de 100 µl/pozo. La placa con fondo en U de 96 pozos se centrifugó utilizando un HITACHI himac CF8DL a 15,000 rpm por un minuto (condición de centrifugado 2). El sobrenadante se removió
5 utilizando una punta 200 µl. La placa con fondo de U de 96 pozos se extrajo en la superficie de lado para suspender las células que expresan oculospanina humana. A la suspensión, soluciones del sobrenadante de cultivo de hibridoma cuyas concentraciones fueron ajustadas a 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml con un medio enfriado en hielo, se añadieron en una cantidad
10 de 100 µl/pozo. Mientras la placa con fondo de U de 96 pozos se agitó utilizando un mezclador de placa (fabricado por Fujirebio Inc.) en intervalos de 15 minutos, se realizó una reacción a 4°C durante 1.5 horas. Después de la finalización de la reacción, se centrifugó la placa con fondo de U con 96 pozos bajo la condición de centrifugado 2, y el sobrenadante se removió utilizando
15 una punta de 200 µl. Una solución (PBS-5%FBS) preparada al añadir 5% de suero de ternera fetal a PBS (-)(fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) se añadió a los pozos en una cantidad de 200 µl por pozo. Después de agitar utilizando un mezclador de placa, se realizó el centrifugado bajo la condición de centrifugado 2 y el sobrenadante se removió utilizando una punta de 200
20 µl. Después de esto, la operación mencionada anteriormente se repitió 2 veces. La placa con fondo de U de 96 pozos se extrajo sobre la superficie lateral para suspender las células que expresan oculospanina humana. A la suspensión, se añadió anticuerpo IgG antihumano marcado con peroxidasa

- (fabricado por Kirkegaard & Perry Laboratories) diluido 500 veces con PBS-5%FBS enfriado en hielo en una cantidad de 100 μ l/pozo. Mientras la placa con fondo de U con 96 pozos se agitó utilizando un mezclador de placa en intervalos de 15 minutos, se realizó una reacción a 4°C durante 1.5 horas.
- 5 Después de la finalización de la reacción, la placa con fondo de U de 96 pozos se centrifugó utilizando la condición de centrifugado 2 y el sobrenadante se retiró utilizando una punta de 200 μ l. Después, se añadió PBS-5%FBS en una cantidad de 200 μ l/pozo y se agitó utilizando un mezclador de placa, centrifugado bajo condición de centrifugado 2, y luego el sobrenadante se
- 10 removi6 utilizando una punta de 200 μ l. Después de esto, la operación mencionada se repiti6 2 veces. La placa con fondo de U de 96 pozos se extrajo sobre la superficie de lado para suspender las células que expresan oculospanina humana. A la suspensión, un sustrato para desarrollo de color para peroxidasa (fabricado por Nacalai Tesque Inc.) ajustado a temperatura
- 15 ambiente fue a6adido en una cantidad de 100 μ l/pozo y se agitó utilizando un mezclador de placa durante 10 minutos. Después el centrifugado fue realizado bajo la condición de centrifugado 2, el sobrenadante se transfiri6 a la placa con fondo plano de 96 pozos en una cantidad de 50 μ l/pozo y se midi6 la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placa (contador de marcas
- 20 m6ltiples 1420 ARVO, fabricado por PerkinElmer Inc.)

(4-4-2) Citometría de Flujo

Las células que expresan oculospanina humana obtenidas en el ejemplo 3 se cultivan y crecen en un medio RPMI 1640 que contiene 10% FCS a 37°C en 5% de gas CO_2 . Una solución de suspensión celular, preparada para contener 1×10^7 células, se dispensó en una microplaca con forma de U de 96 pozos (fabricada por Nunk) en una cantidad de 50 μl /pozo y centrifugada (a 90 x g, 4°C durante 10 minutos). El sobrenadante se retiró y el sobrenadante de las células fusionadas cultivadas en la sección (4-3) anterior se añadió en una cantidad de 50 μl /pozo y se agitó. Se permitió reposar a la placa durante 1 hora sobre hielo, sometido a centrifugado (a 90 x g, 4°C durante 10 minutos) y se removió el sobrenadante. Se lavó la pella dos veces con una solución reguladora de pH citométrica de flujo (PBS que contenía 5% de FCS y 0.04% (p/v) de azida de sodio) en una cantidad de 100 μl /pozo y se añadió 50 μl de fracción de IgG de anticuerpo de IgG de cabra, anti-ratón, diluida 500 veces (fabricada por Organon Technica), marcada con fluorescein-5-isotiocianato (designado en lo sucesivo como "FITC") como anticuerpo secundario y se dejó reposar sobre hielo durante una hora. Después de la centrifugación (a 90 x g, 4°C durante 10 minutos), se removió el sobrenadante. Se lavó la pella dos veces con 100 μl de solución reguladora de pH citométrica de flujo por pozo y después de ello se añadió 50 μl de una solución de formalina al 3.7% y se dejó reposar la mezcla de solución resultante durante 10 minutos sobre hielo. De esta manera se inmovilizaron las células. Después de la centrifugación (a 90 x g, 4°C durante 10 minutos), se removió sobrenadante. Se lavó la pella nuevamente con 100 μl de solución

reguladora de pH citométrica de flujo por pozo y se suspendió en 100 µl de regulador de pH citométrico de flujo por pozo. Se usó esto como muestra para la citometría de flujo. Se midió la intensidad de la fluorescencia FITC emitida de las células en cada muestra, usando un citómetro de flujo (Epics Elite
5 fabricado por Coulter) a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de detección de 530 nm. Cuando la intensidad de fluorescencia FITC de las células que expresan oculospanina humana expuestas al sobrenadante del cultivo de células de fusión fue mucho mayor (aproximadamente de 100 a 1000) que aquella (aproximadamente 0.3) de las
10 células que expresan oculospanina humana no expuestas al sobrenadante del cultivo de células de fusión, se seleccionaron las correspondientes células de fusión.

(4-5) Clonación

15 Se sometieron las células seleccionadas a la sección (4-4) anterior a una serie de pasos (4-3) a (4-4), cinco veces. De esta manera, se obtuvieron varios clones de hibridoma que fueron capaces de producir un solo anticuerpo capaz de unirse a células que expresan oculospanina humana, pero incapaces de unirse a células de origen no transfectadas.

EJEMPL 5**Purificación de anticuerpo monoclonal de oculospanina humana**

Se cultivaron células de hibridoma de ratón-ratón construidas en el ejemplo 4, en 1 litro de medio de ASF que contenía 10% de FCS a 37°C en gas CO₂ a 5% hasta que la densidad de células alcanzó 1 x 10⁶ células/ml. Se centrifugó (a 1,000 rpm durante 2 minutos), se descartó el sobrenadante y se lavaron una vez las células reunidas, usando medio ASF libre de suero. Después de ello, se resuspendieron las células en 1 litro de medio ASF libre de suero y se cultivaron a 37°C en gas CO₂ a 5% durante 48 horas. Se centrifugó la solución de cultivo (a 1,000 rpm durante 2 minutos) y se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de diálisis (peso molecular de límite de exclusión: 12,000 a 14,000, fabricado por Gibco BRL). Se realizó la diálisis con respecto a la cantidad de 10 veces de solución reguladora de pH de fosfato de sodio a 10 mM en (pH 8.0). Se purificó crudamente la IgG contenida en la solución dentro del tubo de diálisis, usando un aparato cromatográfico de líquidos de alto rendimiento (sistema FPLC, fabricado por Pharmacia) bajo las condiciones descritas a continuación:

Columna: columna DEAE Sepharose CL-6B (tamaño de columna 10 ml, fabricada por Pharmacia).

Solvente: solución reguladora de pH de fosfato de sodio a 10 mM (pH 8.0).

Magnitud de flujo: 1 ml/minuto.

189

Elución: gradiente de concentración lineal de cloruro de sodio a 1M (0-50%, 180 minutos).

Se fraccionó el producto de elución a muestras de 5 ml. Se verificó mediante el método ELISA el título de anticuerpo del anticuerpo de oculospanina antihumana en cada fracción, usando proteína de oculospanina humana. En primer lugar, se añadió una solución de fracción de membrana, preparada de células que expresan oculospanina humana preparadas en el ejemplo 3, a una microplaca de 96 pozos para ELISA en una cantidad de 100 μ l/pozo y se mantuvo caliente a 37°C durante 1 hora. Se descartó luego la solución de fracción de membrana y se lavó cada pozo tres veces con 100 μ l de PBS-Tween por pozo. Luego, se añadió por pozo 100 μ l de PBS que contenían alúmina de suero bovino al 2% y se mantuvo caliente a 37°C durante 1 hora. Después de lavar tres veces con 100 μ l de PBS-Tween por pozo, se añadió 100 μ l de fracción de elución y se mantuvo caliente a 37°C durante una hora. Además, después de que se hubieron lavado los pozos tres veces con 100 μ l de PBS-Tween por pozo, se añadió anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón, marcada con peroxidasa de rábano picante (fabricado por Amersham) diluido 2000 veces en PBS-Tween en una cantidad de 100 μ l/pozo y se dejó reaccionar a 37°C durante una hora, y se lavó de nuevo tres veces con 100 μ l de PBS-Tween por pozo. Subsiguientemente, se añadió un sustrato para peroxidasa de rábano plante (fabricado por BioRad) en una cantidad de 100 μ l/pozo y se dejó reposar durante 5 minutos y,

después de ello, se midió la absorbancia de cada pozo a 415 nm, usando una lectora de microplacas.

Consecuentemente, se reunieron las fracciones que exhibían alta absorbancia y se cargaron sobre dos columnas de purificación por afinidad de anticuerpos (columna de proteína G Hitrap, volumen de columna: 5 ml, fabricada por Pharmacia). Después de lavar el interior de las columnas con 25 ml de regulador de pH de equilibrio (20 mM, regulador de pH de fosfato de sodio (pH 7.0) por columna, se eluyó el anticuerpo usando 15 ml de un regulador de pH de elución (clorhidrato de glicina a 0.1 M (pH 2.7)) por columna. Se reunió cada producto de elución en un tubo de ensayo que contenía 1.125 ml de trihidrocloridrato a 1M (pH 9.0). Inmediatamente después de completar la elución, se cargó el producto de elución sobre la porción superior de otro filtro de forma de tubo de centrifugación (Centriprep 10 fabricado por Grace Japan) y se centrifugó de nuevo a 3000 x g a 4°C durante 2 horas. Después de que se hubo removido el filtrado reunido en la porción inferior del filtro, se añadió 15 ml de PBS a la parte superior y se centrifugó nuevamente a 3000 x g a 4°C durante 2 horas. En total, se repitió esta operación cinco veces. A la quinta vez de la operación, se realizó la operación de centrifugación hasta que la cantidad de líquido en la porción superior del filtro hubo alcanzado 0.5 ml. Se usó el líquido que quedó en la porción superior como muestra del anticuerpo de oculospanina antihumana.

EJEMPLO 6**Actividad citotóxica**

Se midió la actividad citotóxica dependiente de los anticuerpos
5 como índice de bioactividad.

Se contó el número de células que expresan oculospanina humana (ejemplo 3) mediante el método de tinción con azul Tryphan, se ajustó la concentración de las células a 1×10^6 células/ml con medio RPMI 1640 (fabricado por Invitrogen, designado en lo sucesivo como el "medio RPMI") que contenía 10% del suero bovino fetal (fabricado por Moredgate). A
10 las células se les añadió 2.5 μ l de ácido bis(acetoximetil)2,2':6'2"-terpiridino-6,6"-dicarboxílico (agente marcador BATDA, fabricado por PerkinElmer), se agitó bien y se incubó a 37°C en dióxido de carbono al 5% durante 30 minutos, mientras se mezclaba en intervalos de 15 minutos invirtiendo el
15 cultivo. Al medio de cultivo se le añadió 10 ml de medio RPMI, se agitó y se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos. Se repitió esta operación de lavado otras dos veces. Se resuspendieron las células que expresan oculospanina humana, marcadas con BATDA, en 10 ml de medio RPMI 1640. Se sembró un
20 alícuota de 50 μ l (5×10^3 células) de la solución de suspensión en cada pozo de una microplaca de fondo redondo de 96 pozos la cual se preparó previamente añadiendo un anticuerpo de oculospanina antihumana de ratón purificada, ajustada previamente con medio RPMI 1640 a una concentración de 1 μ g/ml, o el sobreradante del medio de cultivo de hibridoma, y dejándola

en reposo a 4°C durante 30 minutos. Se dejó reposar la microplaca a 4°C durante otros 30 minutos. A un pozo de control negativo se le añadió ya sea anticuerpo de oculospanina antihumana de ratón, purificado, o medio RPMI 1640 en lugar de sobrenadante de hibridoma

5 Se prepararon células efectoras como sigue. Se cultivaron células J 774A.1) obtenibles de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) en presencia de 100 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (fabricado por Sigma) durante 3 días. Se contó el número de células J774A.1 mediante el método de tinción con azul Tryphan y se ajustó luego con medio
10 RPMI a una concentración de 1×10^6 células/ml. A cada pozo de la microplaca con fondo redondo de 96 pozos mencionada anteriormente, se le sembró 100 µl de alícuota (1×10^5 células) de las células. Se centrifugó la placa a 1,500 rpm durante 5 minutos y se incubó a 37°C en gas CO₂ al 5% durante 4 horas. A un pozo de control positivo se le añadió Triton-X-100 al 1%
15 en lugar de las células efectoras, para destruir completamente las células que expresan oculospanina humana marcada con BATDA. Después de una incubación de 4 horas, se tomó 20 µl del sobrenadante de cultivo de cada pozo y se transfirió a una placa blanca de 96 pozos. A la placa se le añadió 200 µl de solución de europio (fabricado por PerkinElmer). Se agitó la placa a
20 temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió la descomposición de fluorescencia con el tiempo.

Se calculó la proporción de la inducción de muerte celular en cada pozo con base a la ecuación siguiente:

Proporción de la inducción de muerte celular (%) = a (conteo fluorescente para cada pozo de prueba – conteo secundario para el pozo de control negativo)/(conteo fluorescente para el pozo de control positivo – conteo secundario para el pozo de control negativo) x 100.

- 5 Mediante la comparación con un control que contiene sumamente medio RPMI 1640, se confirmó que se indujo la muerte celular de células que expresan oculospanina humana, mediante la adición del anticuerpo de oculospanina humana de ratón, purificada, o el sobrenadante de hibridoma.

10

EJEMPLO 7

Preparación de células que expresan oculospanina humana y su fracción de membrana como inmunógeno y antígeno para detectar anticuerpo

- 15 **a) Construcción del pEF/DEST51-NM_031945 plasmídico**

20 Se clonó el ADNc NM_031745 obtenido en el ejemplo 2a al vector pENTR/D-TOPO, usando el equipo de clonación pENTR Directional TOPO (fabricado por Invitrogen) de acuerdo con el protocolo provisto. Se mezcló ADNc NM-031945 con el vector pENTR/ D-TOPO que tenía topoisomerasa unida al mismo, en un regulador de pH de reacción provisto con el equipo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Usando el producto de reacción obtenido, se transformaron *E. coli*. químicamente competentes con Oneshot TOP10 (fabricado por Invitrogen) y

se cultivó en medio de agar LB que contenía 50 µg/ml de canamicina. Se seleccionaron las colonias resultantes de *E. coli* resistentes a la canamicina, y se cultivaron en 1 ml de medio TB líquido que contenía 50 µg/ml de canamicina a 37°C durante una noche. Se aisló el ADN plasmídico y se purificó, usando un equipo Montage Plasmid Miniprep₉₆ (fabricado por Millipore). Enseguida, se sometió el ADN plasmídico así obtenido a una reacción de secuenciación que se realiza usando un equipo BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction de acuerdo con el protocolo provisto, se analizó la secuencia de nucleótidos usando un analizador de ADN ABI PRISM 3100 (fabricado por Applied Biosystem). Como resultado, se confirmó que el ADNc (secuencia ID No. 1 del listado de secuencias) que tiene un marco de lectura abierta de la secuencia de nucleótidos representada por el acceso No. NM-031945 estaba en el vector pENTR/D-TOPO.

Luego, se transfirió el gen al vector de expresión pcDNA3.1/DEST40 (fabricado por Invitrogen) mediante el uso del sistema GATEWAYTM. Mas específicamente, se mezcló 4 µl de GATEWAYTM (fabricado por Invitrogen), 4 µl del regulador de pH de reacción LR, 0.3 µg de pENTR/D-TOPO-NM_031945, 0.3 µg de pcDNA3.1/DEST40, con regulador de pH TE para preparar una solución de 20 µl, la cual se dejó reaccionar a 25°C durante una hora. Después de completar la reacción, se añadió 2 µl de proteinasa K y se realizó la reacción a 37°C durante 10 minutos. Se transfectaron *E. coli* químicamente competentes OneShot TOP10 (fabricado

por Invitrogen) con el producto de reacción y se cultivaron sobre medio de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se seleccionaron las colonias resultantes *E. coli*, resistentes a la ampicilina, y se encubaron en 100 ml de medio LB líquido que contenía 50 µg/ml de ampicilina a 37°C durante una
5 noche. Como resultado se aisló ADN plasmídico (pcDNA3.1Dest40-NM_03945) y se purificó usando el equipo Plasmid MAXI (fabricado por Qiagen).

Similarmente, se transfirió el gel al vector de expresión pEF/DEST51 (fabricado por Invitrogen) mediante el uso del sistema
10 Gateway™. Para explicar más específicamente, se mezcló otro µl de GATEWAY™ LR Clonase™ Enzyme Mix (fabricado por Invitrogen), 4 µl de regulador de pH de reacción LR, 0.3 µg de pENTR/D-TOPO-NM_031945 y 0.3µg de pEF/DEST51, con el regulador de pH TE para preparar una solución de 20µl y dejar reaccionar a 25°C durante una hora. Después de la reacción,
15 se añadió 2 µl de proteinasa K y se dejó reaccionar a 37°C durante 10 minutos. Se transformaron *E. coli* químicamente competentes OneShot TOP10 (fabricado por Invitrogen) con el producto de reacción obtenido y se cultivaron sobre medio de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se seleccionaron las colonias resultantes de *E. coli*, resistentes a la ampicilina, y
20 se cultivaron en 100 ml de medio LB líquido, que contenía 50 µg/ml de ampicilina, a 37°C durante una noche. Como resultado, se aisló el ADN (PEF-DEST51-NM_031945) y se purificó usando el equipo plasmídico Plasmid MAXI (fabricado por Qiagen).

b) Transfección de células BALB-3T3 y células 293 de con el PEF-DEST51-NM_031945 plasmídico

Se cultivaron células BALB-3T3 (obtenibles de RIKEN, clon A31) en 330 cajas para cultivo de células de 150 mm (área de cultivo: 148 cm² fabricado por IWAKI) que contenían medio de Dulbecco's Modified Eagle (designado en lo sucesivo como el "DMEM", fabricado por SIGMA) suplementada con 10% de suero bovino (fabricado por GIBCO; designado en lo sucesivo como "BS") a 37°C en gas CO₂ al 5% hasta alcanzar un estado semiconfluente. Después de ello, se transfectaron las células BALB-3T3 con el pEF-DEST51- NM_031945 plasmídico. Se realizó a transfección de células BALB-3T3 por lipofección usando el reactivo de transfección de Geneporter™ 2 fabricado por Gene Therapy Systems. Más específicamente, se lavaron las células una vez con medio libre de suero (DMEM) y se añadió 20 ml de medio libre de suero (DMEM). Luego, a un tubo de Falcon de 50ml se le añadió 0.6 ml de diluyente New DNA y 24 µg de ADN plasmídico (pEF-DEST51-NM_031945) recuperado mediante el método mencionado anteriormente y se mezcló. A otro tubo de Falcon de 50 ml de le añadió 0.35 ml de medio libre de suero se (Opti-MEM I, fabricado por GIBCO) y 84 µl de reactivo de Geneporter™ 2 y se mezcló. Se mezclaron la solución de ADN y la solución Geneporter™ 2 y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de ello, se añadió la mezcla de solución de ADN- Geneporter™ 2 a las células (1ml/caja) y se cultivó a 37°C en CO₂ al 5%.

Después de 3 horas, y se reemplazó con 20 ml de DMEM que contenía suero bovino al 10% por caja y se cultivó a 37°C durante una noche en CO₂ al 5%.

Además, se introdujo pEF-DEST51-NM_031945 plasmídico en células 293T como sigue. Se realizó la introducción a las células 293T usando el reactivo LIPOFECTAMINE 2000 (fabricado por Invitrogen). Se sembraron las células 293T a una densidad de 2.5×10^5 células/ 9.2cm² y se cultivaron a 37°C durante una noche en CO₂ al 5%. En un tubo de polipropileno de 5 ml, se mezclaron 10 µl de reactivo LIPOFECTAMINE 2000 y 250 µl de medio de suero reducido OPTI-MEM I (fabricado por Invitrogen) y se dejaron reaccionar uno con otro a temperatura ambiente durante 5 minutos. En otro tubo de polietileno de 5 µl, se mezclaron 4 µg de (pEF-DEST51-NM_031945) plasmídico y 250 µl de medio de suero reducido OPTI-MEM I. Se mezclaron la solución de LIPOFECTAMINE y la solución de ADN y se dejaron reaccionar una con otra a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se removi6 el sobrenadante de las células 293T cultivadas durante una noche y se añadió medio Dulbecco's Modified Eagle (fabricado por Gibco) libres de antibiótico que contenía suero de becerro fetal al 10% (fabricado por Moregate) a las células en una cantidad de 2ml/9.2 cm². Se añadió la mezcla de solución LIPOFECTAMINE/ADN a las células 293T y se encubaron a 37°C en gas CO₂ al 5% durante dos días.

c) Preparación de la fracción de membranas angular (10 litros)

Se lavaron las células cultivadas mediante el método mencionado anteriormente, con una solución reguladora de pH PBS (-) (fabricado por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd). Se reunieron las células usando un raspador de células (fabricado por IWAKI) y se suspendieron en 230 ml de una solución reguladora de pH de Tris a 5 mM, pH 7.4. Se dejó reposar la solución celular resultante a 4°C durante 30 minutos. Se trituraron las células usando un homogenizador Dounce de tipo B (50 golpes) y se centrifugó a 1000G durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 1000G durante 10 minutos usando un aparato de ultracentrifugación (fabricado por KUBOTA) y se recuperó el sobrenadante.

Se centrifugó el sobrenadante a 78,000G durante 100 minutos usando un aparato de ultracentrifugación (fabricado por BECKMAN) y se recuperó el precipitado. Al precipitado se le sobrepuso 14 ml de sacarosa al 57% en regulador de pH de Tris y se sometió a un gradiente de densidad de azúcar a 78,000G durante 16 horas a 4°C. Como resultado, se recuperó el fragmento de membrana de la capa superior. A la fracción de membrana se le añadió 55 ml de regulador de pH de Tris a 5 mM, pH 7.4, y se centrifugó a 78,000G durante 60 minutos a 4°C. Se recuperó el precipitado. Al precipitado se le añadió 1500 µl de regulador de pH de Tris a 5 mM, pH 7.4, y luego se homogeneizó la solución celular con el homogeneizador de tipo B (10 golpes). Se identificó la fracción de membrana usando un método Western blotting descrito en la sección "Confirmación de la expresión".

200
199**EJEMPLO 8****Inmunización de ratones y fusión de células****a) Inmunización**

5 Se inyectaron intraperitonealmente 1×10^7 células de las células que expresan el gen de oculospanina humana obtenidas en el Ejemplo 7 a ratones hembra BALB/c que tenían 5 semanas de edad (compradas de Japón SLC Inc.). Después de 2, 4, 6 y 8 semanas, se inyectaron intraperitonealmente las células que expresan el gen de oculospanina humana
10 (1×10^7 células/ratón) como reforzador de la misma manera.

b) Fusión de células

 Se extirpó el bazo de un ratón en el cuarto días después de la inmunización de refuerzo y se añadió a 10 ml de medio MEM libre de suero
15 (9.4 g/l, medio Eagle MEM "Nissui" (1): fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., designado en los sucesivo como "medio MEM libre de suero") que contenía regulador de pH HEPES a 10 mM (pH 7.4), 0.02 mg/l de carbonato ácido de sodio y 300 µg/ml de ácido L-glutámico, y se retiraron luego las células de bazo usando una jeringa 21G' y pinzas. Se centrifugó la solución de
20 suspensión de células para precipitar las células de bazo. Se lavaron dos veces las células de bazo con el medio MEM libre de suero y se suspendieron en medio MEM libre de suero y se contó el número de células.

Se cultivaron células de mieloma SP2/0 en medio de cultivo de mieloma (designado en lo sucesivo como el "medio ME") que contenía FBS al 15% (fabricado por GIBCO), 306 µg/ml de ácido glutámico y β-mercaptoetanol a 0.05 mM a 37°C en presencia de gas dióxido de carbono al 7% de tal manera que la densidad de células no excediera 1×10^6 células/ml. Las células de mieloma SP2/0 así cultivadas se lavaron con el medio MEM libre de suero y se suspendieron en medio MEM libre de suero y se contó el número de células.

Se mezclaron las células que contenían solución de suspensión de células SP2/0, el número de las cuales correspondía a aproximadamente 1/5 de las células de bazo, y la solución de suspensión para todas las células de bazo. Después de la centrifugación, se removió el sobrenadante completamente. Se realizó la operación de fusión de células que sigue, mientras que se mantuvo a temperatura ambiente el tubo de centrifugación de plástico que contenía la pella. A la pella se le añadió lentamente 1 ml de polietilenglicol 4000 (fabricado por Merck) al 40% (p/v), mientras se agitaba el tubo de centrifugación. Después de ello, se añadió suavemente tres veces 9 ml de medio MEM libre de suero calentado previamente a 37°C. después de la centrifugación, se removió el sobrenadante y se añadió el medio de hipoxantinaminopterintimidina (designada en lo sucesivo como el "medio HAT"; fabricado por SIGMA) que contenía FBS al 20% usando una pipeta, mientras se agitaba suavemente con la punta de la pipeta, de tal manera que la densidad de células llegara a ser 2.5×10^6 células/ml. Se suministró el

medio HAT a una microplaca para cultivo de células de 96 pozos en una cantidad de 100 μ l/pozo y se cultivó a 37°C en presencia de gas dióxido de carbono al 7%. Después de un día, se añadió medio HAT nuevo a todos los pozos en una cantidad de 100 μ l/pozo y, después de ello, se reemplazó el medio con medio nuevo en intervalos de 2 a 3 días. Las células fusionadas así obtenidas se sometieron a clasificación por análisis de dilución limitativa como se menciona a continuación.

c) Dilución limitativa

La solución de cultivo que contenía las células fusionadas obtenidas en la sección (b) anterior se diluyó en serie, de tal manera que la densidad de las células fusionadas en el medio HT (medio HY en el caso de la segunda clonación o más tarde) llegara a ser 1 célula/pozo (10 células/ml) y 5 células/pozo (50 células/ml). Se suministró cada una de las muestras así preparadas en una cantidad de 100 μ l por pozo en una microplaca de 96 pozos que ya contenía 100 μ l de medio HY y se cultivaron las microplacas a 37°C en presencia de gas dióxido de carbono al 7% durante 10 días.

d) Clasificación

20

d-1) ELISA

Se preparó la fracción de membrana celular obtenida en el ejemplo 7, de una solución de 1 μ g/ml suministrada a una placa EIA de 96 pozos (fabricada por COSTAR) en una cantidad de 50 μ l/pozo. Después de

que se hubo dejado reposar la placa a 4°C durante un día, se descartó la solución de antígeno dentro de la placa, agitando el pozo y se añadió por pozo 80 µl de una solución que compendia BSA al 1% en PBS (-). Se selló la placa y se almacenó a 4°C hasta su uso. Cuando se usó, se puso de nuevo la placa a temperatura ambiente y se lavó tres veces usando un Serawasher (fabricado por Bio-Tec) mediante el cual se suministró PBS (PBS-T) que contenía Tween 20 al 0.1%. Como anticuerpo primario, se añadió a cada pozo 50 µl de sobrenadante de cultivo de células obtenidas después de 10 a 12 días de la fusión de células y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Después de completar la reacción y con el anticuerpo primario, se lavó la placa tres veces con PBS-T y se añadió a los pozos anticuerpo IgG anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (fabricado por BIO SOURCE) diluido 5000 veces con una solución (solución de dilución de antígeno) que contenía BSA al 0.5% añadido a PBS-T, en una cantidad de 50 µl/pozo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Después de completar la reacción con el anticuerpo secundario, se disolvió un sustrato de emisión de colores para fosfatasa alcalina, fosfato de p-nitrofenilo, 2Na6H₂O (pNPP, fabricado por Wako Pure Chemical Industries Ltd.) puesto de nuevo a temperatura ambiente, a una concentración de 1 mg/ml en regulador de pH de pNPP (97 ml/l de dietanolamina, 0.1 g/l de MgCl₂·6H₂O, pH 9.8) y se añadió a los pozos en una cantidad de 100 µl/pozos. Se midió la absorbancia a 405 nm y 630 nm usando una lectora de placas (fabricada por Nalgene Nunc International).

d-2) citometría de flujo

Las células de cultivo HEK293 obtenidas en el ejemplo 7 se cultivaron en medio de DMEM que contenía FBS al 10% a 37°C en gas CO₂ al 5%. Después de la transfección, se cultivaron las células durante 24 horas y se preparó una solución de suspensión de células de manera que contuviera 2 x 10⁷ células/ml. Se suministró la solución de suspensión de células a microplacas con fondo en forma de V de 96 pozos (fabricadas por Corning) en una cantidad de 50 µl/pozo y se sometió a centrifugación (100 x g, 20°C durante 5 minutos). Se removió el sobrenadante y se añadió el sobrenadante de las células fusionadas cultivadas en el paso (c) en una cantidad de 50 µl/pozo, se agitó, se dejó en reposo sobre hielo durante 0.75 horas, se centrifugó (100 x g, 20°C durante 5 minutos), y se removió luego el sobrenadante. Se lavó la pella dos veces con una solución reguladora de pH de citometría de flujo (MEM que contenía FBS al 5%) en una cantidad de 150 µl/pozo. Después de ello, a la pella se le añadió 100 µl de anticuerpo IgG anti-ratón de conejo diluido 33 veces (fabricado por Wako Pure Chemical Industries Ltd.) marcado con fluorecín-5-isiocianato (designado en los sucesivos común "FITC") como anticuerpo secundario, se dejó reposar sobre hielo durante 0.75 horas, y se sometió a centrifugación (1000 x g, 20°C durante 5 minutos). Se removió el sobrenadante, se lavó la pella dos veces con regulador de pH de citometría de flujo usando 150 µl/pozo y se suspendió en el regulador de pH de citometría de flujo en una cantidad de 50 µl/pozo. Se

usó éste como muestra para citometría de flujo. En cada muestra, se midió la intensidad de fluorescencia FITC emitida de las células, por citometría de (FC500, fabricado por BECKMAN) a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de detección de 530 nm. Como resultado, se seleccionaron las células fusionadas de la muestra que exhibía mayor intensidad fluorescente FITC que aquéllas de las células que expresan el transiente HEK293 a las cuales no se les añadió el sobrenadante del cultivo de células de fusión.

10 e) Clonación

Las células seleccionadas en el paso d) anterior se sometieron dos veces a las operaciones de una serie de pasos c) al d). Como resultado, se obtuvieron varios clones de hibridoma que produjeron un anticuerpo monoclonal que se une a células que expresan el transiente HEK293, pero no se une a células a las cuales no se ha introducido el plásmido de expresión de oculospanina antihumana. Una de las cepas de hibridoma así clonadas se designó como O3B8-2C9-4F3 y se depositó en el Depositario de Organismos de Patentes Internacionales del Instituto Internacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada con fecha del 17 de febrero del 2004 con el depósito No. 20 FERM BP-08627.

EJEMPLO 9

Purificación de anticuerpo monoclonal de oculospanina antihumana

El hibridoma de ratón-ratón preparado en el ejemplo 8 se suspendió en medio HY a una concentración de 1×10^6 células/ml y se dejó reposar a 37°C en presencia de dióxido de carbono al 7% durante 3 días. Se centrifugó la solución de cultivo así obtenida, a 1600 rpm durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se purificó la IgG aproximadamente como sigue:

Regulador de pH de unión: pH 7.0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 20 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 20 mM).

10 Regulador de pH de elución: pH 3.0, glicina-HCl a 100 mM.

Regulador de pH de neutralización: pH 9.0, Tris-HCl a 1M.

Se tomó una alícuota requerida de portador de proteína G (fabricado por Amersham Biosciences). Después de que se hubo removido el etanol, se lavó dos veces la alícuota de portador de proteína G con agua ultrapura y se lavó una vez con el regulador de pH de unión. Se añadió el regulador de pH de unión al portador de alícuota de proteína G para hacer una suspensión de gel al 50%. Se añadió la suspensión de gel de proteína G al sobrenadante de hidridoma. Se hizo girar la mezcla resultante a 4°C durante 24 horas y se lavó tres veces con regulador de pH de unión. Después de lavar, se añadió el regulador de pH de elución para dejar eluir el anticuerpo. El producto de elución fue recibido por un tubo que contenía regulador de pH de neutralización en una cantidad de 1/10 del regulador de pH de elución. Se cargó el producto de elución sobre la porción superior de un ultrafiltro de un

15

20

tubo de muestra (Amicon Ultrafree-MC: fabricado por Millipore) y se centrifugó a 5000 x g, 4°C durante 20 minutos. Mientras se reunió el filtrado en la porción inferior del filtro, se añadió el producto de elución de tal manera que la cantidad de líquido en la porción superior del filtro fuera por lo menos de 50 µl.

- 5 Después de que se hubo añadido toda la cantidad de producto de elución, se añadió PBS (-) en el volumen el triple del producto de elución. De esta manera, se realizó el intercambio de reguladores de pH. Se trató el líquido que sobró en la porción superior del filtro, como la muestra de anticuerpo de oculospanina antihumana.

10

EJEMPLO 10

Actividad citotóxica

- Como índice de actividad biológica, se midió la actividad
- 15 citotóxica dependiente del anticuerpo. Se contó el número de células que expresan la oculospanina humana preparadas en el ejemplo 7, mediante el método de tinción con azul Tryphan y después de ello se ajustó la concentración de las células con medio RPMI 1640 (fabricado por Invitrogen, designado en lo sucesivo como "medio RPMI") que contenía suero bovino
- 20 fetal al 10% (fabricado por Moregate) a 8×10^5 células/0.4 ml. Se le añadió luego a las células 40 µl de Chromium-51 (cromato de sodio fabricado por Amersham Bioscience), se incubaron las células a 37°C en CO₂ al 5% durante 2 horas. A las células se les añadió 8 ml de medio RPMI, se agitaron y se

centrifugaron luego a 1,500 rpm durante 5 minutos. Se repitió esta operación de lavado otras dos veces. Las células que expresan la oculospanina humana, marcadas con Chromium-51, así obtenidas, se resuspendieron en 4 ml de medio RPMI y se sembraron en una placa con fondo redondo de 96 pozos, en la cual estaba presente ya 50 μ l de 5 μ l/ml de anticuerpo de oculospanina antihumana, de ratón, purificado, ajustado con medio RPMI, en una cantidad de 50 μ l (1×10^4 células) por pozo y se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos. En un pozo de control negativo o pozo de medición secundaria, se añadió medio RPMI en lugar del anticuerpo de oculospanina antihumana, de ratón, purificado.

Se prepararon células efectoras como se menciona a continuación. Se tomaron células de bazo de ratón BALB/c-nu/nu (hembra, 7 semanas de edad) de acuerdo con el método habitual. Luego se contó, el número de células mediante el método de tinción con azul Tryphan, se ajustó la concentración de las células con medio RPMI a 1.5×10^7 células/ml. Se sembraron las células a microplacas con fondo redondo de 96 pozos en una cantidad de 100 μ l (1.5×10^6 células/ml) por pozo, se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos y se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 4 horas. Al pozo de control positivo se le añadió Triton-X-100 al 2% en lugar de las células efectoras a fin de destruir completamente las células que expresan la oculospanina humana, marcadas con Chromium-51. Al pozo de medición secundaria se le añade medio RPMI en lugar de las células efectoras. Enseguida, se realizó la incubación durante 4 horas, se tomó 50 μ l del

sobrenadante del cultivo de cada uno de los pozos y se transfirió a una placa Luma de 96 pozos (fabricada por PerkinElmer). Se deshidrató la placa a 50°C durante una noche, se midió la cantidad de Chromium-51 en cada pozo mediante un contador de escintilación e microplacas (TopCourt NTX, 5 fabricado por PerkinElmer).

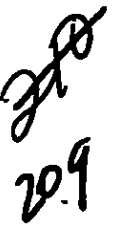
Se calculó el régimen al cual se indujo la muerte celular de acuerdo con la siguiente fórmula:

Régimen de inducción de la muerte celular (%) = (conteo de radioactividad para cada pozo de prueba – conteo secundario para el pozo de control negativo)/(conteo de radioactividad para el pozo de control positivo – conteo secundario para el pozo de control negativo) x 100. 10

En comparación con el control negativo, se confirmó que la adición que el anticuerpo de oculospanina antihumana de ratón, purificado (figura 5) indujo la muerte celular en las células que expresan la oculospanina humana. 15

Aplicabilidad industrial

En virtud de la presente invención, se halló que el nivel de expresión de la oculospanina humana en el melanoma es significativamente alto. De acuerdo con la presente invención se provee un método para detectar 20 el cáncer usando el gen de oculospanina humana y un equipo para detección de cáncer, y se provee además un anticuerpo que tiene actividad citotóxica



contra la oculospanina y una composición farmacéutica para tratar el cáncer que contiene el anticuerpo.

Texto libre de listados de secuencia

- 5 Secuencia ID No. 5: iniciador de sentido de PCR para la amplificación de oculospanina humana.

NOVEDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**

5 1.- Un anticuerpo caracterizado porque se une específicamente a la oculospanina humana y tiene actividad citotóxica contra una célula que expresa esa proteína.

 2.- Un anticuerpo caracterizado porque se une específicamente a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la
10 secuencia ID No. 2 del listado de secuencias y/o a una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia ID No. 4 del listado de secuencias y que tiene actividad citotóxica contra una célula que expresa la(s) proteína(s).

 3.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado además porque la actividad citotóxica es citotoxicidad mediada
15 por una célula dependiente del anticuerpo.

 4.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado además porque la actividad citotóxica es citotoxicidad dependiente de un complemento.

 5.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 ó 2,
20 caracterizado además porque la actividad citotóxica es citotoxicidad mediada por una célula dependiente de un complemento.

6.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado además porque la actividad citotóxica es la inducción de apoptosis.

5 7.- El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado además porque dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

8.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque dicho anticuerpo es producido por el hibridoma de ratón O3B8-2C9-4F3 (FERM BP-08627).

10 9.- El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado además porque dicho anticuerpo es humanizado.

10.- El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado además porque dicho anticuerpo es un
15 anticuerpo humano completo.

11.- El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado además porque dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG.

12.- Un método para detectar el cáncer, caracterizado porque
20 comprende los pasos 1) a 4) de: 1) extraer la fracción total de ARN de un espécimen tomado de un sujeto de prueba; 2) extraer la fracción total de ARN de un espécimen tomado de un sujeto sano; 3) medir el nivel de expresión de un polinucleótido representado por los siguientes a) o b) en las fracciones

totales de ARN derivadas de los pasos 1) y 2): a) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la secuencia ID No. 1 del listado de secuencias; b) un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la del polinucleótido de acuerdo con a) en condiciones astringentes; y 4) analizar la diferencia del nivel de expresión del polinucleótido entre las fracciones totales de ARN derivadas del paso 1) y del paso 2), medidas en el paso 3) y detectar así el cáncer en el sujeto de prueba del paso 1).

13.- Un método para detectar el cáncer, caracterizado porque comprende los pasos 1) a 3) de: 1) medir el nivel de expresión de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia ID No. 2 del listado de secuencias y/o el nivel de expresión de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia ID No. 4, en un espécimen tomado de un sujeto de prueba; 2) medir el nivel de expresión por lo menos de una de las proteínas de acuerdo con el paso 1) en un espécimen tomado de un sujeto sano; y 3) analizar una diferencia del nivel de expresión entre la proteína detectada en el paso 1) y la proteína detectada en el paso 2) y detectar así el cáncer en el sujeto de prueba.

14.- El método de conformidad con cualquier reivindicación 12 ó 13, caracterizado además porque el cáncer es cáncer de piel.

15.- El método de conformidad con cualquier reivindicación 12 ó 13, caracterizado además porque el cáncer es melanoma.

16.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12, 14 y 15, caracterizado además porque el nivel de expresión del polinucleótido se mide por Northern blotting, dot blotting, slot blotting, RT-PCR, ensayo de protección de ribonucleasa o un ensayo de inicio
5 transcripción (run-on).

17.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12, 14 y 15, caracterizado además porque el nivel de expresión del polinucleótido se mide usando un chip o arreglo de genes preparado de ADN que comprenden ADN complementarios derivados del
10 espécimen o de secuencias parciales de ADN complementarios.

18.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado además porque el nivel de expresión de la proteína se mide usando un anticuerpo o un ligando que se une específicamente a la proteína.

15 19.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado además porque el nivel de expresión de la proteína se mide por Western blotting, dot blotting, slot blotting o ensayo inmunosorbente enlazado con enzimas (método ELISA).

20 20.- Un equipo de detección para cáncer, caracterizado porque comprende por lo menos un componente seleccionado de los siguientes 1) a 3): 1) un iniciador de oligonucleótido de 15 a 30 bases contiguas de longitud capaz de amplificar específicamente un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos representada por la secuencia ID No. 1 del listado

de secuencias; 2) una sonda de polinucleótidos no menor que 15 nucleótidos contiguos capaces de hibridarse con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por las secuencias ID No. 1 del listado de secuencias en condiciones astringentes y detectar así el polinucleótido; 3) 5 un espécimen inmovilizado que tiene un polinucleótido que comprende las secuencias de nucleótidos representada por la secuencia ID No. 1 del listado de secuencias inmovilizada sobre el mismo.

21.- Un equipo de detección para cáncer, caracterizado porque comprende por lo menos uno de los siguientes componentes 1) y 2): 1) un 10 anticuerpo capaz de unirse específicamente a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia de ID No. 2 del listado de secuencias y/o una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia ID No. 4 del listado de secuencias y detectar así la(s) proteína(s); 2) un anticuerpo secundario capaz de unirse a un anticuerpo de acuerdo con 15 el 1) anterior.

22.- El equipo de conformidad con la reivindicación 20 ó 21, caracterizado además porque el cáncer es cáncer de piel.

23.- El equipo de conformidad con la reivindicación 20 ó 21, caracterizado además porque el cáncer es melanoma.

20 24.- Una composición farmacéutica para tratar el cáncer, caracterizada porque comprende por lo menos uno de los anticuerpos que se reclaman en la reivindicación 1 a 11.

25.- Una composición farmacéutica para tratar el cáncer, caracterizada porque comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos representada por la secuencia ID No. 1 del listado de secuencias o una secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos de la secuencia ID No. 1.

26.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24 ó 25, caracterizada además porque el cáncer es cáncer de piel.

27.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24 ó 25, caracterizada además porque el cáncer es melanoma.

COLO 01579 841 019 5

JDF/ID-143

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para detectar el
cáncer mediante el uso de un oncogén, a un método para clasificar un
5 compuesto activo útil para tratar y/o prevenir el cáncer y a una composición
farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, más
específicamente, la presente invención provee un método para detectar el
cáncer basado en la expresión del gen de oculospanina humana como
marcador y una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo capaz
10 de reconocer específicamente la oculospanina humana y que tiene actividad
citotóxica contra las células de cáncer.

15

20

MC*PM*JQ*PMO*GC/aom*gcg*nsh*dvb*kra*ecj*mmf

P05/1453F

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED

5 <120> Anticuerpo contra antígeno específico de tumor como objetivo

<130> FP0408

<140>

10 <141>

<150> JP2003-063648

<151> 2003-03-10

15 <160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1065

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1065)

<223> Inventor: Ichikawa, Kimihisa; Takahashi, shu; Agatsuma Toshinori;

5 Fukuchi, Keisuke; Hirai Takehiro

<400> 1

atg gag gag ggg gag agg agc ccc tta ctg tcc cag gaa act gca ggc 48

Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly

1 5 10 15

10

cag aag ccc ctc tct gtg cac agg cca ccc acc tca ggc tgc cta ggt 96

Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly

20 25 30

15 cca gtg ccc agg gag gac cag gcg gag gcc tgg ggc tgc agc tgc tgt 144

Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys Cys

35 40 45

ccc ccg gag acc aag cac cag gcc ttg agt ggc act ccc aag aaa gga 192

20 Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys Gly

50 55 60

cca gcc cct tcc ctc tcc cca ggg agc agc tgc gtc aag tat ctg atc 240

~~210~~
219

Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu Ile

65 70 75 80

ttc ctc tcc aac ttc ccc ttc tcc ctg ctg ggg ctg ctg gcc ctg gcc 288

5 Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala

85 90 95

atc ggg ctc tgg ggc ctg gct gtc aag ggg tct ctg gga agt gat ctg 336

Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp Leu

10 100 105 110

ggg ggg ccc ctg ccc aca gac ccc atg ctg ggg ctg gca ctg gga ggg 384

Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly Gly

115 120 125

15

ctg gtg gtc agc gca gcg agc ctg gct ggc tgc ctg ggc gcc ctc tgc 432

Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu Cys

130 135 140

20 gag aac acc tgc ctg tta cgt ggc ttc tcc ggg ggc atc ctt gcc ttc 480

Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala Phe

145 150 155 160

220

ctg gtg ctt gag gcc gtg gcg ggg gcc ctg gtg gtg gcc ctc tgg ggc 528

Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp Gly

165

170

175

5 ccg ctg caa gac agc ctg gag cac acc ctg cgt gtg gcc atc gcc cac 576

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

180

185

190

tac cag gac gac cca gac ctg cgc ttc ctc ctc gac caa gtc cag ctc 624

10 Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu

195

200

205

ggg ctg agg tgc tgc gga gct gcc tcc tac cag gac tgg cag cag aac 672

Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln Asn

15

210

215

220

ctg tac ttt aac tgc agc tcc ccc ggg gtg cag gcc tgc agc ctt ccc 720

Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu Pro

225

230

235

240

20

gcc tcc tgc tgc atc gac ccc cgc gaa gat gga gcc tct gtc aac gac 768

Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn Asp

245

250

255

221

cag tgc ggc ttc ggg gtc ctg cgc ctg gat gcg gac gca gct cag aga 816

Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln Arg

260 265 270

5

gtg gtg tac ctg gag ggc tgc ggc ccg ccg ctc cgg cgg tgg ctg cgc 864

Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu Arg

275 280 285

10

gcg aac ctg gct gcc tcg ggc ggc tac gca atc gcg gtg gtg ctg ctg 912

Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu Leu

290 295 300

cag ggc gcg gag ctc ctg ctg gcc gcc cgg cta ctc ggg gcc ctc gct 960

15

Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu Ala

305 310 315 320

gcc cgc agt ggg gcg gcg tac ggc ccc gga gcg cgc ggg gag gac cgc 1008

Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala Arg Gly Glu Asp Arg

20

325 330 335

gct ggc ccc cag agc ccc agc ccc ggc gcc ccg ccc gct gcc aaa ccc 1056

Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys Pro

222

340 345 350

gcc cgg ggc 1065

Ala Arg Gly

5 355

<210> 2

<211> 355

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly

15 1 5 10 15

Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly

20 25 30

20 Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys Cys

35 40 45

Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys Gly

223

	50	55	60	
	Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu Ile			
	65	70	75	80
5	Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala			
	85	90	95	
	Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp Leu			
10	100	105	110	
	Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly Gly			
	115	120	125	
15	Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu Cys			
	130	135	140	
	Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala Phe			
	145	150	155	160
20	Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp Gly			
	165	170	175	

224

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

180

185

190

Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu

5

195

200

205

Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln Asn

210

215

220

10

Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu Pro

225

230

235

240

Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn Asp

245

250

255

15

Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln Arg

260

265

270

Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu Arg

20

275

280

285

Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu Leu

290

295

300

225

Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu Ala

305 310 315 320

5 Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala Arg Gly Glu Asp Arg

 325 330 335

Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys Pro

 340 345 350

10

Ala Arg Gly

355

15

- <210> 3
- <211> 1601
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

20

- <220>
- <221> CDS
- <222> (65)..(1129)

<400> 3

cacagaggag ccagegaacc tctcccggcg cctgttctgg gggctttctg ttccagcgtc 60

5 aagg atg gag gag ggg gag agg agc ccc tta ctg tcc cag gaa act gca 109

Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala

1 5 10 15

ggc cag aag ccc ctc tct gtg cac agg cca ccc acc tca ggc tgc cta 157

10 Gly Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu

20 25 30

ggt cca gtg ccc agg gag gac cag gcg gag gcc tgg ggc tgc agc tgc 205

Gly Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys

15 35 40 45

tgt ccc ccg gag acc aag cac cag gcc ttg agt ggc act ccc aag aaa 253

Cys Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys

50 55 60

20

gga cca gcc cct tcc ctc tcc cca ggg agc agc tgc gtc aag tat ctg 301

Gly Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu

65 70 75

atc ttc ctc tcc aac ttc ccc ttc tcc ctg ctg ggg ctg ctg gcc ctg 349

Ile Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu

80 85 90 95

5

gcc atc ggg ctc tgg ggc ctg gct gtc aag ggg tct ctg gga agt gat 397

Ala Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp

100 105 110

10

ctg ggg ggg ccc ctg ccc aca gac ccc atg ctg ggg ctg gca ctg gga 445

Leu Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly

115 120 125

ggg ctg gtg gtc agc gca gcg agc ctg gct ggc tgc ctg ggc gcc ctc 493

15 Gly Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu

130 135 140

tgc gag aac acc tgc ctg tta cgt ggc ttc tcc ggg ggc atc ctt gcc 541

Cys Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala

20 145 150 155

ttc ctg gtg ctt gag gcc gtg gcg ggg gcc ctg gtg gtg gcc ctc tgg 589

Phe Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp

160 165 170 175

ggc ccg ctg caa gac agc ctg gag cac acc ctg cgt gtg gcc atc gcc 637

Gly Pro Leu Gln Asp Ser Leu Glu His Thr Leu Arg Val Ala Ile Ala

5 180 185 190

cac tac cag gac gac cca gac ctg cgc ttc ctc ctc gac caa gtc cag 685

His Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln

195 200 205

10

ctc ggg ctg agg tgc tgc gga gct gcc tcc tac cag gac tgg cag cag 733

Leu Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln

210 215 220

15 aac ctg tac ttt aac tgc agc tcc ccc ggg gtg cag gcc tgc agc ctt 781

Asn Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu

225 230 235

ccc gcc tcc tgc tgc atc gac ccc cgc gaa gat gga gcc tct gtc aac 829

20 Pro Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn

240 245 250 255

gac cag tgc ggc ttc ggg gtc ctg cgc ctg gat gcg gac gca gct cag 877

228
229

Asp Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln

260 265 270

aga gtg gtg tac ctg gag ggc tgc ggc ccg ccg ctc cgg cgg tgg ctg 925

5 Arg Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu

275 280 285

cgc gcg aac ctg gct gcc tgc ggc ggc tac gca atc gcg gtg gtg ctg 973

Arg Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu

10 290 295 300

ctg cag ggg gcg gag ctc ctg ctg gcc gcc ccg cta ctc ggg gcc ctc 1021

Leu Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu

305 310 315

15

gct gcc cgc agt ggg gcg gcg tac ggc ccc gga gcg cac ggg gag gac 1069

Ala Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala His Gly Glu Asp

320 325 330 335

20 cgc gct ggc ccc cag agc ccc agc ccc ggc gcc ccg ccc gct gcc aaa 1117

Arg Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys

340 345 350

230

ccc gcc cgg ggc tga gcgcacgccc cgaggtccga gaccgccacg cacagggata 1172

Pro Ala Arg Gly

355

5 cagggggcgc ctccgcccg ctaaaaagcg ctgcctgcgc cgccgccgcc gcctgatttc 1232

gctcgggctt cgggtgactt cgccgcagga cctaccagc tcgtcactt cgctcgtcc 1292

gcgtcccca tgccagcccc caacgcaggg cgcccgcgga agccacggga ctggcgggag 1352

10

gagcacgcgg ggccggagga aatcctggag ctgacctca cctccgagcc cccactcca 1412

ccccagccgc acagticca cctcctggca cctccctccc ctggggccgc cacccttct 1472

15 gggctcgtga tggaggagct aaggtccagg cctctccctc ccgagtgcatt tttggggag 1532

atagtaaatg tttattcgg gtgtatcatt catacagtaa agacaccaat cttcaaaaaa 1592

aaaaaaaaa

1601

20

<210> 4

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

5 Met Glu Glu Gly Glu Arg Ser Pro Leu Leu Ser Gln Glu Thr Ala Gly
1 5 10 15
Gln Lys Pro Leu Ser Val His Arg Pro Pro Thr Ser Gly Cys Leu Gly
20 25 30
Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln Ala Glu Ala Trp Gly Cys Ser Cys Cys
10 35 40 45
Pro Pro Glu Thr Lys His Gln Ala Leu Ser Gly Thr Pro Lys Lys Gly
50 55 60
Pro Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Cys Val Lys Tyr Leu Ile
65 70 75 80
15 Phe Leu Ser Asn Phe Pro Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala
85 90 95
Ile Gly Leu Trp Gly Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Gly Ser Asp Leu
100 105 110
Gly Gly Pro Leu Pro Thr Asp Pro Met Leu Gly Leu Ala Leu Gly Gly
20 115 120 125
Leu Val Val Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly Ala Leu Cys
130 135 140
Glu Asn Thr Cys Leu Leu Arg Gly Phe Ser Gly Gly Ile Leu Ala Phe

232

145 150 155 160

Leu Val Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Val Val Ala Leu Trp Gly

165 170 175

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

5 180 185 190

Tyr Gln Asp Asp Pro Asp Leu Arg Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu

195 200 205

Gly Leu Arg Cys Cys Gly Ala Ala Ser Tyr Gln Asp Trp Gln Gln Asn

210 215 220

10 Leu Tyr Phe Asn Cys Ser Ser Pro Gly Val Gln Ala Cys Ser Leu Pro

225 230 235 240

Ala Ser Cys Cys Ile Asp Pro Arg Glu Asp Gly Ala Ser Val Asn Asp

245 250 255

Gln Cys Gly Phe Gly Val Leu Arg Leu Asp Ala Asp Ala Ala Gln Arg

15 260 265 270

Val Val Tyr Leu Glu Gly Cys Gly Pro Pro Leu Arg Arg Trp Leu Arg

275 280 285

Ala Asn Leu Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Ala Ile Ala Val Val Leu Leu

290 295 300

20 Gln Gly Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Arg Leu Leu Gly Ala Leu Ala

305 310 315 320

Ala Arg Ser Gly Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ala His Gly Glu Asp Arg

325 330 335

233

Ala Gly Pro Gln Ser Pro Ser Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala Lys Pro

340 345 350

Ala Arg Gly

355

5

<210> 5

<211> 27

10

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: sentido de PCR

15

iniciador para OCSF

<400> 5

caccatggag gagggggaga ggagccc

27

20

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

27.5
23.4

<213> Homo sapiens

<400> 6

gccccgggcg ggtttggcag cgg

23

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1A

Gene Expression level (Log.) — Nivel de expresión de genes

5 (Log.)

(Average Difference (LN)) — (Diferencia media (LN))

Melanocytes — Melanocitos

Lymphoblast cells — Células linfoblásticas

Glia cells — Células gliales

10

Epithelial cells — Células epiteliales

Figura 1B

Gene Expression level (Log.) — Nivel de expresión de genes

(Log.)

15

(Average Difference (LN)) — (Diferencia media (LN))

Normal skin tissue — Tejido dérmico normal

Malignant melanoma derived from lymph node — Melanoma
maligno derivado de nódulo linfático

20

Figura 2A

Gene Expression level (Log.) — Nivel de expresión de genes

(Log.)

(Average Difference (LN)) — (Diferencia media (LN))

Normal skin tissue — Tejido dérmico normal

Malignant melanoma derived from skin tissue — Melanoma
maligno derivado de tejido dérmico

5 Figura 2B

Gene Expression level (Log.) — Nivel de expresión de genes
(Log.)

(Average Difference (LN)) — (Diferencia media (LN))

Normal skin tissue — Tejido dérmico normal

10 Malignant melanoma derived from lymph node — Melanoma
maligno derivado de nódulo linfático

Figura 3

Gene Expression level (Log.) — Nivel de expresión de genes
15 (Log.)

(Average Difference (LN)) — (Diferencia media (LN))

Normal tissue lymph nodes — Nódulos linfáticos tisulares
normales

Malignant melanoma derived from lymph node — Melanoma
20 maligno derivado de nódulo linfático

Figura 4

Lane 1: pDEST40 NM_031945 transformed cells — Carril 1:

Células transformadas por pDEST40 NM_031945

Lane 2: Control untransformed cells — Células no transformadas

5 de control

Figura 5

% Specific ^{51}Cr release — % de liberación de ^{51}Cr específica

Anti-OCSP antibody — Anticuerpo anti-OCSP

10 Cont. migG — migG de control

None — Ninguno

Anticuerpo; 5 $\mu\text{g/ml}$ — Anticuerpo; 5 $\mu\text{g/ml}$

238
~~240~~

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 67,464
FECHA : SEPTIEMBRE 5 DE 2005

SUPLEMENTARIA Y COMENTOS

~~Indirizzo : 160914Z GERMANY Folios: 2m~~

~~-cha (WFO): 2805-09-09 17:25Z~~

~~Transit : 011 PCI-PHYEN 379 PAGE MAIL 411 PRESENTING~~

~~Secundencia: 2805 DIVISION DE MARCOS OPERACIONES~~

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36494405	05/09/2005	48,923,640.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Qdo 01579-841-019-5

239 241

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Indicación : 000001402 0000000000
Fecha (ANO): 2005-09-09 17:29:02
Trámite : 011 PCY-PATENI 379 FASE NÚM 411 PRESENCIAL
Recepción: 2005 DIVISION DE NUEVAS INVENCIÓNES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que Incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable: 

Fecha:

242
240

REPUBLICA DE COLOMBIA -
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
SANKYO COMPANY LIMITED

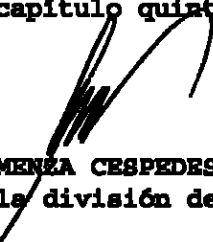
REFERENCIA	Radicación No.	5 91402
	Solicitud internacional	JP2004/003048
	Fecha inicio fase nacional	10/10/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	0794

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 23.06.2005
adpa1


ॐ नमो भगवते वासुदेवाय