

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-512809

(P2004-512809A)

(43) 公表日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/39	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 139 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-509513 (P2001-509513)	(71) 出願人	500357817
(86) (22) 出願日	平成12年7月12日 (2000. 7. 12)		ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年1月15日 (2002. 1. 15)		ステイツ オブ アメリカ、 リプリゼ
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/019039		ンテッド バイ ザ セクレタリー オブ
(87) 国際公開番号	W02001/004309		ザ デパートメント オブ ヘルス ア
(87) 国際公開日	平成13年1月18日 (2001. 1. 18)		ンド ヒューマン サービシーズ
(31) 優先権主張番号	60/143, 560		アメリカ合衆国 メリーランド 2089
(32) 優先日	平成11年7月13日 (1999. 7. 13)		2, ベセスダ (番地なし)
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/157, 471		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成11年10月1日 (1999. 10. 1)	(74) 代理人	100108774
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 橋本 一憲

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞受容体 γ 代替リーディングフレームタンパク質、(TARP) およびその用途

(57) 【要約】

本発明は、前立腺上皮細胞および多数の乳癌細胞のTCR 転写物由来の配列を含有する核酸と、そのような配列の翻訳により発現されるT細胞受容体 の代替リーディングフレームタンパク質 (Alternate Reading frame Protein) (「TARP」) とを提供する。 TARP から作製されるワクチンは、前立腺癌細胞および多数の乳癌の細胞を含む、そのタンパク質が発現される細胞に対する免疫応答を高めるのに有用である。本発明はまた、前立腺癌およびTARPを発現する乳癌の存在を診断するための方法と、被験者にTARPおよびTARPをコードする核酸を投与する方法とを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T C R 代替リーディングフレームタンパク質 (A l t e r n a t e R e a d i n g f r a m e P r o t e i n) (「 T A R P 」)、その免疫原性の断片、T A R P と少なくとも 9 0 % 配列の同一性を有し、かつ T A R P を特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチド、および T A R P と少なくとも 9 0 % 配列の同一性を有し、かつ処理されて主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されたとき、T A R P を発現する細胞に対する T リンパ球を活性化するポリペプチドからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

ポリペプチドが T A R P の配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

ポリペプチドが、T A R P の免疫原性断片の配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

ポリペプチドが T A R P と少なくとも 9 0 % 配列の同一性を有し、かつ T A R P を特異的に認識する抗体によって特異的に認識される、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

ポリペプチドが T A R P と少なくとも 9 0 % 配列の同一性を有し、かつ処理されて主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されたとき、T A R P を発現する細胞に対する T リンパ球を活性化する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 2 に記載のポリペプチドと薬学的に許容されうる担体とを含む組成物。

【請求項 7】

請求項 3 に記載のポリペプチドと薬学的に許容されうる担体とを含む組成物。

【請求項 8】

請求項 4 に記載のポリペプチドと薬学的に許容されうる担体とを含む組成物。

【請求項 9】

請求項 5 に記載のポリペプチドと薬学的に許容されうる担体とを含む組成物。

【請求項 10】

T C R 代替リーディングフレームタンパク質 (A l t e r n a t e R e a d i n g f r a m e P r o t e i n) (「 T A R P 」) のアミノ酸配列を有するポリペプチド、その免疫原性の断片、T A R P と少なくとも 9 0 % 配列の同一性を有し、かつ T A R P を特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチド、および T A R P と少なくとも 9 0 % 配列の同一性を有し、かつ処理されて主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されたとき、T A R P を発現する細胞に対する T リンパ球を活性化するポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された組換え核酸分子。

【請求項 11】

T A R P の配列を含む、請求項 10 に記載の単離された組換え核酸分子。

【請求項 12】

ポリペプチドが T A R P の免疫原性断片である、請求項 10 に記載の単離された組換え核酸分子。

【請求項 13】

ポリペプチドが T A R P と少なくとも 9 0 % 配列の同一性を有し、かつ T A R P を特異的に認識する抗体によって特異的に認識される、請求項 10 に記載の単離された組換え核酸分子。

【請求項 14】

ポリペプチドが T A R P と少なくとも 9 0 % 配列の同一性を有し、かつ処理されて主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されたとき、T A R P を発現する細胞に対する T

10

20

30

40

50

リンパ球を活性化する、請求項 10 に記載の単離された組換え核酸分子。

【請求項 15】

ヌクレオチド配列に機能的に結合するプロモーターを含む発現ベクターである、請求項 10 に記載の単離された組換え核酸分子。

【請求項 16】

ヌクレオチド配列が TCR 代替リーディングフレームタンパク質 (Alternate Reading Frame Protein) (「TARP」) のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項 15 に記載の単離された組換え核酸分子。

【請求項 17】

該ヌクレオチド配列が、TARP の免疫原性断片のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項 15 に記載の単離された組換え核酸分子。 10

【請求項 18】

ヌクレオチド配列が TARP と少なくとも 90% 配列の同一性を有し、かつ TARP を特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチドをコードする、請求項 12 に記載の単離された組換え核酸分子。

【請求項 19】

ヌクレオチド配列が、TARP と少なくとも 90% 配列の同一性を有し、処理されて主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されたとき、TARP を発現する細胞に対する Tリンパ球を活性化するポリペプチドをコードする、請求項 12 に記載の単離された組換え核酸。 20

【請求項 20】

TCR 代替リーディングフレームタンパク質 (Alternate Reading Frame Protein) (「TARP」) のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド、その免疫原性の断片、TARP と少なくとも 90% 配列の同一性を有し、かつ TARP を特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチドおよび TARP と少なくとも 90% 配列の同一性を有し、かつ処理されて主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されたとき、TARP を発現する細胞に対する Tリンパ球を活性化するポリペプチド、これらのポリペプチドの 1つをコードする単離された核酸、TARP のエピトープを含むポリペプチドを標識した抗原提示細胞、ならびに TARP、その免疫原性の断片、TARP と少なくとも 90% 配列の同一性を有し、TARP を特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチド、または TARP と少なくとも 90% 配列の同一性を有し、処理されて主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されたとき、TARP を発現する細胞に対する Tリンパ球を活性化するポリペプチドに対してインビトロにおいて感作した細胞からなる群から選択される組成物を被験者に投与する段階を含む方法。 30

【請求項 21】

TARP またはその免疫原性断片を被験者に投与する段階を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

ポリペプチドが TARP と少なくとも 90% の配列の同一性を有し、かつ TARP を特異的に認識する抗体によって特異的に認識される、請求項 20 に記載の方法。 40

【請求項 23】

ポリペプチドが TARP と少なくとも 90% 配列の同一性を有し、かつ処理されて MHC 分子と共に抗原提示細胞によって提示されるとき、TARP を発現する細胞に対する Tリンパ球を活性化する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

投与が、前立腺癌罹患被験者に対するものである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 25】

投与が、乳癌罹患被験者に対するものである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 26】

投与が、乳癌と診断された経験のない女性被験者に対するものである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 27】

投与が、TARP タンパク質のエピトープに対して CD8 + 細胞をインビトロ感作する段階と、被験者に感作細胞を投与する段階とを含む請求項 20 に記載の方法。

【請求項 28】

非特異的免疫アジュバント、微生物の細胞内産物および画分、ハプテン、免疫原性タンパク質、免疫調節物質、インターフェロン、胸腺ホルモンおよびコロニー刺激因子から選択される免疫アジュバントを被験者に同時投与する段階をさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 29】

TARP のエピトープを含むポリペプチドで標識した抗原提示細胞を投与する段階を含む請求項 20 に記載の方法。

【請求項 30】

TARP のエピトープを含むポリペプチドをコードする核酸配列を投与する段階であって、核酸が組換えウイルス内にある請求項 20 に記載の方法。

【請求項 31】

TARP タンパク質のエピトープを含むポリペプチドをコードする核酸配列を投与する段階を含む請求項 20 に記載の方法。

【請求項 32】

TARP タンパク質のエピトープを含むポリペプチドを発現する発現ベクターを投与する段階を含み、該発現ベクターが組換え微生物細胞内にある、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 33】

TARP タンパク質のエピトープを含むポリペプチドを発現する発現ベクターで被験者を免疫化する段階を含み、該発現ベクターが自己の組換え細胞内にある、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 34】

CD8 + 細胞が Tc 細胞である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 35】

Tc 細胞が腫瘍浸潤性リンパ球である、請求項 34 に記載の方法。

30

【請求項 36】

男性において上皮起源の前立腺細胞を、または女性において乳癌細胞を検出するための方法であって、男性由来の細胞または女性由来の細胞において TARP をコードする核酸転写物を検出する段階、ならびに転写物の翻訳によって作製される TARP を検出する段階を含み、それによって該男性由来の細胞における転写物またはタンパク質の検出が該細胞を前立腺上皮細胞と同定し、該女性由来の細胞における転写物またはタンパク質の検出が該細胞を乳癌細胞と同定する方法。

【請求項 37】

転写物を検出する段階を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

タンパク質を検出する段階を含む、請求項 36 に記載の方法。

40

【請求項 39】

ハイブリダイゼーション条件下において転写物に特異的にハイブリダイズする核酸プローブを細胞由来の RNA に接触させる段階と、ハイブリダイゼーションを検出する段階とを含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

細胞を粉碎して、細胞内容物の一部に、タンパク質に特異的に結合する標的部分と検出可能な標識とを含むキメラ分子を接触させる段階と、タンパク質に結合した標識を検出する段階とを含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

50

細胞がリンパ節から採取される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】

細胞が乳房生体組織検査試料から採取される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 43】

T C R 代替リーディングフレームタンパク質 (A l t e r n a t e R e a d i n g f r a m e P r o t e i n) のエピトープに特異的に結合する抗体。

【請求項 44】

細胞において T A R P のレベルを調節する方法であって、T A R P をコードする核酸を特異的に切断するリボザイム、T A R P をコードする核酸に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド、T A R P をコードする核酸に特異的に結合する D N A 結合タンパク質およびプロモーターに機能的に結合する T A R P をコードする核酸からなる群から選択される組成物を該細胞に導入する段階を含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、1999年7月13日に提出された米国仮出願番号第60/143,560号および1999年10月1日に提出された米国暫定出願番号第60/157,471号の優先権を主張する。これらの出願の両者の内容は参照として本明細書に組み入れられている。

【0002】

連邦政府の援助による研究および開発に基づいて実施された発明の権利に関する陳述適用なし。

20

【0003】

発明の背景

本発明は、分子生物学と、医学的な診断および治療とに関する。

【0004】

前立腺癌はヒトの癌として最も一般的なもので、ヒトにおける癌の死亡原因の第3位である。この疾患を早期検出し、治療する方法により前立腺癌の死亡率を低下すると思われる。悪性細胞によって発現されるが、悪性細胞以外の細胞によってはほとんど発現されないタンパク質である腫瘍関連タンパク質は検出および治療の標的として有用である。前立腺特異的抗原 (P S A) を含む前立腺癌に関連するいくつかのタンパク質が同定されている。

30

【0005】

免疫治療は癌に対する強力な新しい武器である。免疫治療は、標的抗原の産生に基づいて癌細胞に対する免疫応答を誘発することに関係する。癌細胞抗原に対する液性免疫応答も用途を有するが、癌細胞に対する細胞性免疫応答を誘発することが好ましい。細胞性免疫応答に基づいた免疫治療は、特定の抗原決定因子を産生する細胞に対する細胞性応答を形成することに関係する。癌細胞は、免疫治療の標的となりうる種々のタンパク質を産生する。ある種の癌は、例えば、突然変異の結果として、免疫原性である新規タンパク質を産生する。しかし、研究者達はまた、癌細胞の突然変異していないタンパク質を特異的に認識する腫瘍浸潤性リンパ球も発見した。例えば、ローゼンバーグ (R o s e n b e r g) らは、腫瘍浸潤性リンパ球は、正常なメラニン形成細胞および悪性の黒色腫によって産生されるタンパク質 M A R T - 1 の抗原性決定因子を標的化し、認識することを示している。さらに、I型MHC分子 (特に、H L A A 2 のエピトープ) に結合する M A R T - 1 またはそのペプチドに対して向けられる能動的または受動的免疫治療により、M A R T - 1 を産生する正常な細胞と同様に黒色腫細胞が破壊される。カワカミ (Y . K a w a k a m i) ら、J . I m m u n o l . 2 1 : 2 3 7 (1 9 9 8) 。

40

【0006】

新規癌抗原は、免疫系が非自己タンパク質としてそれらを認識するので、免疫応答を誘発すると期待される。しかし、免疫系は自己タンパク質に耐性 (t o l e r a n c e) を形

50

成するので、突然変異していない自己タンパク質に対して免疫系が免疫応答を誘発する能力は驚くべきことである。この免疫応答は、耐性または免疫応答を誘発するほど十分には通常免疫系に暴露されていない抗原性決定因子に対して向けられると考えられている。しかし、癌では、これらの決定因子は免疫系による検出を免れない。これは、I型MHC分子による決定因子の提示の増加による場合がある。

【0007】

細胞性免疫応答は主要組織適合性抗原複合体分子の活動を誘発する。ヒトでは、この複合体は「HLA」(ヒト白血球抗原)複合体と呼ばれる。マウスでは、それは「H-2」複合体と呼ばれる。主要組織適合性抗原複合体は3つのクラスのタンパク質、I型MHC、II型MHCおよびIII型MHCを含む。I型MHC分子はほとんど全ての有核細胞の表面において提示されている。それらはTc細胞(CD8+)に抗原ペプチドを提示する。ヒトでは3つのI型MHC遺伝子座、HLA A、HLA BおよびHLA Cが存在する。各遺伝子座は多型性が高い。従って、1人の人が6種類までの異なる種類のHLA分子を細胞表面に有することがある。II型MHCタンパク質は主に、TH細胞に処理済みの抗原ペプチドを提示するマクロファージ、樹状細胞およびB細胞などの抗原提示細胞上で発現される。ヒトには3つのII型MHC遺伝子座、HLA DP、HLA DQおよびHLA DRが存在する。III型MHCタンパク質は種々の免疫過程に関連し、可溶性血清タンパク質、補体系の成分および腫瘍壊死因子を含む。クビイ(J. Kuby)、第9章、IMMUNOLOGY, 第3版、W. H. FreemanおよびCompany, New York(1997)。

10

20

【0008】

癌細胞ならびに健康な細胞では、I型MHC分子はTc細胞に提示するための内因性タンパク質由来のエピトープを提示する。HLA A、HLA BおよびHLA C分子は、特定の固定残基を有する鎖長がアミノ酸約8~10のペプチドに結合する。I型HLA分子によって認識される固定残基はHLA分子の特定の対立遺伝子形態に依存する。CD8+T細胞は、細胞上で特定のHLA分子によって提示されるとき、特定のエピトープを認識するT細胞受容体を保有する。抗原提示細胞によって刺激されて細胞障害性Tリンパ球になるTc細胞が、このようなHLA-ペプチド複合体を保有する細胞と接触すると、CTLは細胞と結合体を形成して細胞を破壊する。

【0009】

I型MHC分子によるペプチドの提示は、内因的に産生されるタンパク質のプロテアソームによるペプチドへの切断、ERおよびゴルジ装置による処理、ペプチドのアンカー残基によるI型MHC分子の間隙への結合および細胞表面における最終的な提示を誘発する。とりわけ、特定のアンカー残基に応じて、ある種のペプチドは他よりも特定のHLA分子により強く結合することがある。十分に結合するペプチドは「優先的な」エピトープと呼ばれるが、弱く結合するものは「亜優先的な」または「潜在的な」エピトープと呼ばれる。自己タンパク質または異種タンパク質の優先的なエピトープは強力な耐性または免疫応答を誘発する。亜優先的なまたは潜在的なエピトープは弱い応答を生ずるかまたは応答を全く生じない。HLAに対して優先的なエピトープによってより強力に結合すると、細胞表面上により密に提示され、免疫細胞と反応する機会がより大きくなり、免疫応答または耐性誘発する可能性がより高くなることが仮定されている。

30

40

【0010】

研究は、自己タンパク質であるMART-1タンパク質の場合には、免疫系は亜優先的または潜在的なエピトープに対して最も大きいCTL応答を生ずることを示している。カワカミ(Y. Kawakami)ら、1997 Immunol. Res. 16: 313。癌細胞では、亜優先的または潜在的なエピトープは正常よりかなりより密にまたはより大量に提示され、結果的に、免疫系はこれらの以前には検出されなかったエピトープに遭遇して、それらを異種として認識し、それらに対して免疫応答を生ずることが起こる。理由は何であっても、そのタンパク質を産生する細胞に対する免疫応答を誘発する手段として自己タンパク質の大量の亜優先的または潜在的なエピトープに免疫系を暴露させるこ

50

とが、癌の免疫治療の主要な要素である。当然のことながら、自己タンパク質に免疫応答を誘発することにより癌細胞および健康な細胞が共に破壊される。従って、このような免疫治療を成功させるためには、健康な細胞は生命にとって必須でないかまたは他の治療によって置換可能な機能を持たなければならない。前立腺癌および乳癌の場合には、前立腺または乳房それぞれの外科的な切除が頻度の高い治療的介入である。この場合には、前立腺または乳房抗原を示す組織のほとんどまたは全てが腫瘍細胞である。

【0011】

発明の開示

本発明者らは、健康および癌性の両方の上皮起源の前立腺細胞が転移していないTCR遺伝子の一部を転写することを発見した。インビトロでは、この転写物は2種のタンパク質を生じ、その一方は切断された形態のTCRであるが、本発明者らの研究は、驚くべきことに、インビボでは、発現されるタンパク質はTCRタンパク質ではなく、代替リーディングフレーム(alternate reading frame)から発現されるタンパク質であることを示している。従って、タンパク質はTCR代替リーディングフレームタンパク質(Alternate Reading Frame Protein)または「TARP」と命名されている。

10

【0012】

本発明者らは、TARPは上皮起源前立腺細胞および前立腺癌細胞において発現されていることを発見した。驚くべきことに、本発明者らは、同じタンパク質が多数の乳癌細胞において発現されていることを発見した。従って、TARPは、TARPを発現する前立腺癌細胞および乳癌細胞のマーカーとして(「TARPを発現する乳癌」)および免疫治療の基礎として有用である。本発明は単離された形態または組換え形態の核酸およびタンパク質を提供する。本発明者らはこのタンパク質が多数の乳癌細胞において発現されていることを本明細書において見いだしたが、それは前立腺細胞において初めて同定され、以下には前立腺特異的(「PS」)TCRと呼ばれることがある。

20

【0013】

一局面において、本発明は、TCR代替リーディングフレームタンパク質(Alternate Reading Frame Protein)(「TARP」)のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。本発明はさらに、TARPの免疫原性断片(全長のTARPを特異的に認識し、結合する抗体を形成することができる、またはT細胞を活性化してTARPを発現する細胞を認識させる断片)、T細胞と少なくとも90%配列の同一性を有し、TARPを特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチドおよびTARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、処理されて主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されるとき、TARPを発現する細胞に対するTリンパ球を活性化するポリペプチドを提供する。本発明はさらに、TARP、その免疫原性断片または少なくとも90%配列の同一性を有し、上記の機能的な基準を満たすペプチドの形態で薬学的に許容されうる担体中に存在する組成物を提供する。

30

【0014】

別の組の態様において、本発明は、TCR代替リーディングフレームタンパク質(Alternate Reading Frame Protein)(「TARP」)のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、その断片をコードする、TARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、TARPを特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチドをコードする、またはTARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、処理されて、主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されるとき、TARPを発現する細胞に対するTリンパ球を活性化するポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子を提供する。

40

【0015】

さらに別の一連の態様において、本発明は、被験者に組成物を投与する段階であって、組成物が、TCR代替リーディングフレームタンパク質(Alternate Reading Frame Protein)(「TARP」)のアミノ酸配列を有する単離され

50

たポリペプチド、その免疫原性断片、TARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、TARPを特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチドおよびTARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、処理されて、主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されるとき、TARPを発現する細胞に対するTリンパ球を活性化するポリペプチドからなる群から選択される段階を含む方法を提供する。

【0016】

本発明はさらに、被験者に組成物を投与する方法であって、組成物が、TARP、その免疫原性断片、TARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、TARPを特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチドおよびTARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、処理されて、主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されるとき、TARPを発現する細胞に対するTリンパ球を活性化するポリペプチドをコードする、単離された核酸からなる群から選択される方法を提供する。

10

【0017】

本発明はさらに、被験者に組成物を投与する方法であって、組成物がTARPのエピトープを含むポリペプチドで標識した抗原提示細胞を含む方法を提供する。さらに、本発明は被験者に組成物を投与する方法であって、組成物が、インビトロにおいてTARP、その免疫原性断片、TARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、TARPを特異的に認識する抗体によって特異的に認識されるポリペプチドまたはTARPと少なくとも90%配列の同一性を有し、処理されて、主要組織適合性抗原複合体分子に関連して提示されるとき、TARPを発現する細胞に対するTリンパ球を活性化するポリペプチドに対して、感作された細胞を含む方法を提供する。

20

【0018】

上記の方法の組成物は、前立腺癌に罹患している被験者、乳癌に罹患している被験者または乳癌と診断された経験のない女性被験者に投与することができる。

【0019】

本発明の方法はさらに、インビトロにおいてTARPのエピトープに対してCD8+細胞を感作する段階と、被験者に感作した細胞を投与する段階とを含む。CD8+細胞はTc細胞であってもよい。いくつかの態様において、Tc細胞は腫瘍浸潤性リンパ球であってもよい。

【0020】

また、本発明の方法は、被験者に、非特異的免疫アジュバント、微生物の細胞内産物および画分、ハプテン、免疫原性タンパク質、免疫調節物質、インターフェロン、胸腺ホルモンおよびコロニー刺激因子から選択される免疫アジュバントを同時投与する段階を含んでもよい。

30

【0021】

本発明の方法は、さらに、TARPのエピトープを含むポリペプチドで標識した抗原提示細胞を投与する段階またはTARPのエピトープを含むポリペプチドをコードする核酸配列を投与する段階であって、核酸が組換えウィルスの形態である段階を含んでもよい。本発明の方法はさらに、TARPタンパク質のエピトープを含むポリペプチドをコードする核酸配列を投与する段階を含む。

40

【0022】

また、本発明の方法は、TARPタンパク質のエピトープを含むポリペプチドを発現する発現ベクターを投与する段階であって、発現ベクターが組換え細菌細胞の形態である段階を含む。さらに、本発明の方法は、TARPタンパク質のエピトープを含むポリペプチドを発現する発現ベクターで被験者を免疫化する段階であって、発現ベクターが自己組換え細胞の形態である段階を含む。

【0023】

別の局面において、本発明の方法は、男性において上皮起源の前立腺細胞を検出し、または女性において乳癌細胞を検出する方法であって、男性または女性由来の細胞においてTARPをコードする核酸転写物を検出する段階または転写物の翻訳によって産生されるT

50

A R Pを検出する段階を含み、該男性由来の細胞における転写物またはタンパク質の検出が該細胞を前立腺上皮細胞と識別し、該女性由来の細胞における転写物またはタンパク質の検出が該細胞を乳癌細胞と識別する方法を提供する。本発明の方法は、細胞由来のRNAに、ハイブリダイゼーション条件下において転写物と特異的にハイブリダイズする核酸プローブを接触させる段階と、ハイブリダイゼーションを検出する段階とを含んでもよい。さらに、本発明の方法は、細胞を粉砕して、細胞内容物の一部を、タンパク質と特異的に結合する標的部分と検出可能な標識とを含むキメラ分子に接触させる段階と、タンパク質に結合した標識を検出する段階とを含んでもよい。標的部分自体も標識されてもよい(例えば、s c F vなどの抗体が放射性残基を有してもよい)。

【0024】

検討される細胞はリンパ節由来であっても、または乳房の生検試料由来であってもよい。

【0025】

最後に、本発明は、TCR 代替リーディングフレームタンパク質(Alternate Reading frame Protein)のエピトープに特異的に結合する抗体を提供する。

【0026】

発明の詳細な説明

1. 序文

驚くべきことに、上皮起源の前立腺細胞および多数の乳癌の細胞はT細胞受容体鎖(「TCR」)のmRNAを発現することが発見されている。前立腺における主要なTCR 転写物はTリンパ球とはサイズが異なる。前立腺上皮細胞および多数の乳癌細胞が、Tリンパ球において主に発現されると考えられている遺伝子から多量の転写物を発現するという所見はほとんど予測されていない。

【0027】

TCR リーディングフレームは有効なコザック配列(Kozak, M. Cell 44: 283-92(1986))を含有するので、本発明者らは最初は、切断された形態のTCR タンパク質がコードされること仮定した。従って、前立腺上皮細胞および乳癌細胞において発現されるTCR 遺伝子座が7 kDaの核タンパク質をコードすることを見いだしたのはさらに驚きであった。タンパク質はTCR とは別のリーディングフレームからコードされるので、本発明者らはそれをTCR の代替リーディングフレームタンパク質(TCR 代替リーディングフレームタンパク質(Alternate Reading frame Protein))、「TARP」と名付けた。TCR 遺伝子座のイントロン内から生ずる転写物の代替リーディングフレームから翻訳されること以外に、TARPは2つの他の通常ではない特徴を有する。第一に、ほとんどが通常分泌されるため、このような小さいペプチドを細胞内で見いだすことは驚くべきことである。第二に、TARPは有効なコザック配列を欠損している。

【0028】

インビトロおよびインビボにおける用途

前立腺上皮細胞、前立腺癌細胞および多数の乳癌細胞におけるこのタンパク質の存在はインビトロおよびインビボにおける用途のための数多くの機会を形成する。最初に、このタンパク質に対して形成される抗体は、試料中のTARPを発現する細胞の存在を検出するインビトロにおけるアッセイ法に使用することができる。例えば、以下の実施例は、TARPおよびTARP転写物は正常な乳房細胞では存在しないかまたはごく低いレベルでしか存在しないが、TARPを発現する乳癌細胞では容易に検出されることを実証している。従って、被験者から切除された乳房細胞における高いレベルのTARP転写物またはTARPの検出は、被験者においてTARPを発現する乳癌の存在を示すと思われる。前立腺細胞におけるTARP発現に関しては、当業者は、前立腺の切除が進行性の前立腺癌における頻度の高い外科的治療法であることに気づいている。前立腺が切除された個人由来の細胞中でのTARPの検出は前立腺癌が存在することを示している。(当業者は、年間約1,000人が乳癌と診断されることを認識している。従って、患者も独立に乳癌に罹

10

20

30

40

50

患することが不可能ではない。前立腺癌は男性では200倍を越えるほど多数であり、考察は前立腺癌に罹患していることがすでに見いだされている患者を考慮していることを考えると、患者も乳癌に独立に罹患している確立は小さい。診断は、試料を採取した部位、細胞の組織学および形態学的特徴ならびに他の通常の診断基準をすることによって確認することができる。いかなる事象においても、どちらかの状態の存在はさなる評価およびモニタリングを要求するので、前立腺を切除された男性においてTARP発現細胞の存在が測定されること自体、個人が前立腺、乳癌または両方を有するかどうかにかかわらず、非常に有用である。前立腺癌のない男性におけるTARP発現細胞の検出は乳癌を示している。)

【0029】

TARP自体、TARPの免疫原性断片およびTARPまたはその免疫原性断片をコードする核酸も、被験者に注入されたとき、前立腺癌細胞およびTARP発現乳癌細胞を攻撃するために、被験者から誘導される細胞障害性Tリンパ球(「CTL」)をインビトロにおいて活性化するのに使用することができる。

【0030】

TARP自体、TARPの免疫原性断片、TARPまたはその免疫原性断片をコードする核酸を、前立腺癌またはTARP発現乳癌に対する免疫応答を形成または高めるために、一般に薬学的に許容されうる担体の形態で被験者に投与することができる。このような組成物は、前立腺癌またはTARP発現乳癌を罹患していると診断された患者に対して治療的に投与することができる。

【0031】

以下に考察するように、TARPは、転写を調節するタンパク質を特徴とする構造的な特徴を含有する核タンパク質である。細胞内でのTARPLEベルの調節は細胞の増殖、細胞の複製または両方に影響を与えることが予期される。従って、TARPLEベルの調節は、癌細胞の進行をコントロールする際に重要となりうる。TARPLEベルは、RNA転写物がタンパク質に翻訳される能力を妨害するリボザイムおよびアンチセンス分子などの種々のモダリティによって細胞内で低下されることがある。例えば、強力な構成的プロモーターによって駆動される、TARPをコードする核酸を含有する発現ベクターを細胞に導入することができる。核酸の構造的な転写により細胞内でのタンパク質の発現はより高レベルになる。

【0032】

この項の残りはTARPの種々の構造的な特徴について記載する。内容は本発明の開示に使用される定義に続き、TARPの免疫原性断片の選択、被験者へのTARPの投与、TARPに対する抗体の形成、TARP転写物およびタンパク質の検出ならびに薬学的組成物の考察に続く。

【0033】

TARPの構造的な特徴

TARPは7アミノ酸リピート中に5つのロイシンを含有し、これは、TARPがロイシンジッパー2量体モチーフを含有することを示唆している(図7A)。これが真実であるためには、TARPは両親媒性ヘリックスを含有しなければならない。TARPが両親媒性ヘリックスを含有することを示す1つの証拠は、ヘリックスの開始因子として作用することが考えられている残基であるセリンおよびプロリン残基が最初のロイシンリピートの直前に見いだされることである。第二に、多数の荷電アミノ酸が7アミノ酸リピート内に見いだされ、それによってヘリックスに両親媒性を与え、おそらく他のヘリックスとの塩橋として作用する。7アミノ酸リピート内にロイシンが存在することがロイシンジッパーモチーフの良好な指標物であったとしても、7アミノ酸リピート内にはロイシンと考えられない5つのロイシンを含有する同定されたタンパク質が存在する。例えば、カリオフィリン(karyopherin)(Chook, Y. K.ら、Nature 399: 230-237(1999))、B.ステラロサーモフィラス(sterarothermophilus)ピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼ(Pugmire, M. J

10

20

30

40

50

ら、Structure 6: 1467-1479 (1998)) および T.サーモフィラス (thermophilus) フェニルアラニル tRNA シンターゼ (Mosyak, L.ら、Nat. Struct. Biol. 2: 537-547 (1995)) の結晶構造は、これらのタンパク質は、配列が7アミノ酸リピート中に5つのロイシンを含有する領域にヘリックス構造を含有しないことを示している。TARP 中に見いだされるロイシンリピートの重要性を決定するには相互作用および構造研究が必要とされる。

【0034】

TARP アミノ酸配列の別の通常ではない特徴は、塩基性アミノ酸の領域がロイシンジッパーモチーフと思われる領域の次にあることであり (図7A)、これは DNA 結合モチーフの可能性を示唆している。しかし、塩基性領域の配向は、ロイシンリピートの手前ではなくそれらのあとにあるという点において独自である。DNA に結合するほとんどのロイシンジッパータンパク質はロイシンリピートの手前に塩基性領域を有する (総説として、(Chook, Y. M.ら、Nature 399: 230-237 (1999)) を参照)。TARP の塩基性領域は核局在化シグナルとして機能しているだけの可能性があるが、TARP が核タンパク質であるという事実は、TARP が DNA に結合するという仮定を強化している。

【0035】

TARP が任意の既知のタンパク質との相同性を有するかどうかを判定するために、本発明者らはジェンバンクへのタンパク質の BLAST 検索を実施した。この検索は、TARP のアミノ酸配列はディクチオステリウム ディコイデム (*Dictyostelium discoideum*、細胞性粘菌) Tup1 (ジェンバンクアクセッション番号 AAC29438) およびサッカロミセスセレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) Tup1 (Williams, F. E.ら、Mol. Cell. Biol. 10: 6500-6511 (1990)) とのある程度の相同性を有することを示した (図7C)。酵母 Tup1 は通常 Cyc8 (Ssn6) との複合体の形態で見いだされ、ブドウ糖、酸素および DNA 損傷によって調節される遺伝子の転写抑制に必要とされる (Tzamarrias, D.ら、Genes Dev. 9: 821-831 (1995))。Cyc8 (Ssn6) も Tup1 も DNA に結合しないが、各々は、2、Mig1、Rox1 および a1 などの特定の DNA 結合タンパク質との相互作用によりコリプレッサー複合体の一部として作用する (Tzamarrias, D.ら、Genes Dev. 9: 821-831 (1995))。Tup1 の C' 側末端の半分は、WD-40 または トランスデュシンリピートとして周知である、アスパラギン酸およびトリプトファンが豊富な 43 アミノ酸配列の 6 つのリピートを含有する (Williams, F. E.ら、Mol. Cell. Biol. 10: 6500-6511 (1990)); Fong, H. K.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2162-2166 (1986))。WD-40 リピートは多数のタンパク質において同定されており、タンパク質-タンパク質相互作用に何らかの役割を果たしている。重要なことに、Tup1 は、WD-40 リピートの 2 つによって 2 と相互作用することが示されている (Komachi, K.ら、Genes Dev. 8: 2857-2867 (1994))。TARP が Tup1 の 5 番目の WD-40 リピートと相同性を有することに気づくことは興味深い (図7C)。TARP は核タンパク質であるので、Tup1 との相同性は、TARP が、転写調節に関与する機能的な核タンパク質複合体の一員であることを示唆している。

【0036】

TARP 抗体は前立腺および乳房核抽出物中の二重バンドを認識する (図6A)。7 kDa のバンドは His-TARP 組換えタンパク質と同時により早く移動するが、より大きい分子量ではより弱いバンドが移動する。9 kDa のバンドの考えられる 1 つの説明は翻訳後修飾である。TARP が任意の既知の翻訳後修飾部位を含有するかどうかを判定するために、本発明者らは、スイス生物情報科学研究所 (Swiss Institut

10

20

30

40

50

e of Bioinformatics)のEXPASYプロテオミクスサーバー(<http://www.expasy.ch>)を使用してTARPアミノ酸配列を分析した(Appel, R. D.ら、Trends Biochem. Sci. 19: 248-260 (1994); Hofmann, K.ら、Nucleic Acids Res. 27: 215-219 (1999))。図7Aに示すように、cAMPおよびcGMP依存的プロテインキナーゼリン酸化部位(RRATおよびRRGT)ならびにプロテインキナーゼCリン酸化部位(SSRおよびSRR)を含む多数の可能なリン酸化部位が見いだされている。リン酸化は、多数の場合において、SDS-PAGEゲル上でタンパク質をより大きい見かけの分子量として移動させることが示されている。これが事実である場合には、図6の結果は未修飾の形態がLNCaP細胞に多数含有され、リン酸化された形態だけがMCF7およびSK-BR-3細胞において存在することを示すことができる。従って、TARPは、前立腺および乳癌細胞において発現される場合には翻訳後修飾されていることがある。

【0037】

TARP転写物の本発明者らの最初の研究は乳房においてTARP発現を明らかにしなかった(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9287-9292 (1999))。1つの考えられる説明は、TARPは正常な乳房では低いレベルで発現されており、検出が困難であるということである。結果の項に記載するように、癌試料において検出される強力なシグナルと比較すると、非常に弱いシグナルが正常な乳房試料のPCR分析において検出された。従って、乳癌細胞におけるTARPの存在は、乳房細胞の発癌形質転換後にTARPの発現が誘導されることを示すことができる。また、乳癌細胞におけるTARPの存在は、TARPがエストロゲンによって調節されることを示すことができる。この仮定は、アンドロゲン応答性要素(ARE)をエストロゲン応答性要素(ERE)を組み合わせるTARPのイントロンプロモーター内に要素を同定することによって強化される。このハイブリッド要素はAREの5'末端およびEREの3'末端に特異的な2つの半分の部位からなる[(Zilliacus, J.ら、Mol. Endocrinol. 9: 389-400 (1995))および未発表データ]。エストロゲンがTARPを調節するかどうかを判定するためには追加の実験が必要である。しかし、突然変異AREが乳癌においてある種の前立腺特異的遺伝子の発現を生ずる例がある。例えば、前立腺特異的抗原(PSA)は乳癌において発現されることが示されている(Majumdar, S.ら、Br. J. Cancer 79: 1594-1602 (1992))。PSAの異常な発現の分子的な分析により、PSAプロモーター内に見いだされるAREの1つの1つの点変異が発見される。この突然変異により、乳癌においてアンドロゲンによって調節されるPSA発現が損失されると考えられている(Majumdar, S.ら、Br. J. Cancer 79: 1594-1602 (1999))。この時点では、TARPプロモーターの同様の突然変異が、試験した3つの乳房細胞系統において生ずるかどうかは不明である。

【0038】

前立腺は、その構造および機能の維持にアンドロゲンに依存している。前立腺細胞が悪性化する場合には、それらはアンドロゲン依存性を損失することが多い。本発明の検討において、本発明者らは、増殖のためのアンドロゲンへの依存性が異なる2種類の前立腺細胞系統、LNCaPおよびPC3細胞を使用した。アンドロゲン受容体はアンドロゲン依存的LNCaP細胞系統に存在するが、アンドロゲン非依存的PC3細胞系統には存在しない(Tilley, W. D.ら、Cancer Res. 50: 5382-5386 (1990))。図3に示すように、TARPはLNCaP細胞において発現されるが、PC3細胞では発現されない。この結果は、TARPの発現はアンドロゲン刺激によって調節されることを示唆している。TARPプロモーター内のARE様要素の同定は、TARPがアンドロゲンによって誘導されるという考えを強化する。LNCaP細胞内で発現されるが、PC3細胞で発現されないことは、TARPがアンドロゲン依存的応答を調節する際に重要であることを示唆している。

【0039】

II. 定義

特に明記しない限り、本明細書において使用する全ての技術的用語および科学的な用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって普通に理解される意味を有する。以下の参考文献は、本発明において使用する用語の多数の一般的な定義を提供している：シングルトン(Singleton)ら、DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY(第2版、1994)；THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY(Walker 編、1988)；THE GLOSSARY OF GENETICS, 第5版、リーガー(R. Rieger)ら(編)、Springer Verlag(1991)；ならびにハーレおよびマーハム(Hale & Marham), THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY(1991)。本明細書において使用される、以下の用語は、特に明記しない限り、それらに帰する意味を有する。

【0040】

「T細胞受容体」とは、鎖と鎖または および 鎖を含むT細胞の表面に見いだされるヘテロダイマーを指す。T細胞受容体は、MHC分子に関連する処理済みの抗原を認識する。

【0041】

「T細胞受容体 鎖の代替リーディングフレームタンパク質(Alternate Reading frame Protein)」および「TARP」とは、その配列が例えば図14に記載されているポリペプチドを指す。ポリペプチドは上皮起源の前立腺細胞、前立腺癌細胞および多数の乳癌における転写物として提示されるT細胞受容体 遺伝子の形態から翻訳される。「TARP」はその最後の部分が「タンパク質」という言葉を表す頭字語であるので、「TARPタンパク質」は冗長である。

【0042】

本明細書において使用する、TARPを翻訳することができる核酸転写物は、「TARP核酸」または「TARPをコードする核酸」と呼ばれる。TARPが転写される遺伝子は本明細書において「TARP遺伝子」と呼ばれる。

【0043】

本明細書において使用する、TARPの「免疫原性断片」とは、主要組織適合性抗原複合体分子に関連して細胞によって提示されるとき、T細胞活性化アッセイ法において、TARPを発現する細胞に対するTリンパ球を活性化することができるTリンパ球の一部を指す。典型的には、このような断片は鎖長が8~12連続するアミノ酸のTARPであるが、当然のことであるが、さらに長い断片を使用してもよい。

【0044】

1つのポリペプチドを別のポリペプチドと比較することに関連して、「配列の同一性」は、基準の配列としてのTARPの配列を試験配列に比較することによって判定される。典型的には、2つの配列は、最大または最適に整列させるために整列される。

【0045】

「リガンド」とは、標的分子に特異的に結合する化合物である。

【0046】

「受容体」とは、リガンドに特異的に結合する化合物である。

【0047】

「細胞障害性Tリンパ球」(「CTL」)とは、腫瘍細胞に対する免疫応答において重要である。CTLは、ほとんど全ての有核細胞の表面に発現されるI型HLA分子に関連してペプチドエピトープを認識する。

【0048】

腫瘍特異的ヘルパーTリンパ球(「HTL」)はまた効果的な抗腫瘍免疫を維持するために重要であることも知られている。抗腫瘍免疫におけるそれらの役割は、これらの細胞が

C T Lおよび抗体応答の誘導のための助力を提供する働きをするだけでなく、直接的な細胞接触によってまたリンホカイン（例えば、I F N およびT N F ）の分泌によっても仲介される、エフェクター機能も提供する動物モデルにおいて実証されている。

【0049】

「抗体」とは、エピトープ（例えば、抗原）を特異的に認識し、結合する少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンドを指す。これは無傷の免疫グロブリンならびにF a b '断片、F (a b) ' ₂断片、1本鎖F vタンパク質（「s c F v」）およびジスルフィド安定化F vタンパク質（「d s F v」）などの当該技術上周知のそれらの変異体および一部を含む。s c F vタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域および免疫グロブリンの重鎖可変領域がリンカーによって結合されている融合タンパク質である。天然の免疫グロブリンは免疫グロブリン遺伝子によってコードされる。これらには、 κ および λ 軽鎖不変領域遺伝子、および μ 重鎖不変領域遺伝子ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。「抗体」という用語には、ハイブリドーマからまたは組換え的に免疫化によって作製される、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体が含まれる。

10

【0050】

「エピトープ」または「抗原性決定因子」とは、Bおよび/またはT細胞が応答する抗原上の部位を指す。エピトープは、連続するアミノ酸またはタンパク質の三次元的な折りたたみによって隣接化される連続していないアミノ酸から形成されうる。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性性溶媒に暴露しても保持されるが、三次元的な折りたたみによって形成されるエピトープは、典型的には、変性性溶媒で処理すると損失される。エピトープは、独自の空間的立体配座に典型的には、少なくとも3、より普通には、少なくとも5または8~10アミノ酸を含む。エピトープの空間的立体配座を決定する方法には、例えば、x線結晶解析および二次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、「分子生物学におけるエピトープマッピングプロトコール（E p i t o p e M a p p i n g P r o t o c o l s i n M E T H O D S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y）」、66巻、モリス（G l e n n E . M o r r i s ）、編（1996）を参照のこと。

20

【0051】

リガンドまたは受容体は、異種化合物の試料における分析物の存在を決定する結合反応においてリガンドまたは受容体が機能する場合に化合物の分析物に「特異的に結合する」。従って、リガンドまたは受容体は特定の分析物に優先的に結合し、試料中に存在する他の化合物に大量には結合しない。例えば、ポリヌクレオチドは相補的配列を含む分析物ポリヌクレオチドに特異的に結合し、抗体は、抗体が形成されたエピトープを保有する抗原分析物に免疫アッセイ条件下において特異的に結合する。

30

【0052】

「免疫アッセイ法」とは、分析物の特異性が、抗体とリガンドとの間の特異的な結合によって与えられる試料中の分析物を検出する方法を指す。特異的な免疫反応性を測定するために使用することができる免疫アッセイ方式および条件の説明はハーロウ（H a r l o w ）およびレーン（L a n e ）（1988）「抗体、実験室マニュアル（A N T I B O D I E S , A L A B O R A T O R Y M A N U A L ）」、C o l d S p r i n g H a r b o r P u b l i c a t i o n s , N e w Y o r kを参照のこと。

40

【0053】

「ワクチン」とは、生物に治療程度の免疫を与えるのに効果的であるが、ごく低いレベルの罹病率または致死率しか生じない薬剤または薬剤を含む組成物を指す。ワクチンを作製する方法は、当然のことながら、免疫系の検討ならびに動物またはヒトの疾患を予防および治療する際に有用である。

【0054】

「免疫量」とは、被験者に免疫応答を誘発するのに効果的な量である。

【0055】

50

「ポリペプチド」とは、アミノ酸残基、関連する天然型構造変異体およびペプチド結合によって結合される合成非天然型類似物、関連する天然型構造変異体および合成非天然型類似物を含むポリマーを指す。合成ポリペプチドは、例えば、自動式ポリペプチド合成装置を使用して合成することができる。「タンパク質」という用語は、典型的には、大型のポリペプチドを指す。「ペプチド」という用語は、典型的には、短いポリペプチドを指す。

【0056】

ポリペプチドの配列を表記するためには従来の表記方法が本明細書において使用される：ポリペプチド配列の左側末端はアミノ末端であり、ポリペプチド配列の右側末端はカルボキシ末端である。

【0057】

「融合タンパク質」とは、1つのポリペプチドのアミノ末端と他のポリペプチドのカルボキシ末端によって形成されるペプチド結合による2つ以上のポリペプチドの結合によって形成されるポリペプチドを指す。融合タンパク質は、典型的には、1つの連続する融合タンパク質をコードする核酸配列から1つのポリペプチドとして発現されてもよい。しかし、融合タンパク質は、構成ポリペプチドの化学的カップリングによって形成されてもよい。

【0058】

「保存的置換」とは、アミノ酸を機能的に類似したアミノ酸とポリペプチド中で置換することを指す。以下の6つの群は各々、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する。

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)、
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)、
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

【0059】

2つのタンパク質は、異なる種に存在し、共通の遺伝的祖先由来であり、少なくとも70%アミノ酸の配列の同一性を有する場合にはそれらは互いの「相同物」である。

【0060】

「実質的に純粋な」または「単離された」とは、目的の種が存在する主要な種である（すなわち、分子的に、組成物中の任意の他の個別の高分子種より多量である）ことを意味し、実質的に純粋な画分は、目的の種が存在する全ての高分子種の（分子に）少なくとも約50%を含む組成物である。一般に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在する高分子種の約80%～90%以上が関心のある純粋な種であることを意味する。組成物が本質的に1つの高分子種からなる場合には、目的の種は本質的な均一性にまで精製されている（従来の検出方法によって汚染種が組成物中に検出され得ない）。溶媒種、小分子（< 500ダルトン）、安定化剤（例えば、BSA）および元素状イオン種は本発明の定義の目的のためには高分子種と考えられない。

【0061】

「核酸」とは、ホスホジエステル結合により結合されるヌクレオチド単位（リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、関連する天然型構造変異体および合成非天然型類似物）、関連する天然型構造変異体および合成非天然型類似物を含むポリマーを指す。従って、この用語は、ヌクレオチドとそれらの間の結合が非天然型合成類似物を含む、例示的ではあるが、限定的ではないホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）等などのヌクレオチドポリマーを含む。このようなポリヌクレオチドは、例えば、自動式DNA合成装置を使用して合成することができる。「オリゴヌクレオチド」という用語は、典型的には、短いポリヌクレオチドをいい、一般的には約50ヌクレオチドを越えない。ヌクレオチド配列がDNA配列（すなわち、A、T、G、C）によって示されるとき、これはまた、「U」が「T」に変わるRNA配列（すなわち、A、U、G、C）も含

10

20

30

40

50

む。

【0062】

本明細書においてヌクレオチド配列を記載するために従来の表記法が使用され、単離された1本鎖ヌクレオチド配列の左側は5'末端であり、2本鎖ヌクレオチド配列の左側方向は5'側方向と呼ぶ。新生RNA転写物へのヌクレオチドの5'から3'方向への付加は転写方向と呼ぶ。mRNAと同じ配列を有するDNA鎖は「コード鎖」と呼ばれ、そのDNAから転写されるmRNAと同じ配列を有し、RNA転写物の5'末端に対して5'側に位置するDNA鎖の配列を「上流配列」と呼び、RNAと同じ配列を有し、コードするRNA転写物の3'末端に対して3'側にあるDNA鎖の配列を「下流配列」と呼ぶ。

【0063】

「cDNA」とは、1本鎖または2本鎖の形態のmRNAと相補的または同一のDNAを指す。

【0064】

「コードする」とは、規定された配列のヌクレオチド(すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA)または規定された配列のアミノ酸およびそれらから生ずる生物学的特性を有する生物過程において、他のポリマーおよび高分子を合成するための鋳型として作用する、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の本質的な特性を指す。従って、細胞または他の生物系においてその遺伝子によって作製されるmRNAの転写および翻訳がタンパク質を作製する場合には、遺伝子はタンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がmRNA配列と同一で、通常配列リストに提供されているコード鎖および遺伝子またはcDNAの転写の鋳型として使用される非コード鎖は共に、タンパク質またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードすることができる。特に明記しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの変性型であり、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含んでもよい。

【0065】

「組換え核酸」とは、天然では互いに結合しないヌクレオチド配列を有する核酸を指す。これは、好適な宿主細胞を形質変換するために使用することができる増幅または集成された核酸を含む核酸ベクターを含む。組換え核酸を含む宿主細胞は「組換え宿主細胞」と呼ばれる。次いで、遺伝子は、例えば「組換えポリペプチド」を作製するために組換え宿主細胞中で発現される。組換え核酸は、同様に非コード機能(例えば、プロモーター、複製起点、リボソーム結合部位等)を提供することができる。

【0066】

「発現コントロール配列」とは、機能的に結合するヌクレオチド配列の発現(転写および/または翻訳)を調節するポリヌクレオチド中のヌクレオチド配列を指す。「機能的に結合する」とは、一方の部の活動(例えば、転写を調節する能力)により他方の部に作用(例えば、配列の転写)を生ずる2つの部の間の機能的な関係を指す。発現コントロール配列は、例示的であって、限定的ではないが、プロモーター(例えば、誘導的または構成的)、エンハンサー、転写停止因子、開始コドン(すなわち、ATG)、イントロンのスプライシングシグナルおよび停止コドンの配列を含んでもよい。

【0067】

「発現カセット」とは、発現可能なヌクレオチド配列に機能的に結合する発現コントロール配列を含む組換え核酸構築物を指す。発現カセットは、一般に、発現に十分なシス作用型要素を含み、発現の他の要素は宿主細胞またはインビトロ発現系によって供給されうる。

【0068】

「発現ベクター」とは、発現カセットを含むベクターを指す。発現ベクターは、などのコスミド、プラスミド(例えば、未処理またはリボソームに含有される)および発現カセットを組み入れるウイルスなどの当該技術上周知の全てを含む。

【0069】

10

20

30

40

50

配列が第1の配列であるポリヌクレオチドが、配列が第2の配列であるポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする場合には、第1の配列は第2の配列に関して「アンチセンス配列」である。

【0070】

2つ以上のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の配列の関係を記載するために使用される用語には、「基準配列」、「から選択される」、「比較ウィンドウ」、「同一な」、「配列の同一性の割合」、「実質的に同一な」、「相補的な」および「実質的に相補的な」を含む。

【0071】

核酸配列を配列比較するためには、典型的には、一方の配列が、試験配列を比較する基準配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験配列および基準配列をコンピュータに入力し、適宜部分列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。比較のために配列を整列させる方法も当該技術上周知である。例えば、スミスおよびウォーターマン (Smith & Waterman), *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981) の局所的な相同性アルゴリズム、ニードルマンおよびウーシ (Needleman & Wunsch), *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970) の相同性整列アルゴリズム、ピアソンおよびリプマン (Pearson & Lipman), *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988) の類似性の検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実施 (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) における GAP、BESTFIT、FASTA および TFASTA) または手作業による整列と目視による検査 (例えば、*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubelら, eds 1995 supplement)) によって、比較のための配列の最適な整列を実施することができる。

【0072】

有用なアルゴリズムの一例は PILEUP である。PILEUP は、フェンおよびドールittle (Feng & Doolittle), *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987) の進歩的な整列方法の単純化を使用している。使用する方法は、ヒギンスおよびシャープ (Higgins & Sharp), *CABIOS* 5: 151-153 (1989) によって記載されている方法と同様である。PILEUP を使用して、基準配列を他方の試験配列と比較して、以下のパラメータを使用して配列の同一性の関係の割合を求める: デフォルトギャップウェイト (3.00)、デフォルトギャップ鎖長ウェイト (0.10) および重みをつけた末端のギャップ (weighted end gaps)。PILEUP は、GCG 配列分析ソフトウェアパッケージ、例えばバージョン 7.0 から入手することができる (Devereauxら, *Nuc. Acids Res.* 12: 387-395 (1984))。

【0073】

配列の同一性の割合および配列の類似性を求めるのに好適なアルゴリズムの別の例は、Altschulら, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990) およびオースベル (Altschul)ら, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1977) に記載されている、BLAST および BLAST 2.0 アルゴリズムである。BLAST 分析を実施するためのソフトウェアは、生物学情報センター (the National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) により公共的に入手可能である。BLASTN プログラム (ヌクレオチド配列用) はデフォルトとして、ワード長 (W) = 11、アラインメント (B) = 50、期待値 (E) = 10、M = 5、N = 4 および両鎖の比較を使用する。BLASTP プログラム (アミノ酸配列用) はデフォルトとしてワード長 (W) = 3、および期待値 (E) = 10、お

10

20

30

40

50

よび B L O U S U M 6 2 スコアリングマトリックスを使用する (H e n i k o f f & H e n i k o f f , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 1 0 9 1 5 (1 9 8 9)) 。

【 0 0 7 4 】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、50%ホルムアミド、5×SSCおよび1%SDSと共に42℃でインキュベーションする、または5×SSCおよび1%SDSと共に65℃でインキュベーションし、0.2×SSCおよび0.1%SDSと共に65℃で洗浄することを指す。

【 0 0 7 5 】

物体に適用される「天然型」とは、物体が天然に見いだされることを指す。例えば、天然の起源から単離から単離することができ、実験室において人為的に意図的に改変されていない(ウイルスを含む)生物に存在するアミノ酸またはヌクレオチド配列が天然型である。

10

【 0 0 7 6 】

「リンカー」とは、共有結合またはイオン結合、ファンデルワールス結合または水素結合により2つの他の分子、例えば、1つの相補的な配列の5'末端および別の相補的な配列の3'末端にハイブリダイズして、それによって2つの非相補的な配列を結合する核酸分子を結合する分子を指す。

【 0 0 7 7 】

「薬学的に有効な量」とは、目的の薬理学的結果を生ずるのに有効な薬剤の量を指す。

20

【 0 0 7 8 】

「薬学的に許容されうる担体」とは、リン酸緩衝生理食塩液、デキストロースの5%水溶液などの標準的な薬学的担体、緩衝液および賦形剤ならびに水中油型または油中水型エマルジョンなどのエマルジョン、ならびに種々の型の湿潤剤および/または補助剤のいずれかを指す。好適な薬学的担体および製剤はレミングトン (R E M I N G T O N) の製薬科学 (P H A R M A C E U T I C A L S C I E N C E) , 第19版 (M e r c k P u b l i s h i n g C o . , E a s t o n , 1 9 9 5) に記載されている。好ましい薬学的担体は作用薬の目的の投与様式に依存する。典型的な投与様式には、腸内(例えば、経口)または非経口(例えば、皮下、筋肉内、静脈内もしくは腹腔内注射、または局所、経皮または経粘膜投与)が含まれる。「薬学的に許容されうる塩」は、例えば金属塩(ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等)およびアンモニアまたは有機アミンの塩を含む薬学的用途のために化合物に製剤化することができる塩である。

30

【 0 0 7 9 】

診断または治療の「被験者」とはヒトまたはヒト以外の哺乳類である。

【 0 0 8 0 】

組成物の「投与」とは、選択された投与経路によって被験者内に組成物を導入することを指す。例えば、選択された経路が静脈内である場合には、組成物は、被験者の静脈内に組成物を導入することによって投与される。

【 0 0 8 1 】

「治療」とは、予防的治療または治療的治療を指す。

40

【 0 0 8 2 】

「予防的」治療とは、異常を発症するリスクを低下する目的のために疾患の徴候を示さない被験者または早期徴候のみを示す被験者に与えられる治療である。

【 0 0 8 3 】

「治療的」治療とは、異常の徴候を軽減または排除する目的のために、そのような徴候を示す被験者に与えられる治療である。

【 0 0 8 4 】

「診断」とは、異常な状態の存在または性質を同定することを意味する。診断の方法は感受性および特異性において異なる。診断アッセイ法の「感受性」とは、陽性の結果を生ずる罹患患者の割合(真の陽性の割合)である。診断アッセイ法の「特異性」は、1 - 偽陽

50

性率で、ここで、偽陽性率は、陽性の結果を生じるが、疾患を認めない患者の割合と規定される。特定の診断方法は、状態の決定的な診断を提供することができなくても、診断の助力となる陽性の結果をその方法が提供すれば十分である。

【0085】

「予想 (prognostic)」とは、異常な状態の確率的な発症 (例えば、重症度) を予測することを意味する。

【0086】

III. TARP

本発明は、単離された組換え TARP を提供する。本発明者らが最初に単離された前立腺特異的 TCR 転写物をを見いだしたので、~ 1.1 kb PS-TCR 転写物からい
10
ずれかのリーディングフレームに翻訳されると思われる任意のポリヌクレオチドを指すために、「PS-TCR タンパク質」および「PS-TCR ポリペプチド」という用語を最初に使用した。特に、この用語は、インビトロにおける翻訳系において翻訳される2つのタンパク質、PS-TCR - 1 (配列番号: 14) および PS-TCR - 2 (配列番号: 15) を指す。本発明者らは本明細書において、これらのリーディングフレームのうち最初のものだけが前立腺細胞において翻訳されることを測定した。このリーディングフレームは、TCR 鎖を生ずるリーディングフレームではないので、このタンパク質は本明細書では「T細胞受容体代替リーディングフレームのタンパク質 (Alternate Reading frame Protein)」と呼ぶ。全長の TARP は 58 ア
20
ミノ酸のタンパク質で、その配列は配列番号: 14 および図 14 に記載されている。

【0087】

ある種の態様において、本発明は、TARP の連続する少なくとも 5 アミノ酸 ~ 少なくとも 15 アミノ酸からなるエピトープを含むポリペプチドを提供する。このようなタンパク質は、全長の TARP に対して形成された抗体に結合する (この項では、「TARP」への言及は、内容によって特に要求されないかぎり、全長のタンパク質を指す。)。他の態様において、本発明は、タンパク質部分の一方が、TARP のエピトープを同定する少なくとも 5 アミノ酸のアミノ酸配列を含む第 1 および第 2 のポリペプチド部分を含む融合タンパク質を提供する。一態様において、TARP 部分は TARP の全てまたは実質的である。他の部分は、例えば、免疫原性タンパク質であってもよい。このような融合物も、T
30
ARP に対する免疫応答を誘発するのに有用である。他の態様において、本発明は、アミノ酸配列が TARP と少なくとも 90% 同一であり (TARP と 91%、92%、93%、94%、95% またはさらに高い配列の同一性を有してもよいが)、TARP に特異的に結合する抗体によって特異的に結合される TARP 様ペプチド (「TARP 類似物」) を提供する。さらに他の態様において、本発明は、アミノ酸配列が TARP と少なくとも 90% 同一であり (TARP と 91%、92%、93%、94%、95% またはさらに高い配列の同一性を有してもよいが)、TARP を発現する細胞に対する Tリンパ球を活性化する TARP 様ペプチド (「TARP 類似物」と本明細書において呼ばれることもある) を提供する。このようなタンパク質は、PS-TCR タンパク質に対する耐性を破壊する免疫原として有用である。

【0088】

別の態様において、ポリペプチドは、例えば HLA 分子または DR 分子のような MHC 分子に結合するエピトープを含む。これらの分子は、約 8 アミノ酸または 9 アミノ酸によって分離されている適切なアンカーアミノ酸を有するポリペプチドに結合する。これらのペ
40
プチドは、TARP のアミノ酸配列を調べ、当該技術上周知の MHC 結合モチーフを知ることによって同定することができる。

【0089】

TARP、その免疫原性断片および TARP 類似物を、組換えによって合成することができる。TARP の免疫原性断片および 58 残基の TARP 自体も標準的な方法によって化学的に合成されうる。望ましい場合には、ポリペプチドを新興技術によって化学的に合成
50
することもできる。このような方法の 1 つは、W. ルー (Lu) ら、F e d e r a t i

on of European Biochemical Societies Letters. 429: 31-35 (1998)に記載されている。

【0090】

IV. TARP核酸

一局面において、本発明は、TARPポリペプチド(例えば、図14参照)をコードするヌクレオチド配列を含む単離された組換え核酸分子を提供する。この核酸分子は、例えば、診断目的のために抗体を形成するのに使用することができるTARPを発現するのに有用である。記載されているように、核酸分子は3つのリーディングフレームを有し、その各々は異なるオープンリーディングフレームによって規定される異なるポリペプチドをコードする。本明細書に含まれる態様において、関心のあるリーディングフレームはTARPをコードするものである。

10

【0091】

記載されているように、2つのリーディングフレームはインビトロ翻訳系において翻訳される。LNCaP cDNAから得られる~1.1 kbのPS-TCR転写物(配列番号:13)のヌクレオチド配列ならびに転写物が74位のヌクレオチド部位(PS-TCR-1、配列番号:14)および247位のヌクレオチド部位(PS-TCR-2、配列番号:15)から翻訳される場合の推定アミノ酸配列を図1に示す。転写開始点(下線部)は、J1.2セグメントの最初の10ヌクレオチド内である。配列データは、EMBL/ジェンバンク/DBJからアクセッション番号AF151103で入手可能である。ただし、実際の「+1」部は本明細書において図1に記載された配列の6番目のヌクレオチドであると現在決定されていることが留意されるべきである。

20

【0092】

実施者は、本発明のヌクレオチド配列を単離するためのPCRプライマーを作製するためにこの配列を使用することができる。LNCaP細胞は、~1.1 kbの転写物の配列の有用なcDNA源である。TCR遺伝子転移を受けていないヒト細胞、例えば、Tリンパ球前駆体以外の細胞由来のゲノムDNAは、転写の結果、~1.1 kb転写物に処理することができるより長い配列に有用である。配列は、周知の技法を使用して、本発明の関連する分子をコードする核酸を操作するように修飾することができる。

【0093】

本発明の配列を含む核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写に基づいた増幅系(transcription-based amplification system)(TAS)、自己持続性配列複製系(self-sustained sequence replication system)(SSR)およびQBレプリカーゼ増幅系(QB replicase amplification system)(QB)などのインビトロにおける方法によってクローニングまたは増幅することができる。例えば、タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、分子のDNA配列に基づいたプライマーを使用してcDNAのポリメラーゼ連鎖反応によって単離することができる。

30

【0094】

多種多様のクローニングおよびインビトロにおける増幅方法が当業者に周知である。PCR方法は、例えば、米国特許第4,683,195号、ムリス(Mullis)ら(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263、およびエルリッヒ(Erllich)編、「PCR技術(PCR TECHNOLOGY)」(Stockton Press, NY, 1989)に記載されている。ポリヌクレオチドはまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において望ましいポリペプチドの配列から選択されるプローブでゲノムまたはcDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても単離することができる。

40

【0095】

操作された形態の核酸は、タンパク質をコードする他のポリヌクレオチドの部位特異的な突然変異または0.1 mMのMnCl₂ およびアンバランスなヌクレオチド濃縮を用い

50

て元のポリヌクレオチドのPCRのエラー率を増加することによって生じるランダム突然変異によって作製することができる。

【0096】

1. 発現ベクター

本発明はまた、TARP転写物によってコードされるポリペプチドを発現するための発現ベクターを提供する。発現ベクターは、例えばmRNAの転写および翻訳のために、適当なプロモーター、複製配列、マーカを含ませることによって、原核細胞または真核細胞において機能するように適合させることができる。発現ベクターの構築およびトランスフェクトした細胞における遺伝子の発現は当該技術上周知の分子クローニング技法の使用に10
関係する。サムブルック(Sambrook)ら、「分子クローニング - 実験室マニュアル(MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL)」, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989)および「分子生物学における最新プロトコール(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)」, F. M. アウスーベル(Ausubel)ら編, («最新プロトコール(Current Protocols)」, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. および John Wiley & Sons, Inc.)この目的のために有用なプロモーターには、メタロチオネインプロモーター、構成性アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRP pol IIIIプロモーター、構成性MPSVプロモーター、(ヒト即時型CMVプロモーターなどの)テトラサイクリン誘導性CMVプロモーターおよび構成性CMVプロモーターが含まれる。遺伝子治療に有用なプラスミドは、選択可能なマーカ、識別領域および他の遺伝子などの他の機能的要素を含んでもよい。20

【0097】

本発明に有用な発現ベクターは目的の用途に依存する。このような発現ベクターは、当然のことながら、宿主細胞に適合する発現および複製シグナルを含有しなければならない。生物活性な結合物を発現するのに有用な発現ベクターは、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスなどのウイルスベクター、プラスミドベクター、コスミド等を含む。ウイルスベクターおよびプラスミドベクターが哺乳類細胞にトランスフェクトするの30
に好ましい。発現コントロール配列がCMVプロモーターを含む、発現ベクターpcDNA1(Invitrogen, San Diego, CA)は良好なトランスフェクション率および発現率を提供する。アデノ関連ウイルスベクターは本発明の遺伝子治療方法に有用である。

【0098】

例えば、溶液から細胞による分子の直接的な取り込み、リポフェクションによる取り込みの促進(例えば、リポソームまたはイムノリポソーム)、粒子媒介性トランスフェクションおよび抑制性ポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列に機能的に結合する発現コントロール配列を有する発現カセットからの細胞内発現を含む、種々の手段が細胞にポリヌクレオチドを送達するために利用可能である。米国特許第5,272,065号(Inouyeら)、「酵素学における方法(METHODS IN ENZYMOLOGY)」, vol. 185, Academic Press, Inc., San Diego, CA(D. V. Goeddel編)(1990)またはM. クリーガー(Krieger), 「遺伝子転移および発現 - 実験室マニュアル(GENE TRANSFER AND EXPRESSION - A LABORATORY MANUAL)」, Stockton Press, New York, NY, (1990)も参照のこと。遺伝子治療以外の手段によって送達するために本発明のポリヌクレオチドを作製するために組換えDNA発現プラスミドも使用することができるが、インビトロにおける化学合成によって短いオリゴヌクレオチドを作製することがより経済的である。40

【0099】

構築物はまたタンパク質の単離を容易にするために標識を含有してもよい。例えば、6つのヒスチジン残基のようなポリヒスチジン標識をタンパク質のアミノ末端部位に組み入れることができる。ポリヒスチジン標識により、ニッケル-キレートクロマトグラフィーによる1段階でタンパク質を簡便に単離することができる。

【0100】

2. 組換え細胞

本発明はまた、本発明のヌクレオチドを発現するための発現ベクターを含む組換え細胞を提供する。タンパク質を精製するために、高レベルの選択のために宿主細胞を選択することができる。細胞は大腸菌(E. coli)などの原核細胞または真核細胞であってもよい。有用な真核細胞には酵母および哺乳類細胞が挙げられる。細胞は、例えば、培養中の組換え細胞またはインビボにおける細胞であってもよい。

10

【0101】

TARPを発現する細胞は、これらのペプチドを発現する細胞に対して被験者を能動的または受動的に免疫化するのに有用である。ある態様において、細胞は細菌細胞である。一形態の能動免疫において、組換え細胞は、HLA分子に関連してポリペプチドを提示することができる被験者の自己細胞である。例えば、抗原提示細胞はこの目的に有用である。この場合には、「自己細胞」すなわち、被験者由来の細胞を使用することが好ましい。このような細胞はMHC適合性である。一目標が細胞表面上に高密度にポリペプチドを発現することであり、好ましくは健康な前立腺上皮細胞において発現されるよりより高密度にポリペプチドを発現させることであるので、TARPをコードするヌクレオチド配列はこのような細胞における構成性プロモーターのコントロール下におかれるべきである。

20

【0102】

V. TARPを発現する細胞に対する細胞媒介性免疫応答を誘発する方法

TARPは上皮起源の前立腺癌細胞および多数の乳癌細胞によって発現される。従って、TARPは、前立腺癌およびTARPを発現する乳癌を治療する際の治療の標的ならびに前立腺または乳房からそれぞれ転移した癌細胞のマーカーとして使用することができる。本発明は、免疫治療で前立腺癌およびTARPを発現する乳癌を治療する方法を提供する。本発明の方法は、TARPに対して被験者を免疫化し、それによってTARPを発現する細胞に対する細胞性免疫応答を誘発することに関係する。免疫化は能動的であっても、受動的であってもよい。能動免疫では、免疫応答はインビボにおいて被験者において誘発される。受動免疫では、ポリペプチドに対して活性化されたTc細胞がインビトロにおいて培養され、被験者に投与される。このような方法は、TARPを発現する健康な上皮性前立腺組織を破壊すると予測されることがある。しかし、前立腺は必須な器官ではない。前立腺の損失は前立腺癌により被験者の生命を損失する可能性を相殺するはずであり、前立腺は実際には、TARP免疫治療の開始前に外科的に切除されていることがある。正常な乳房組織をTARPを大量に発現するとは見いだされていないので、TARPを発現する細胞に対する免疫化により女性において正常な細胞を損失するとは思われない。従って、TARPを発現する乳癌が後に発症する事象において免疫防御を提供するために、TARP組成物を予防的に女性に投与することができる。

30

【0103】

免疫化する薬剤は、全長のTARP、TARPの抗原性決定因子を含むペプチド、例えばTARPの免疫原性断片またはTARPと実質的に同一であるタンパク質もしくはペプチドであってもよい。TARPに対する細胞性免疫応答を誘発しようとするとき、抗原性決定因子を含む好ましいペプチドは、被験者のHLA分子のための結合モチーフを保有するようなペプチドである。これらのモチーフは当該技術上周知である。例えば、HLA A2はヒト集団の共通の対立遺伝子である。この分子の結合モチーフには、2番めの位置にロイシンまたはメチオニンを有し、最後の位置にバリンまたはロイシンを有する9または10のアミノ酸を有するポリペプチドが含まれる。TARPのポリペプチド配列に基づいて、任意の特定のHLA分子のモチーフを保有するアミノ酸配列を同定することができる。これらのモチーフを含むペプチドは典型的な方法(例えば、組換え法、化学的方法等)

40

50

のいずれかによって作製することができる。TARPは自己タンパク質なので、HLA結合モチーフを保有する好ましいアミノ酸配列は亜優先的または潜在的なエピトープをコードするものである。そのようなエピトープは、分子の他のエピトープに対してまたはHLA分子に結合する他の分子と比較して、HLA分子に対する結合親和性の低さによって識別することができる。

【0104】

HLA結合モチーフを含むTARPのアミノ酸配列を含むポリペプチドも免疫応答を誘発するのに有用である。これは、一部には、このようなタンパク質は、HLA分子に結合することができ、TARPEピトープを有するペプチドに細胞によって処理されるからである。

10

【0105】

HLA分子とペプチド抗原の複合体は、HLAに制限されるT細胞によって認識されるリガンドとして作用する(Buus, S.ら、Cell 47: 1071, 1986; Babbitt, B. P.ら、Nature 317: 359, 1985; Townsend, A.およびBodmer, H., Annu. Rev. Immunol. 7: 601, 1989; Germain, R. N., Annu. Rev. Immunol. 11: 403, 1993)。1つのアミノ酸が置換された抗原を研究し、内因的に結合し、天然に処理されたペプチドを配列決定することにより、HLA抗原分子に対する特異的な結合に必要なモチーフに相当する重要な残基が同定されている(例えば、Southwoodら、J. Immunol. 160: 3363, 1998; Rammenseeら、Immunogenetics 41: 178, 1995; Rammenseeら、Sette, A.およびSidney, J. Curr. Opin. Immunol. 10: 478, 1998; Engelhard, V. H., Curr. Opin. Immunol. 6: 13, 1994; Sette, A.およびGrey, H. M., Curr. Opin. Immunol. 4: 79, 1992)。

20

【0106】

さらに、HLA-ペプチド複合体のx線結晶解析分析は、ペプチドリガンドによって形成される残基を対立遺伝子特異的に収容するHLA分子のペプチド結合間隙内にポケットを明らかにしており、これらの残基が、それらが存在するペプチドのHLA結合能力を決定する(例えば、Madden, D. R. Annu. Rev. Immunol. 13: 587, 1995; Smithら、Immunity 4: 203, 1996; Fremontら、Immunity 8: 305, 1998; Sternら、Structure 2: 245, 1994; Jones, E. Y. Curr. Opin. Immunol. 9: 75, 1997; Brown, J. H.ら、Nature 364: 33, 1993.)

30

【0107】

従って、I型およびII型対立遺伝子特異的HLA結合モチーフまたはI型もしくはII型スーパーモチーフを規定することにより、特定のHLA分子に結合する可能性を有する領域をTARP内で同定することができる。

40

【0108】

TARPと高レベルの配列の同一性を有する分子も免疫応答を誘発するのに有用である。このような分子は免疫系に対して「異種」として認識されることができ、さらに、TARPと交差反応する抗体またはCTLを作製する。TARPと高い配列の同一性を有する分子には、非ヒトTCR相同物、特に霊長類由来のものが含まれる。アミノ酸配列がTARPと少なくとも90%同一であり(TARPと91%、92%、93%、94%、95%またはさらに高い配列の同一性を有してもよいが)、TARPに特異的に結合する抗体によって特異的に結合されるTARP類似物を使用することができる。TARP類似物、すなわち、アミノ酸配列がTARPと少なくとも90%同一であり(TARPと91%、92%、93%、94%、95%またはさらに高い配列の同一性を有してもよいが)、T

50

A R Pを発現する細胞に対するTリンパ球を活性化するペプチドがこれに関してさらに有用である。

【0109】

T A R P抗原性決定因子に実質的に相同である別の分子は、H L A分子に対してより高い親和性で結合するように、天然のT A R Pエピトープの配列を改変することによって作製することができる。

【0110】

抗原性決定因子をコードする遺伝子を同定する1つの方法は以下のものである：転移癌を有する被験者のT I Lを増殖させ、インビトロにおいて自己癌を認識する能力について試験する。腫瘍退縮を生ずるものを同定するために、これらのT I Lを被験者に投与する。T I Lは、T I Lによって認識されるエピトープを発現する遺伝子について発現ライブラリーをスクリーニングするために使用される。次いで、これらの遺伝子で被験者を免疫化する。または、リンパ球をこれらの遺伝子によってコードされる抗原に対してインビトロにおいて感作する。次いで、感作したリンパ球を養子的に被験者に導入し、腫瘍退縮を生ずる能力について試験する。ローゼンバーグ (R o s e n b e r g) ら, (1 9 9 7) I m m u n o l . T o d a y 1 9 9 7 1 8 : 1 7 5 .

10

【0111】

これらの分子の用途をここで記載する。これらの方法はローゼンバーグ (R o s e n b e r g) ら (1 9 9 7) I m m u n o l . T o d a y 1 8 : 1 7 5 およびR e s t i f o ら (1 9 9 9) O n c o l o g y 1 1 : 5 0 にも記載されている。

20

【0112】

免疫応答を誘発する1つの方法は、被験者をT A R Pの抗原性決定因子を含むポリペプチドで単独で、またはさらに好ましくは、フロインドの不完全アジュバント、脂質またはリポソーム、g p 9 6、H s p 7 0またはH s p 9 0などのアジュバントと併用して免疫化することに関係する。ポリペプチドはT A R P、T A R Pの抗原性断片、抗原性決定因子を含む融合タンパク質またはこのような抗原性決定因子と実質的に同一な配列を含むペプチドであってもよい。

【0113】

別の方法は、T A R Pのエピトープを含むポリペプチドを抗原提示細胞に修飾し、その細胞を被験者に投与することに関係する。

30

【0114】

別の方法において、発現カセットにT A R Pの抗原性決定因子を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含有する組換えウィルスを被験者に投与する。ウィルスはまた、選択的に、免疫応答を増強するサイトカイン (例えば、I L - 2)、同時刺激分子または他の遺伝子をコードすることもできる。ウィルスは、例えば、アデノウィルス、鶏痘ウィルスまたはワクシニアウィルスであってもよい。感染の結果、感染細胞はT A R Pペプチドを発現し、抗原性決定因子と同じモチーフを有するペプチドに結合するH L A分子と組み合わせる細胞表面上に抗原性決定因子を発現する。次いで、これらの細胞は、提示されている抗原を認識するC T Lの活性化を刺激し、決定因子も保有する癌細胞を破壊する。

40

【0115】

別の方法において、被験者は、T A R Pの抗原性決定因子を含むポリペプチドをコードする未処理のD N Aで、例えば筋肉内、微粒子銃注射または脂質に結合した状態によって免疫化される。このような方法は、コードされたペプチドを発現する細胞に対する細胞性免疫応答を刺激することが示されている。

【0116】

別の方法において、エピトープを発現し、選択的に免疫応答を増強するサイトカイン、同時刺激分子または他の遺伝子もコードするカルメット - グラン菌 (B a c i l l u s C a l m e t t e - G u e r i n) (B C G)、サルモネラ菌 (S a l m o n e l l a) またはリステリア (L i s t e r i a) などの組換え細菌が被験者に投与される。

【0117】

50

別の方法において、抗原を発現する細胞を被験者に投与する。これには、例えばTARPエピトープで標識した樹状細胞、TARP抗原性決定因子、HLAおよびB7遺伝子を含むポリペプチドをトランスフェクトした細胞が含まれる。多重トランスフェクションにより、細胞表面に抗原性決定因子を提示するのに必要ないくつかの構成要素が作製される。一態様において、分子は、HLA分子に対するペプチドの結合を改善するように、抗原性決定因子を保有するポリペプチドがHLA分子に（通常はリンカーにより融合されている）融合タンパク質である。一態様において、細胞は抗原提示細胞である。好ましくは、細胞は真核細胞であり、さらに好ましくは哺乳類細胞であり、さらに好ましくはヒト細胞であり、さらに好ましくは被験者由来の自己ヒト細胞である。

【0118】

10

別の方法において、抗原提示細胞（APC）はインビトロにおいてTARPのエピトープを含むペプチドで標識されるかまたは同時インキュベーションされる。これらの細胞は、前立腺癌腫瘍の腫瘍浸潤性リンパ球または末梢血リンパ球などの、CD8細胞を感作するために使用される。TILまたはPBLは好ましくは被験者由来である。しかし、それらは、少なくとも被験者が保有するHLA型に制限されるI型MHCでなければならない。次いで、感作した細胞を被験者に投与する。

【0119】

補足的な方法において、これらの免疫治療の任意のものはIL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-15、GM-CSF、インターフェロンなどのサイトカインを投与することによって増強される。

20

【0120】

上記のペプチドの免疫原性を評価するための方法以外に、免疫原性は、正常な個人由来の初代T細胞培養物を評価すること（例えば、Wentworth, P. A.ら、Mol. Immunol. 32: 603, 1995; Celis, E.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2105, 1994; Tsai, V.ら、J. Immunol. 158: 1796, 1997; Kawashima, I.ら、Human Immunol. 59: 1, 1998を参照）、HLAトランスジェニックマウスの免疫化（例えば、Wentworth, P. A.ら、J. Immunol. 26: 97, 1996; Wentworth, P. A.ら、Int. Immunol. 8: 651, 1996; Alexander, J.ら、J. Immunol. 159: 4753, 1997を参照）および効果的にワクチン形成された患者または腫瘍を有する患者のリコールT細胞応答を実証すること（例えば、Rehermann, B.ら、J. Exp. Med. 181: 1047, 1995; Doolan, D. L.ら、Immunity 7: 97, 1997; Bertoni, R.ら、J. Clin. Invest. 100: 503, 1997; Threlkeld, S. C.ら、J. Immunol. 159: 1648, 1997; Diepolder, H. M.ら、J. Virol. 71: 6011, 1997を参照）によっても評価することができる。

30

【0121】

ワクチン組成物のために関心のあるCTL誘導性ペプチドを選択する際に、I型HLA分子に対するより高い結合親和性を有するペプチドが一般に好ましい。ペプチドの結合は、インビトロにおいて精製されたHLA分子に候補ペプチドが結合する能力を試験することによって評価される。

40

【0122】

ワクチンとして使用するとき、TARP類似物が実際にインビボにおいてTARPに対するCTL応答を確実に誘発するために（または、II型エピトープの場合には、野生型ペプチドと交差反応するヘルパーT細胞を誘発する）、TARP類似物は、適当なHLA対立遺伝子の個人由来のT細胞をインビトロにおいて免疫化するために使用することができる。その後、TARP感作した標的細胞の融解を誘発する免疫化した細胞の能力を評価する。

50

【0123】

さらに一般的には、TARPまたはその類似物のペプチド（「本発明のペプチド」を合成し、HLAタンパク質に結合してHLAもしくはCTL応答または両方を活性化する能力について試験することができる。）

【0124】

T細胞応答を検出するために使用される従来のアッセイ法には、増殖アッセイ法、リンホカイン分泌アッセイ法、直接細胞毒性アッセイ法および限界希釈アッセイ法が挙げられる。例えば、ペプチドと共にインキュベーションされた抗原提示細胞を、免疫応答細胞集団においてCTL応答を誘発する能力についてアッセイすることができる。

【0125】

PBMCを、CTL前駆体の免疫応答細胞源として使用することができる。適当な抗原提示細胞をペプチドと共にインキュベーションし、その後ペプチド付加した抗原提示細胞を次いで最適な培養条件下において免疫応答細胞集団と共にインキュベーションする。放射性標識した標的細胞、特定のペプチド標識した標的ならびにペプチド配列が誘導された内因的に処理された形態の抗原を発現する標的細胞の両者を死滅させるCTLの存在について培養物をアッセイすることによって陽性のCTL活性化を判定することができる。

【0126】

抗原特異的T細胞の直接定量を可能にする方法は、フルオレセイン標識したHLAテトラマー複合体による染色である（Altmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330 (1993); Altmanら、Science 274: 94 (1996)）。または、細胞内リンホカインの染色、インターフェロン-放出アッセイ法またはELISPOTアッセイ法をT細胞応答を評価するために使用することができる。

【0127】

HLA活性化は、T細胞増殖、IL-2のようなリンホカインの分泌などの当業者に周知の技法を使用して評価することができる（例えば、Alexanderら、Immunity 1: 751-761 (1994)）。

【0128】

VI. TARPに対する抗体

一局面において、本発明は、TARPに特異的に結合する抗体を含む組成物を提供する。抗体は、好ましくは、少なくとも $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ または $10^9 M^{-1}$ の親和性を有する。本発明はポリクローナル抗体組成物およびモノクローナル抗体組成物の両方を含む。

【0129】

TARPに特異的に結合する抗体を形成するために数多くの免疫原を使用することができる。全長のTARPは好適な免疫原である。典型的には、関心のある免疫原は少なくとも約3アミノ酸のペプチドであり、さらに典型的には、ペプチドは鎖長が少なくとも5アミノ酸であり、好ましくは断片は鎖長が10アミノ酸であり、さらに好ましくは断片は鎖長が少なくとも15アミノ酸である。ペプチドは担体タンパク質に結合されてもよく（例えば、融合タンパク質として）または免疫ペクター内で組換えにより発現される。抗体が結合するペプチドの抗原性決定因子は、典型的には、鎖長が3アミノ酸～10アミノ酸である。天然型ポリペプチドも純粋な形態または純粋でない形態で使用される。

【0130】

組換えポリペプチドは真核細胞または原核細胞において発現され、標準的な技法を使用して精製される。次いで、ポリペプチドまたはその合形成態を、抗体を形成することができる動物に注射する。ポリペプチドの存在および量を測定するための免疫アッセイ法にその後使用するためのモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を作製することができる。

【0131】

ポリクローナル抗体を作製するための方法は当業者に既知である。簡単に説明すると、免

10

20

30

40

50

疫原、好ましくは精製したポリペプチド、適当な担体（例えば、GST、キーホールリンペットヘモシアニン等）に結合したポリペプチドまたは組換えワクシニアウイルスなどの免疫化ベクターに組み入れたポリペプチド（米国特許第4,722,848号を参照）をアジュバントと混合し、この混合物で動物を免疫する。採血し、関心のあるポリペプチドに対する反応力価を求めることによって免疫原調製物に対する動物の免疫応答をモニターする。免疫原に対する適度に高い力価の抗体が得られたら、動物から採血し、抗血清を調製する。望ましい場合には、ポリペプチドに反応性の抗体を濃縮するために抗血清のさらなる分画化を実施する。例えば、コーリガン（Coligan）（1991）「免疫学の最新プロトコール（CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY）」Wiley/Greene, NY; ならびにハーロウ（Harlow）およびレーン（Lane）（1989）「抗体：実験室マニュアル（ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL）」Cold Spring Harbor Press, NY. を参照。

10

【0132】

TARPの所定の断片に対する結合断片および1本鎖組換え形態を含む抗体を、例えば断片の上記の担体タンパク質との結合物で動物を免疫化することによって形成する。

【0133】

モノクローナル抗体は、望ましい抗体を分泌する細胞から調製される。これあらの抗体は、通常のポリペプチドまたは修飾ポリペプチドに対する結合についてスクリーニングされるか、または作用性または拮抗性についてスクリーニングされる。マウス、齧歯類、霊長類、ヒト等などの種々の哺乳類からモノクローナル抗体を調製することが望ましい場合もある。このようなモノクローナル抗体を調製するための技法の説明は、例えばスティーツ（Stites）ら（編）、「基礎的、臨床的免疫学（BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY）」（第4版）Lange Medical Publications, Los Altos, CA, およびそこに引用されている参考文献、ハーロウ（Harlow）およびレーン（Lane）, 前記、Goding（1986）「モノクローナル抗体：原理と実践（Monoclonal Antibodies: Principles and Practice）」（第2版）Academic Press, New York, NY; およびコーラー（Kohler）およびミルシュタイン（Milstein）（1975）Nature 256: 495-497に見いだされる。

20

30

【0134】

他の好適な技法はファージまたは同様のベクターにおいて組換え抗体のライブラリーを選択することに関係する。フーセ（Huse）ら（1989）Science 246: 1275-1281; およびワード（Ward）ら（1989）Nature 341: 544-546。

【0135】

また、組換え免疫グロブリンを作製することができる。米国特許第4,816,567（Cabilly）; およびクイーン（Queen）ら（1989）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033参照。

40

【0136】

しばしば、ポリペプチドおよび抗体は、共有結合または非共有結合により、検出可能なシグナルを提供する物質を結合することによって標識される。多種多様の標識および結合技法が周知で、科学的な文献および特許文献に広範に報告されている。従って、分析物を検出するために使用される抗体は検出可能な部分で直接標識されても、または例えば、それ自体直接または間接的に標識されている二次抗体に抗体を結合することによって間接的に標識されてもよい。

【0137】

本発明の抗体はまた、TARPを単離する際にアフィニティークロマトグラフィーに使用される。カラムは、細胞溶解物をカラムに通し、洗浄し、精製されたTARPを放出され

50

る軽度な変性剤の濃度を増加させて処理する例えばアガロース、セファデックス等などの粒子のような固相支持体に結合した抗体を用いて調製される。

【0138】

別の方法は、非ヒト抗体のCDR領域を組換えDNA技法によってヒトの不変領域に結合することによって、ヒト化免疫グロブリンを作製することである。米国特許番号第5,585,089号(Queenら)を参照。

【0139】

ヒトモノクローナル抗体またはその結合断片をコードするDNA配列を単離するためのさらに別の方法は、フーセ(Huse)ら、Science 246: 1275-1281(1989)に概略が示されている一般的なプロトコールによりヒトB細胞のDNAライブラリーをスクリーニングし、次いで望ましい特異性の抗体(または結合断片)をコードする配列をクローニングし増幅することによる。Huseによって記載されているプロトコールは、ファージディスプレイ技術と併用するとより効率的になる。例えば、国際公開公報第91/17271号(Dowerら)および国際公開公報第92/01047号(McCaffertyら)を参照。ファージディスプレイ技術はまた、TARPに対する親和性を有することが以前に示されている抗体のCDR領域を突然変異させるために使用することができる。結合親和性が改善された抗体が選択される。

【0140】

本発明の別の態様において、TARPまたはタンパク質類似物に対する抗体の断片が提供される。典型的には、これらの断片は完全な免疫グロブリンと同様のTARPへの特異的な結合を示す。抗体断片には別個の重鎖、軽鎖Fab、Fab'F(ab')₂およびFvが含まれる。断片は組換えDNA技法または無傷の免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的分離によって作製される。

【0141】

VII.TARPを標的とするキメラ分子

本発明は、TARPを標的とするキメラ分子を提供する。キメラ分子は、標的部分とエフェクター部分とを含む。キメラタンパク質は、ポリペプチドおよびポリペプチドを保有する細胞を検出する際に有用である。

【0142】

A. 標的部分

本発明のキメラ分子は標的部分を含む。標的部分は、TARPに特異的に結合するリガンドを含む。好ましいリガンドは、抗体の結合断片を含む、その用語が本明細書において使用されるとおりの抗体である。しかし、これらの分子の他の天然のリガンドを使用することもできる。

【0143】

B. エフェクター部分

エフェクター部分は、抗体、増殖因子またはリガンドなどの別の特異的な結合部分であってもよい。次いで、キメラ分子は特異性の高い二官能性リンカーとして作用する。このリンカーは、融合タンパク質が結合する細胞または細胞成分を結合し、細胞または細胞成分間の相互作用を増強する作用をする。

【0144】

よりさらに別の態様において、エフェクター分子は、薬剤(例えば、薬物)または薬剤を含有する溶媒であってもよい。従って、TARPに特異的に結合する部分を、ピンブラスチン、ドキシソルピシン、ゲニステイン(genistein)(チロシンキナーゼ阻害剤)、アンチセンス分子および当業者に周知の他の薬剤などの薬物に結合し、それによって薬剤を腫瘍細胞に特異的に標的化することができる。

【0145】

または、標的部分を、治療用組成物を含有する溶媒に結合してもよい。このような溶媒には、リポソーム、ミセル、種々の合成ビーズ等が含まれるが、これらに限定されない。

【0146】

10

20

30

40

50

当業者は、本明細書のキメラ分子は1つのエフェクターに結合される多数の標的部分を含んでもよく、逆に、1つの標的部分に結合される多数のエフェクター分子を含んでもよいことを理解している。本発明のキメラ分子のエフェクター分子成分として使用するのに好適な検出可能な標識には、全て上記されている分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的な手段によって検出可能な任意の組成物を含む。

【0147】

当業者は、標的部分およびエフェクター分子は任意の順序で一体として結合されてもよいことを理解している。従って、標的分子がポリペプチドである場合には、エフェクター分子は標的分子のアミノ末端またはカルボキシ末端に結合することができる。結合が分子のそれぞれの活性を妨害しないかぎり、標的分子はまた、エフェクター分子の内部領域に結合してもよく、逆に、エフェクター分子は標的分子の内部位置に結合してもよい。

10

【0148】

標的分子およびエフェクター分子は、当業者に周知の数多くの手段のいずれかによって結合することができる。典型的には、エフェクター分子は直接的またはリンカー（スパーサー）によって、標的分子に結合される。しかし、エフェクター分子および標的分子のどちらもポリペプチドである場合には、1本鎖融合タンパク質としてキメラ分子を組換えによって発現することが好ましい。

【0149】

一態様において、標的分子はエフェクター分子に化学的に結合される（例えば、サイトトキシン、標識、リガンドまたは薬物もしくはリポソーム）。化学的に分子を結合する手段は当業者に周知である。薬剤を抗体または他のポリペプチド標的分子に結合するための手法は、薬剤の化学構造により異なる。ポリペプチドは典型的には、エフェクターを結合するためにエフェクター分子の好適な官能基と反応するのに利用可能である、カルボン酸基（COOH）または遊離アミン基（-NH₂）のような種々の官能基を含有する。または、標的分子および/またはエフェクター分子は、別の反応性官能基に暴露または結合されるように誘導体化されることができる。誘導体化は、ピアス化学会社（Pierce Chemical Company）、ロックフォード、イリノイ州、から入手可能なものなどの数多くのリンカー分子のいずれかの結合に関係してもよい。

20

【0150】

特定の薬剤の基と反応する1つの官能基および抗体と反応する別の基を有する二官能性リンカーを使用して、望ましい免疫結合物を形成することができる。または、誘導体化は、過ヨウ素酸塩により糖タンパク質抗体の糖部分をグリコール切断して、遊離のアルデヒド基を形成するような、標的分子の化学的処理を含んでもよい。抗体の遊離のアルデヒド基は、薬剤の遊離のアミンまたはヒドラジン基と反応して、薬剤を結合することができる。（米国特許第4,671,958号参照）。抗体または抗体断片などのポリペプチドに遊離のスルフィドリル基を形成する手法も周知である（米国特許第4,659,839号参照）。

30

【0151】

放射性核種金属キレート、毒素および薬物を含む種々の化合物を抗体などのタンパク質に結合するための多数の手法およびリンカー分子は周知である。例えば、欧州特許出願番号第188,256号、米国特許第4,671,958号、同第4,659,839号、同第4,414,148号、同第4,699,784号、同第4,680,338号、同第4,569,789号および同第4,589,071号ならびにボーリングハウス（Borlinghaus）ら、Cancer Res. 47: 4071-4075（1987）を参照。特に、種々のイムノトキシンの作製は当該技術上周知であり、例えば、「モノクローナル抗体-トキシン接合体（Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates）：マジックブレット（the Magic Bullet）用」、トープ（Thorpe）ら、臨床医薬におけるモノクローナル抗体（MONOCLONAL ANTIBODIES IN CLINICAL MEDICINE）、Academic Press, pp. 168-190（1982）、ウォルドマン（Waldm

40

50

ann), Science, 252: 1657 (1991)、米国特許第4,545,985および同第4,894,443号に見いだすことができる。

【0152】

標的分子および/またはエフェクター分子が比較的短い場合には(すなわち、約50未満のアミノ酸)、標準的な化学的ペプチド合成技法を使用してそれらを合成することができる。両分子が比較的短い場合には、基分子は1つの連続ポリペプチドとして合成することができる。または、標的分子およびエフェクター分子を別個に合成し、次いで一方の分子のアミノ末端と他方の分子のカルボキシ末端とを縮合し、それによってペプチド結合を形成することによって融合することができる。または、標的およびエフェクター分子を各々ペプチドスペーサー分子の一方の末端に縮合し、それによって連続する融合タンパク質を形成することができる。

10

【0153】

配列のC末端アミノ酸を不溶性支持体に結合し、次に配列の残りのアミノ酸を逐次的に付加する固相合成は、本発明のポリペプチドの化学的合成の好ましい方法である。固相合成の技法は、バレニー(Barany)およびメリフィールド(Merrifield), 「固相ペプチド合成法(Solid-Phase Peptide Synthesis)」; pp. 3-284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 2巻: 「ペプチド合成における特別方法(Special Methods in Peptide Synthesis)」, パートA、メリフィールド(Merrifield)ら、J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963)、およびスチュワート(Stewart)ら、「固相ペプチド合成(Solid Phase Peptide Synthesis)」, 第2版、ピアス化学会社(Pierce Chem. Co.)、ロックフォード、イリノイ州(1984)によって記載されている。

20

【0154】

好ましい態様において、キメラ融合タンパク質は組換えDNA方法を使用して合成される。一般に、これは、融合タンパク質をコードするDNA配列を作製し、発現カセット中にこのDNAを特定のプロモーターのコントロール下におき、宿主においてタンパク質を発現させ、発現したタンパク質を単離し、必要があれば、タンパク質を再生することに関係する。

30

【0155】

本発明の融合タンパク質をコードするDNAは、例えば、ナラング(Narang)ら、Meth. Enzymol. 68: 90-99 (1979)のホスホトリエステル方法、ブラウン(Brown)ら、Meth. Enzymol. 68: 109-151 (1979)のホスホジエステル方法、ビューケージ(Beaucage)ら、Tetra. Lett., 22: 1859-1862 (1981)のジエチルホスホルアミダイト方法および米国特許第4,458,066号の固相支持体方法などの方法による適当な配列のクローニングおよび制限または直接的な化学的合成を含む任意の好適な方法によって作製することができる。

【0156】

2つの分子は、好ましくは、本質的には直接一体として結合されるが、当業者は、分子は、1つ以上のアミノ酸からなるペプチドスペーサーによって分離されていてもよいことを理解している。一般に、スペーサーは、タンパク質を結合するまたはタンパク質の間に最低の距離または他の空間的な関係を維持する以外には特定の生物的作用を持たない。しかし、スペーサーの構成アミノ酸は、折りたたみ、総電荷または疎水性などの分子のいくつかの特性に影響を与えるように選択することができる。

40

【0157】

融合タンパク質をコードする核酸配列は、大腸菌(E. coli)、他の細菌宿主、酵母およびCOS、CHOおよびHeLa細胞系統などの種々の高等真核細胞ならびに骨髄腫細胞系を含む種々の宿主細胞において発現することができる。組換えタンパク質遺伝子

50

は、各宿主の適当な発現コントロール配列に機能的に結合される。大腸菌 (*E. coli*) では、これは *T7*、*trp* または プロモーターなどのプロモーター、リボソーム結合部位を含み、好ましくは転写停止シグナルを含む。真核細胞では、コントロール配列はプロモーターを含み、好ましくは免疫グロブリン遺伝子、*SV40*、サイトメガロウイルス等由来のエンハンサーおよびポリアデニル化配列を含み、スプライズドナーおよびアクセプター配列を含んでもよい。本発明のプラスミドおよびベクターは、大腸菌 (*E. coli*) の塩化カルシウム形質転換および哺乳類細胞のリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションなどの周知の方法によって選択された宿主細胞に導入することができる。

【0158】

一旦発現されたら、組換え融合タンパク質を、硫酸アンモニウム沈降、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む当該技術の標準的な手法により精製することができる (一般に、*R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, METHODS IN ENZYMOLOGY Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)* を参照)。薬学的用途には少なくとも約 90~95% の均一性で実質的に純粋な組成物が好ましく、98~99% 以上の均一性が最も好ましい。部分的または望ましい均一性にまで一旦精製されたら、ポリペプチドを治療的に使用することができる。

【0159】

VIII. TARP を発現する細胞を検出する方法

別の局面において、本発明は、TARP を発現する細胞を検出する方法を提供する。本発明の方法は、TARP 転写物またはポリペプチドを検出することに関係する。上皮起源の前立腺癌細胞および多数の乳癌細胞が TARP を発現するので、検出方法は、前立腺癌および TARP を発現する乳癌を検出する際に有用である。特に、前立腺癌細胞および多数の乳癌細胞は、TARP を発現することによって他の細胞から識別することができる。

【0160】

前立腺および乳房を含む原発癌または転移癌の任意の可能な部位ならびにリンパ節および他の器官などの遠位部位から組織試料を選択することができる。当業者は、女性だけでなく男性が乳癌に罹患することに気づいている。男性における乳癌は比較的まれであり、全ての乳癌の症例の約 1% しか占めていない。しかし、男性の乳癌は一般的ではないので、生存の可能性に影響与える後期に診断されることが多い。従って、男性における乳癌の診断の改善が望ましい。

【0161】

1つの方法において、被験者に生体試料検査を実施し、採取した組織をインビトロにおいて試験する。典型的には、細胞は、核のタンパク質を変性させることなく、核のタンパク質に接近できるように、細胞溶解、超音波破壊、浸透圧、凍結および融解、酵素的な処理または当該技術上通常の他の手段によって破壊される。細胞内容物 (または、内容物が分画化されている場合には、核内容物) を次いで、例えば抗 TARP 抗体に接触させる。結果として生ずる任意の免疫複合体は生検試料中の TARP の存在を示す。このような検出を容易にするために、抗体を放射性標識しても、放射性標識されているエフェクター分子に結合してもよい。別の方法において、細胞は、典型的な画像形成方法を使用してインビボにおいて検出することができる。例えば、本発明の方法は、細胞の核に到達することができる標識組成物の被験者への投与に関係する。次いで、標識の局在化を、標識を検出するための既知の方法のいずれかによって測定する。画像診断を可視化するための任意の従来の方法を使用することができる。例えば、常磁性同位体を MRI に使用することができる。

【0162】

TARP の検出

TARPは、当該技術上周知の任意の方法によって同定することができる。一態様において、本発明の方法は、ポリペプチドを特異的に認識するリガンドを用いてポリペプチドを検出することに関係する（例えば、免疫アッセイ法）。本発明の抗体は、TARPの特異的な検出に特に有用である。抗体に基づいた種々の検出方法が当該技術上周知である。これらには、例えば、放射免疫アッセイ法、サンドイッチ免疫アッセイ法（ELISAを含む）、免疫蛍光アッセイ法、ウェスタンブロット、アフィニティークロマトグラフィー（固相に結合したアフィニティリガンド）および標識抗体を用いたインサイチュー検出が挙げられる。TARPを検出する別の方法は、例えば、ゲル電気泳動、質量分析法またはHPLCによってその質量によりポリペプチドを同定することに関係する。被験者の試料は、唾液、腹液、血液または血液産物（例えば、血清）、組織生検（例えば、リンパ節組織）等などの任意の数の適当な起源から採取することができる。

10

【0163】

TARPは、インビトロにおいて、生検試料においておよび上記の画像形成方法を使用してインビボにおいて細胞中で検出することができる。

【0164】

TARPをコードする転写物の検出

TARP転写物を発現する細胞は、転写物に特異的にハイブリダイズする核酸プローブを試料に接触させ、ハイブリダイゼーションを検出することによって検出することができる。これには、例えば、標識したプロモーターを試料に接触させ、結合した標識を検出することによってハイブリダイゼーションを検出するインサイチューハイブリダイゼーションの方法を含む。しかし、試料中に存在する転写物の両は少量であることがある。従って、他の方法は、RT-PCR法などの増幅を使用している。これらの方法では、mRNAからTARP配列を特異的に増幅する増幅プライマーとして機能するプローブを選択する。次いで、増幅した配列を典型的な方法を使用して検出する。

20

【0165】

プローブは、TARP転写物と特異的にハイブリダイズするように選択される。一般に、相補的なプローブを使用する。しかし、プローブがストリンジェントな条件下において、ハイブリダイズするのに十分な配列の相溶性および鎖長を有する場合には、プローブは正確に相補的である必要はない。

【0166】

IX. 薬学的組成物

別の局面において、本発明は、薬学的に許容されうる担体と本発明の組成物とを含む薬学的組成物を提供する。

30

【0167】

一態様において、薬学的組成物はTARP、TARPエピトープを含むポリペプチドなどのその免疫原性断片またはTARP類似物を、被験者において細胞性免疫応答または液性免疫応答を誘発するのに有効な量を含む。例えばMHC結合モチーフを保有するポリペプチド。このような薬学的組成物は本発明の治療方法におけるワクチンとしておよび抗体を作製するために有用である。

【0168】

別の態様において、薬学的組成物は、被験者においてTARPを発現する細胞に対する免疫応答を誘発するのに有効な量の、TARPポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。このような組成物はまた、本発明の治療方法に有用である。

40

【0169】

別の態様において、薬学的組成物は、関心のある細胞においてTARPの発現を調節するために、TARPをコードするヌクレオチド配列を特異的に切断することができるリボザイム、このような核酸に結合することができるアンチセンス分子またはTARPをコードする核酸を含む発現カセットを含む。

【0170】

さらに別の態様において、薬学的組成物は、TARPを発現する細胞を検出し得るために

50

、標的分子および検出分子を含むキメラ分子を含むことができる。検出分子が、TARPをコードする核酸に特異的に結合することができるものである場合には（TARPをコードするDNAに特異的に結合することができるDNA結合タンパク質など）、その核酸を発現する細胞を検出するために組成物を使用することができる。

【0171】

本発明の薬学的組成物は、被験者に投与するための単位投与剤形で製剤化することができる。投与量および投与時期は、望ましい目的を実施する担当医の選択の範囲である。

【0172】

実施例

実施例1 前立腺細胞におけるT細胞受容体鎖の検出

T細胞受容体鎖(TCR)mRNAがヒト前立腺で発現していることを同定し、それが前立腺上皮細胞に由来し、浸潤性Tリンパ球には由来しないことを示した。対照的にT細胞受容体鎖(TCR)遺伝子はヒト前立腺ではサイレントである。前立腺における主要なTCR転写物は胸腺、脾臓および血液リンパ球で発現されている転写物とは異なるサイズを有する。正常前立腺上皮、前立腺アデノカルチノーマおよび前立腺アデノカルチノーマ細胞株LNCaPにおいてそれは発現している。そのRNAは未再構成TCR座位に由来し、J1.2遺伝子セグメントの直接上流のイントロン配列内から開始されている。前立腺特異的TCR転写物はJ1.2およびC1遺伝子セグメントからなり、3'末端にポリアデニル化シグナルおよびポリ(A)配列を含む非翻訳配列を有する。Tリンパ球でのみ限定的に発現されていると考えられていた遺伝子から前立腺上皮細胞が高いレベルの転写物を発現するという発見は新規で非常に予想外である。

【0173】

1. 材料および方法

RNAドットプロット法およびノーザンプロットハイブリダイゼーション法

RNAドットプロット法(RNAマスタープロット、クロンテック、パロアルト、カリフォルニア州)が様々なヒト組織に関して実施した。ノーザンプロット法はまた前立腺アデノカルチノーマ細胞株LNCaPおよびPC-3(ATCC、ロックビル、メリーランド州)由来のmRNAに関して実施した。ポリ(A)RNAの単離はファストトラック(FastTrack)キット(インビトロジェン(Invitrogen)、カールスバッド、カリフォルニア州)を用いて実施した。RNAを、確立された方法に従い、1%アガロースゲル中で電気泳動し、ナイロン性の膜(ジーンスクリーンプラス(GeneScreen Plus)、デュポン、ウィルミントン、ドイツ)に転写した。オースベル(Ausubel)、上述。TCR転写物の非翻訳3'末端(3'UTR)に特異的なcDNAプローブをESTプラスミドng79d11(ゲノムシステムズ(Genome Systems)、セントルイス、ミズーリ州)から作製した。TCR転写物の定常領域(TCRC)に特異的なプローブはLNCaPcDNAから作製し、TCR転写物の定常領域(TCRC)のプローブはTCRプラスミドから作製した。ヒトアクチンプローブをmRNA調製の品質対照として使用した。プローブは³²Pを用いてランダムプライマー伸長(ロフストランドラポリミテッド(Lofstrand Labs Limited)、ゲイザースバーグ、メリーランド州)により1μCi/ngの比活性で標識した。RNA膜は50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液(ハイブリゾルI(Hybridisole I)、オンコー(Oncor)、ゲイザースバーグ、メリーランド州)中にて45℃2時間ブロッキングし、その後20mlのハイブリダイゼーション溶液中で20μCiのcDNAを用いて45℃、15時間プロービングした。膜は2xSSC/0.1%SDS中で室温にて15分間、2回洗浄され、0.1xSSC/0.1%SDS中で55~65℃にて20分間、2回洗浄された。膜を現像前に、-80℃にてイメージングフィルム(X-OMAT、コダック、ロチェスター、ニューヨーク州)に露光した。

【0174】

RNAインサイチュハイブリダイゼーション法

TCR 定常領域および TCR 非翻訳 3' 末端ヌクレオチド配列は逆転写酵素 PCR (RT-PCR) により LNCaP mRNA から増幅し、プラスミドブルースク립ト IISK (pBluescript IISK) (ストラタジーン、ラホヤ、カリフォルニア州) にクローン化し、DNA 配列決定により確認した。アンチセンスおよびセンス TCR の^{3'5'} S リボプローブは各々、T7 および T3 RNA ポリメラーゼにより作製した。国立癌研究所 (NCI) から、保管されていた 8 症例の前立腺経尿道切徐標本のパラフィンブロックを検索した。悪性および良性両方の前立腺管を含む症例を選択した。症例の平均年齢は 69 歳であり、腫瘍のグリーソン (Gleason) スコアは 3 + 3 = 6 / 10 から 4 + 5 = 9 / 10 の範囲であった。ブロックはスライドガラス上で処理し、リボプローブ (モレキュラーヒストロジー (Molecular Histology)、ゲイザースバーグ、メリーランド州) を用いてハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションに続き、スライドをヘマトキシリンおよびエオジンを用いて対比染色し、明視野および暗視野を提供する可変コンデンサーを具備したツァイスアキシオフォト顕微鏡 (Zeiss AxioPhot Microscope) を用いて検査した。

10

【0175】

RT-PCR 解析

1 本鎖 cDNA を各々 150 ~ 250 ng の LNCaP および PC-3 ポリ (A) mRNA からオリゴ dT プライミング (ファルマシアバイオテク、ピスカタウェイ、ニュージャージー州) を用いて調製した。PCR プライマーは TCR 転写物の異なる部分を増幅するように設計した。cDNA のみを増幅し、かつ mRNA 調製物中に存在するかもしれない微量のゲノム DNA を増幅しないために、プライマー組は常に 2 つ以上のエクソンに渡る PCR 産物を生成するように組み合わせた。PCR 法は 2 つの TCR 定常領域遺伝子 C₁ または C₂ のいずれかを、エクソン C₁ 中のフォワードプライマー (TCRC₁.F) およびエクソン C₁ II 中のリバースプライマー (TCRC₁.R4) を用いて増幅するように設定した、図 8。可変領域から定常領域にまたがる PCR 法は、TCR 可変遺伝子セグメントの 4 つのサブグループの各々に特異的なフォワードプライマー (TCRV₁.F、TCRV₁II.F、TCRV₁III.F、TCRV₁IV.F) と TCR 定常遺伝子セグメント中のリバースプライマー (TCRC₁.R1) とを組み合わせるよう設定した、図 8。ワックス媒介性ホットスタート PCR 法は高正確性 PCR 成分 (エキスパンド (Expand)、ベーリンガーマンハイム、インディアナポリス、インディアナ州) を用いて 30 サイクル実施した。PCR 産物は 0.5 μg/ml の臭化エチジウムを含む 1.2% アガロースゲル上で解析した。特異的 PCR 産物をゲル精製 (キアゲン、バレンシア、カリフォルニア州) し、T/A クローン化 (インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州) し、パーキンエルマーのディーローダミン (dRhodamine) ターミネーターサイクルシーケンシングキットを用いて自動化キャピラリーシーケンサー (パーキンエルマーアプライドシステムズ、フォスターシティ、カリフォルニア州) でシーケンスした。

20

30

【0176】

TCR VJ 遺伝子再構成の分析

ゲノム DNA は確立された処理に従い、 5×10^7 の LNCaP 細胞から調製した、オーズベル (Ausubel)、上述。V 遺伝子セグメントの 4 つのサブグループの一つに由来するフォワードプライマー (TCRV₁.F、TCRV₁II.F、TCRV₁III.F、TCRV₁IV.F) と、3 つの J₁ 遺伝子セグメントの一つに由来するリバースプライマー (TCRJ₁.1.R、TCRJ₁.2.R、TCRJ₁.3.R、) とを各々組み合わせるようにした、12 組の PCR 法を実施した、図 8。ホットスタート PCR 法は 500 ng ゲノム DNA を用いて 30 サイクル実施し、PCR は 0.5 μg/ml の臭化エチジウムを含む 1.2% アガロースゲル上で分析した。ヒト胎盤 DNA (クロンテック、パロアルト、カリフォルニア州) をプライマーの陽性対照として使用し、J₁.1 から J₁.2 のゲノム DNA の PCR 増幅を鋳型の陽性対照として実施した。

40

50

【0177】

RNAのプライマー伸長解析

前立腺TCR 転写物の開始点はLNCaP mRNAのプライマー伸長解析により決定した。5 µgのmRNAをC 1の5'末端から48~75ヌクレオチドにアニールする^{3 2}P末端標識されたTCRC . R2プライマー0.08 pmolと混合した。解析は、確立された処理に基づき20UのMMLV逆転写酵素(スーパースクリプト、ギブコBRL、ゲイザースバーグ、メリーランド州)を用いて実施した。ジョージ(C. P. George)ら、(1996)「RNAのプライマー伸長解析(Primer extension analysis of RNA)」、研究室におけるRNA、単離、解析および合成のための手引き書(LABORATORY GUIDE TO RNA ISOLATION, ANALYSIS AND SYNTHESIS) P. A. Krieg編集、(ウiley-Liss, Inc., ニューヨーク、ニューヨーク州)、133~139ページ。サンプルは6%ポリアクリルアミド尿素DNAシーケンシングゲルで^{3 2}P末端標識された分子量マーカー(MspI消化されたpBR322、ロフストランドラポリミテッド、ゲイザースバーグ、メリーランド州)と平行して電気泳動した。電気泳動後、ゲルはワットマンろ紙にプロットし、乾燥して、オートラジオグラフィ法に供した。

【0178】

5'RACE PCR解析

二重鎖cDNAは500 ngのLNCaPポリ(A)mRNAからマラソン(Marathon)cDNA増幅キット(クロンテック、パロアルト、カリフォルニア州)および25 pmolのTCR 遺伝子特異的プライマー(TCRC . R3)、図8、を用いて作製した。その後、マラソンアダプターを合成cDNAの末端に結合した。cDNAの5'末端の迅速増幅(Rapid Amplification of the 5'-cDNA ends)(5'RACE)PCRは、逆転写に使用されたプライマーの上流にアニールする遺伝子特異的プライマー(TCRC . R2)、図8、およびアダプター特異的プライマーを用いて実施した。ホットスタート条件を適用し(アドバンテージ(Advantage)、クロンテック、パロアルト、カリフォルニア州)、PCR産物はRT-PCR解析で記載されているように解析およびクローン化した。5'RACE PCR分析ゲル由来のDNAをナイロン膜に転写し、さらに上流にハイブリダイズする^{3 2}P末端標識されたプライマー(TCRC . R1)、図8、を、臭化エチジウム/紫外線により検出されない可能性のあるバンドを同定するために適用した。

【0179】

インビトロ転写共役翻訳

RT-PCR法および5'RACE PCR法により獲得した完全な前立腺TCR 転写物をRT-PCR法により増幅し、プラスミドブルースクリプトIISK(ストラタジーン、ラホヤ、カリフォルニア州)にクローン化し、シーケンシング、T7RNAポリメラーゼおよび小麦胚芽抽出物(TNT、プロメガ、マジソン、ウィスコンシン州)を用いたインビトロ転写共役翻訳系で試験した。^{3 5}Sメチオニン(ICN、コスタメサ、カリフォルニア州)を翻訳産物の可視化のために反応物中に取り入れた。反応は還元条件下、前染色マーカー(ギブコBRL、ゲイザースバーグ、メリーランド州)と共にポリアクリルアミドゲル(16.5% トリス/トリシン、バイオラッド、ヘラクレス、カリフォルニア州)で解析した。ゲルは乾燥し、オートラジオグラフィ法に供した。

【0180】

結果

A. TCR を表す前立腺ESTをデータベース解析により同定した
6個の腫瘍および2個の正常前立腺cDNAライブラリーに由来する20個のcDNAクローンから、23種のTCR 発現配列タグ(EST)を同定した。前立腺ESTを集合したTCR 複合配列は、76ヌクレオチドのTCR 定常領域配列、448ヌクレオチド非翻訳3'領域配列およびポリ(A)配列を有している。前立腺ESTを末梢血Tリン

パ球から確立された細胞株由来の成熟 T C R 転写物 (ジェンバンクアクセス番号、M 1 6 7 6 8、M 1 6 8 0 4 および M 3 0 8 9 4) に対して整列化することにより、発明者らは、前立腺 E S T 複合配列が末梢血 T リンパ球由来の T C R 転写物と同一であることを見出した。d b E S T データベース解析は T C R 遺伝子がヒト前立腺において非常に強く転写されていることを示している。

【 0 1 8 1 】

B . R N A ドットプロット法により確認されたヒト前立腺における T C R (3 ' U T R) の発現

ヒト前立腺における T C R 遺伝子の転写活性を解析するために、T C R 転写物の非翻訳 3 ' 末端 (3 ' U T R) 由来の c D N A プローブが 5 0 の異なるヒト組織由来の m R N A に関して分析された、図 2 A。発明者らは正常前立腺 (C 7 位) が T C R m R N A を発現していることを確認し、さらにドットプロット膜に提示されている全ての組織の中で、前立腺がはるかに最も強い発現を有していることを観察した。T C R 遺伝子発現はまた、小腸 (E 3)、脾臓 (E 4)、胸腺 (E 5)、末梢リンパ球 (E 6)、リンパ節 (E 7)、骨髄 (E 8) および肺 (F 2) においても見られた。

【 0 1 8 2 】

C . ノーザン解析はヒト前立腺において 2 つの大きさの特異的 T C R 転写物を示す脾臓、胸腺、小腸および血液リンパ球における主要な転写物は 1 . 5 k b であるが、3 ' U T R プローブを用いたノーザンプロットハイブリダイゼーション法は前立腺が約 1 . 1 k b および 2 . 8 k b の 2 つの T C R 転写物を有することを明らかにした、図 2 B (レーン 3)。1 . 5 k b の転写物の大きさは T リンパ球由来の T C R m R N A と一致している (ジェンバンクアクセス番号、M 1 6 7 6 8、M 1 6 8 0 4 (K r a n g e l ら、S c i e n c e 2 3 7、6 4 ~ 6 7 (1 9 8 7))、M 3 0 8 9 4 (L i t t m a n ら、N a t u r e 3 2 6、8 5 ~ 8 8 (1 9 8 7))。データベース解析は T C R の定常領域が前立腺転写物の一部であることを示したため、T C R 定常領域プローブ (T C R C) も使用した。発明者らは前立腺において、同一の 1 . 1 k b および 2 . 8 k b のバンドを見出した、図 3 A (レーン 3)。

【 0 1 8 3 】

D . T C R を発現する前立腺細胞は T C R および C D 3 転写物を発現しない。T C R 鎖タンパク質は通常、T C R 鎖タンパク質と共に共発現される。T C R 遺伝子はヒト前立腺において転写的に活性であるので、発明者らは続けて T C R 遺伝子の転写活性を解析した。T C R 転写物ヌクレオチド配列を用いて d b E S T データベースを解析した (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。前立腺 c D N A ライブラリー由来の E S T は T C R 鎖転写物のいかなる部分にも一致しなかった。さらに、ノーザンプロット解析は T C R m R N A の前立腺でのいかなる発現も検出しなかった、図 3 B (レーン 3)。発明者らは、T C R 遺伝子が前立腺ではサイレントであると結論した。予期された通り、T C R 転写物は脾臓、胸腺および血液リンパ球で発現している、図 3 B。

【 0 1 8 4 】

E . L N C a P 細胞は前立腺特異的 T C R 転写物を発現するが、P C - 3 細胞は発現しない T C R m R N A が正常前立腺において発現しているとして、発明者らは続いて、前立腺癌においてもまた発現しているかを解析した。前立腺特異的な 1 . 1 k b 転写物 L N C a P 由来の m R N A 調製物において検出されたが、P C - 3 由来の m R N A 調製物においては検出されなかった、図 3 C。正常前立腺で発現している前立腺特異的な 2 . 8 k b 転写物もまた、程度はかなり低いけれども L N C a P に存在している。

【 0 1 8 5 】

A . R N A インサイチュハイブリダイゼーション法は前立腺上皮細胞における T C R 発現を示す前立腺は、腺状画分の複合型過形成性の管にわたる、単純管内壁上皮細胞 (s i m p l e d u c t l i n i n g e p i t h e r i a l c e l l) の多様かつ混合型の集団を伴

10

20

30

40

50

った腺房腺組織からなる。これらの画分は平滑筋細胞、線維芽細胞および前立腺間質の他の細胞型に緊密に連結している。ヒト前立腺 T C R 発現の細胞局在を決定するために、T C R (C 3 ' U T R) センスおよびアンチセンスリボプローブを用いて、R N A インスライチュハイブリダイゼーション法を実施した。T C R m R N A が、前立腺の間質細胞および他の細胞型は陰性であるが、前立腺腺房管内の上皮細胞において非常に強く発現していることを見出した、図 4 A、図 4 C。T C R 発現は前立腺の過形成性および腫瘍性の領域においてもまた検出された。良性および腫瘍性の腺房上皮における発現は同程度である。T C R 発現はヒト腎臓組織、図 4 E、またはヒト脳においては観察することができなかった。

【 0 1 8 6 】

G . 前立腺 T C R 転写物は C 1 を含むが、いかなる V J 遺伝子も含まない
前立腺における T C R 発現プロファイルを確立した後で、続いて主要な 1 . 1 k b の前立腺特異的な T C R 転写物の特性を明らかにした。大きな前立腺組織から抽出された m R N A 調整物内に浸潤性 T 細胞由来の m R N A 混入が存在する可能性を排除できないため、特性解明のためには L N C a P 細胞株が使用された。発明者らは、データベース解析から前立腺 T C R 転写物の 3 ' 末端配列が末梢血リンパ球由来のものと同じであること、およびポリアデニル化シグナルの位置が同一であることは知っていた。したがって、前立腺およびリンパ球間の転写物の大きさの差は、前立腺 E S T により同定された範囲より上流の配列差異に起因する。T C R 転写物の定常領域部分を増幅するよう設定された R T - P C R 法では T C R C 1 遺伝子を同定した。わずかに大きい T C R C 2 は L N C a P においては発現されていない。可変領域 (V) から定常領域 (C) にわたる R T - P C R 法ではいかなる産物も生じず、V が前立腺特異的 T C R 転写物の一部分ではないことを示している。

【 0 1 8 7 】

H . L N C a P では T C R 座位における V J 遺伝子再構成は行われていない
T C R の可変領域を増幅することを意図した R T - P C R 法ではいかなる産物も生じなかったので、続いて T C R 座位を解析した。T 細胞の発生中に、T C R 座位は V (D) J 遺伝子再構成を行い、受容体の可変領域を構成する遺伝子セグメントを集成させる。L N C a P 細胞が T C R V J 遺伝子再構成を行ったかを明らかにするために、考えられる全ての再構成をカバーする (材料および方法を参照) T C R V および T C R J プライマーの組み合わせを用いて、ゲノム D N A の P C R を実施した。いかなるプライマーの組み合わせも P C R 産物を生じず、L N C a P 細胞が T C R 座位における V J 遺伝子再構成を行っていないことを示した。T C R V J 再構成が前立腺上皮細胞において生じていない事実は前立腺の発現は成熟 T リンパ球の発現とは異なっていることを示している。

【 0 1 8 8 】

I . 前立腺上皮細胞は T C R (J C) 転写物を発現する
同定された前立腺 T C R 転写物は C からなるが、いかなる V 遺伝子セグメントからは構成されないので、次に C 1 の上流にどのような配列が存在するかを解析した。R N A プライマー伸長法および 5 ' R A C E P C R 法を実施し、転写開始点を得た。L N C a P m R N A に関して実施したプライマー伸長実験は、約 1 2 8 ヌクレオチドの主要なバンドと 1 3 0 ~ 1 3 5 ヌクレオチド領域の弱いバンドを示した、図 5。逆転写は C 1 の 5 ' 末端から 7 5 塩基から開始されているので (材料および方法を参照)、転写物は C 1 の上流に約 5 3 ヌクレオチドを有する。L N C a P c D N A に関して実施した 5 ' R A C E P C R 法は単一の特異的 P C R 産物を示した。増幅産物が、C 1 遺伝子セグメントに正確にスプライシングされた J 1 . 2 遺伝子セグメントを含んでいることが発見された。R A C E P C R 法により単離された多くのクローンをシークエンスした。それらはプライマー伸長実験により決定した開始部位に近接したところから開始していた。若干変動した転写開始点は、プライマー伸長実験において主要なバンドよりも若干大きい弱いバンドの同定と一致している。どのように前立腺 T C R が転写されスプライシングさ

10

20

30

40

50

れるかの図解は図6に示されている。LNCaPから得られているTCR 転写物のヌクレオチド配列が表1に示されている。複合配列は1020 ± 3ヌクレオチド長である。それはJ 1.2 遺伝子セグメント由来の ~ 53塩基、C 1の519塩基を含み、それに続くポリアデニル化シグナルおよび3'末端のポリ(A)配列を含む448塩基の非翻訳配列を含む。

【0189】

J. 前立腺特異的TCR 転写物のインビトロ翻訳

前立腺転写物は、表1に二重下線で示された本来のTCR リーディングフレーム内に4つの翻訳開始コドン(ATG)を有する。4つの異なる開始点に対する計算上のタンパク質の大きさは、各々12.8、12.0、7.2および3.2kDaである。前立腺転写物の翻訳活性を解析するために、全長の前立腺TCR cDNAを用いてインビトロ転写共役翻訳を行った。約8kDaおよび約13kDaの2つのタンパク質が得られた、図7(レーン1)。陰性対照反応はいかなるタンパク質産物も生じなかった。

10

【0190】

考察

前立腺上皮細胞におけるTCR 転写物の特異的発現

ヒト前立腺におけるT細胞受容体鎖(TCR)の発現を同定し、それが前立腺上皮細胞に由来し、浸潤性Tリンパ球に由来しないことを示した。またT細胞受容体鎖(TCR)遺伝子は、前立腺においてサイレントであることも証明した。TCR mRNAは前立腺癌と同様に前立腺の腺房管内の上皮細胞で発現している。1.1kbおよび2.8kbの2つのTCR 転写物がヒト前立腺において存在する。それらは脾臓、胸腺および末梢血リンパ球において見出される1.5kbのTCR 転写物と比べて大きさが異なる。TCR mRNA発現プロファイルは、前立腺における転写がTリンパ球の通常の間路に従わないことを示唆している。前立腺のTCR 発現は、最初に公共に利用可能なESTデータベースの解析により発見された。発明者らの結果は、ESTクラスター化が新規のおよび予想外の遺伝子発現を同定するための強力なツールであることを示している。TCR 転写物を表す前立腺ESTは、全てレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により単離された細胞から作製されたcDNAライブラリーに由来する(Emmert-Buckら、Science 274、998~1001(1996))。

20

TCR 転写物が前立腺上皮細胞に由来し、浸潤性Tリンパ球に由来しないことが証明されたという事実は、マイクロダイセクション法が組織の特定の顕微鏡的領域に由来する純粋な細胞亜集団を獲得するための貴重な技術であるということを示している。

30

【0191】

前立腺TCR(JC) 転写物

リンパ節転移から単離された前立腺アデノカルチノーマ細胞株LNCaP(Horoszewiczら、Cancer Res. 43、1809~1818(1983))は容易に検出可能なレベルの1.1kbの前立腺特異的TCR 転写物を発現する。LNCaP細胞における発現は、転写物が上皮細胞に由来すること、および前立腺悪性腫瘍の発生中において発現し続けることが可能であることを示している。LNCaP転写物はJ 1.2 遺伝子セグメント由来の ~ 53塩基、C 1の3つのエクソン、ポリ(A)配列を伴う非翻訳配列からなる。前立腺転写物は、V 遺伝子セグメントを欠如する点、およびJ 1.2の直接上流のイントロン配列内から開始する点において成熟Tリンパ球転写物とは異なる(データ未発表)。前立腺TCR 転写物を駆動するプロモーターおよび前立腺上皮細胞における活性化機構は現在研究中である。2.8kbの前立腺特異的TCR 転写物はLNCaPにおいて非常に薄く、5'RACE PCR実験は2.8kb転写物に一致するいかなる産物も生じなかった。したがって2.8kb転写物はさらなる研究を必要とする。

40

【0192】

Tリンパ球におけるTCR(JC) 転写物との比較

多くの研究が造血系細胞におけるV(D)J再構成の開始に先立ちまたは同時にTCR遺

50

伝子転写を検出することが可能であることを示してきた (Wangら、Mol. Immunol. 33、957~964 (1996)、Shimamura, M. および Ohta, S., Eur. J. Immunol. 25、1541~1546 (1995)、Villeyら、Eur. J. Immunol. 27、1619~1625 (1997)、Sikesら、J. Immunol. 161、1399~1405 (1998))。TCR 遺伝子は未再構成座位を有するマウス骨髄常在性Tリンパ球前駆細胞においても転写的に活性であり、不毛なTCRC 転写物を生じることが報告されている (Wangら、Mol. Immunol. 33、957~964 (1996))。加えて、未再構成TCRV 転写物の発現もまた個体発生期間中に報告されている (Goldmanら、J. Exp. Med. 177、729~739 (1993))。TCRおよび免疫グロブリン遺伝子セグメントの不毛な転写はこれまでのところリンパ系由来の細胞に限定されている (Lauzurica, P. および Krangel, M. S., J. Exp. Med. 179、1913~1921 (1994))。さらに、ほとんど全てのTCRおよび免疫グロブリン座位の生殖細胞系転写活性化は時間的に座位組換えの活性化と相関する (Sikesら、J. Immunol. 161、1399~1405 (1998)、Goldmanら、J. Exp. Med. 177、729~739 (1993)、Lauzurica, P. および Krangel, M. S., J. Exp. Med. 179、1913~1921 (1994)、Sleckmanら、Annu. Rev. Immunol. 14、459~481 (1996))。発明者らはゲノムDNAおよびcDNAを用いての独立した実験により、前立腺上皮細胞のTCR 座位の組換えは生じていないことを示した。したがって、前立腺上皮のTCR (JC) 転写物の発現は組換えと相関せず、Tリンパ球前駆細胞で観察された不毛な転写物とは異なる機能を果たしているかもしれない。

【0193】

TCR 座位における新規前立腺特異的タンパク質の可能性に関する最初の仮説
前立腺TCR 転写物は非常に強く発現しており、発明者らは、生物学的に重要な基本的な理由があると仮定する。VJ 遺伝子再構成が前立腺上皮細胞のTCR 座位において生じないという事実は、成熟TCR 鎖タンパク質が作製される可能性を排除する。翻訳開始コドン(ATG)はC の上流には見出されないため、TCR 可変領域なしにTCR 定常領域タンパク質が作製されるという可能性もまた排除する。TCR 鎖タンパク質においてJ 断片は16~20アミノ酸の可変領域をコードし、一方可変領域の主要な部分はV 断片の1つによりコードされる。J 断片によりコードされるアミノ酸がV 遺伝子セグメントによりコードされるアミノ酸と連結されることがなければ、それらはMHC認識においてTCRとして機能することができない。これはC 内からコードされる新規の前立腺特異的タンパク質の可能性を高める。異なるリーディングフレームまたはあまり頻繁には使用されない開始コドンが使用されるかもしれないが、発明者らの最初の仮説は、本来のTCR リーディングフレーム内のATGコドンの1つが翻訳を開始するということであった。

【0194】

前立腺TCR cDNAを用いたインビトロ転写共役翻訳実験は、転写物が完全に機能的であることを明らかにした。2つのタンパク質を得た。13kDaのタンパク質が、計算上12.8kDaのタンパク質の大きさ(PS TCR 1)を生じる、図1の最初の二重下線のATGに由来する可能性が最も高い。8kDaのタンパク質は、計算上7.2kDaの大きさである二番目の二重下線のATGに由来する可能性が最も高い(PS TCR 2)。これらのタンパク質は続く実施例で報告される研究においてさらに探索した。結論として、前立腺上皮細胞または非リンパ系由来細胞型が、リンパ系由来の細胞により限定的に発現されていると考えられていた遺伝子から高いレベルの転写物を発現するという事実は、非常に予想外の発見であった。

【0195】

実施例2 TCR の代替リーディングフレームタンパク質の発見
前述の実施例は前立腺および前立腺癌細胞におけるTCR 転写物の予想外の発見、転写

物のインビトロ翻訳、およびその転写物がこの細胞における短縮型TCR鎖の切断型の存在下に生じるという最初の仮説を実証した。これらの実施例は、転写物が実際は、代替リーディングフレームから発現されているタンパク質で、現在「TARP」と名づけられている以前には知られていないタンパク質を生じるという、さらに予想外の発見を明らかにした。さらに予想外のことに、以下で報告する研究はTARPが核タンパク質であり、多くの乳癌細胞において存在することを示す。

【0196】

材料および方法

プライマー

TCR γ -上流ATG変異体#1 (5'-TTACAGATAAACAACCTTGATAC
AGATGTTTCCCCCAAGCCC-3'); TCR γ -上流ATG変異体#2 (5'-GGGCTTGGGGGAAAC
ATCTGTATCAAGTTGTTTATCTGTAA-3'); TCR γ -上流ATG変異体#3 (5'-
GATAAACAACCTTGATGCAGATATTTCCCCCAAGCCC-3'); TCR γ -上流ATG変異体#4
(5'-GGGCTTGGGGGAAATATCTGCATCAAGTTGTTTATC-3'); TCR γ -
上流ATG変異体#5 (5'-GATAAACAACCTTGATACAGATATTTCCCCCAAGCCC-3');
TCR γ -上流ATG変異体#6 (5'-GGGCTTGGGGGAAATATCTGTATCAAGTTGTTTATC-
3'); TCR γ -下流ATG変異体#1 (5'-CCCAGGAGGGGAACACCATAAAGACTAAC
GACACATAC-3'); TCR γ -下流ATG変異体#2 (5'-GTATGTGTCGTTAGTCTTT
ATGGTGTCCCTCCTGGG-3'); TCR5.1 (5'-GATAAACAACCTTGATGCA
GATGTTTCC-3'); TCR3.1 (5'-TTATGATTTCTCTCCATTGCAGCAG-3');
TCRJy1.2R (5'-AAGCTTTGTTCCGGGACCAAATAC); B-アクチンフォワード (5'-
ATCTGGCACACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'); B-アクチンリバース (5'-
CTTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3')

10

20

プライマーはシグマジエノシス(ウッドランド、テキサス州)およびロフストランドラポリミテッド(ゲイザースバーグ、メリーランド州)により合成された。

30

【0197】

構築物

プラスミドブルースクリプトIISK(+)(ストラタジーン、ラホヤ、カリフォルニア州)にクローン化したTARP転写物は以前記載されている(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))。本明細書において、このプラスミドをpBSSK-TCRと称する。69部位のATGがATAに変異導入されたpBSSK-TCR変異体ATG上流1はクイックチェンジ(Quickchange)部位特異的突然変異キット(ストラタジーン)を用いて構築した。PCR反応はTCR上流ATG変異体#1およびTCR上流ATG変異体#2をプライマーとして、pBSSK-TCRを鋳型として使用した。73部位のATGがATAに変異導入されたpBSSK-TCR変異体ATG上流2はTCR上流ATG変異体#3およびTCR上流ATG変異体#4をプライマーとして、pBSSK-TCRを鋳型として用い、上記のように構築した。69および73部位のATGがATAに変異導入されたpBSSK-TCR変異体ATG上流-両方はTCR上流ATG変異体#5およびTCR上流ATG変異体#6をプライマーとして、pBSSK-TCR変異体ATG上流1を鋳型として用い、上記のように構築した。242部位のATGがATAに変異導入されたpBSSK-TCR変異体ATG下流はTCR下流ATG変異体#1およびTCR下流ATG変異体#2をプライマーとして、pBSSK-TCRを鋳型として用い、上記のように構築した。pET-TCRはpET23aベクター(ノバジェン(Novagen)、マジソン、ウィスコンシン

40

50

州)にサブクロニングしたTARP転写物(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))の242~469のヌクレオチドを含む。pET-TARPはpET23aベクターにサブクロニングしたTARP転写物(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))の56~242のヌクレオチドを含む。pVC4D-TARPはpVC4Dベクター(Bruggemann, E. P.ら、BioTechniques 10:202~209(1991))にサブクロニングしたTARP転写物(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))の69~242のヌクレオチドを含む。

10

【0198】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR法)

ポリ(A)RNAの単離は製造メーカーの指示書に従い、Micro-FastTrack(商標)2.0キット(インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州)を用いて実施した。500ngのポリ(A)RNAまたは5μgの総RNAを50pmolのオリゴdTプライマー(インビトロジェン)の存在下で70℃、2分間変性した。一本鎖cDNAは250μM dNTPs、2mM DTT、8U RNasin(ロシュモレキュラーバイオケミカルズ(Roche Molecular Biochemicals、インディアナポリス、インディアナ州)、50U Superscript II(商標)RT(ライフテクノロジーズ(Life Technologies)、ロックビル、メリーランド州)を含む10μl反応中で調製し、42℃で90分間インキュベーションした。サンプルはその後、75μlの10mMトリス塩酸[pH7.5]を用いて希釈し、72℃で10分間インキュベーションした。3μlのcDNAを250μM dNTPs、25pmolの各々のプライマー、1ユニットのAmpliTaQ(登録商標)DNAポリメラーゼ(ロシュ)を含むPCRに使用し、35サイクルで増幅した。ヒト乳房RAPID-SCAN(商標)遺伝子発現パネル(オリジーンテクノロジーズ(Origene Technologies)、ロックビル、メリーランド州)に関して、類似のPCR条件を使用した。TCR J1.2R、TCR5.1およびTCR3.1プライマーをTARP転写物を検出するために使用し、BアクチンフォワードプライマーおよびBアクチンリバープライマーをアクチン転写物を検出するために使用した。

20

30

【0199】

ノーザンブロットハイブリダイゼーション法

2μgのポリ(A)RNAを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーション法を以前記載されたとおりに実施した(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))。

【0200】

インビトロ転写共役翻訳

インビトロ転写共役翻訳反応を以前記載されたとおりに実施した(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))。pBSSK-TCR、pBSSK-TCR変異体ATG下流、pBSSK-TCR変異体ATG上流1、pBSSK-TCR変異体ATG上流2およびpBSSK-TCR変異体ATG上流両方が鑄型として使用した。

40

【0201】

細胞培養

LNCaP、PC3、MCF7、BT-474およびSK-BR-3細胞はRPMI-1640培地(クオリティバイオロジカル社(Quality Biological Inc.))、ゲイザースバーグ、メリーランド州)中で37℃、5%二酸化炭素下で維持した。培地は10%ウシ胎児血清(FBS、クオリティバイオロジカル社)、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウムおよびペニシリン/ストレプトマイシンを含んでいた。Hs57Bst細胞はRPMI-1640培地中で37℃、5%二酸化炭素下で維

50

持した。培地は10% FBS、30 ng/ml 上皮細胞成長因子 (EGF、ハーラン (Harlan)、シンシナティ、オハイオ州)、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウムおよびペニシリン/ストレプトマイシンを含んでいた。

【0202】

抗体生産

ポリクロナール PE-TARP 抗体は以下のように作製された。酵素学的に不活性型のシュードモナス外毒素のC'末端 (PE) (Bruggemann, E. P. ら、BioTechniques 10: 202~209、(1991)) に融合したTARPオープンリーディングフレーム全体を含むpVC4D-TARPをEpicurian Coli (登録商標) BL21-Codon Plus (商標) (DE3)-RIL細胞 (ストラタジーン) 中で発現した。封入体の調製およびウサギ免疫は以前に記載された (Brinkmann, U. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8616~8620 (1991))。抗血清はImmunoPure (登録商標) IgG (Protein A) 精製キットを用いて、製造メーカ (ピアス (Pierce)、ロックフォード (Rockford)、イリノイ州) の指示書に従い精製した。

【0203】

TCR 抗体は、C'末端の6ヒスチジン標識に融合したTCRの細胞外ドメインを含む発現プラスミドpET-TCRを用いて、上記のように作製した。免疫に先立ちヒスチジン標識したTCRタンパク質を製造メーカ (キアゲン、バレンシア、カリフォルニア州) の指示書に従いNi-NTAアガロースカラムを用いて精製した。

【0204】

細胞抽出物の調製

全細胞タンパク質抽出物を以下のように調製した。各々の細胞株から、 5×10^6 の増殖細胞を回収し、タンパク質加水分解酵素阻害剤を含む1x RIPA緩衝液に再懸濁した (50 mM トリス塩酸 [pH 7.5]、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% トライトンX-100、1 mM PMSF、1 μ g/ml アプロチニン、1 μ g/ml ロイペプチン)。抽出物は短時間超音波処理し、かつ遠心分離により浄化した。タンパク質濃度を製造メーカ (ピアス) の指示書に従い、Coomassie (登録商標) プラスタンパク質分析試薬を用いて決定した。前立腺組織由来のタンパク質抽出物は、80で凍結された0.5 gの前立腺癌組織を、冷却した乳鉢および乳棒を用いて粉碎し、微細な粉末にすることにより調製した。粉末化された組織は回収し、1x RIPAに再懸濁して、上記のように処理した。

【0205】

前立腺および乳房細胞株由来の核、膜および細胞質抽出物は以前に発表されたプロトコールに基づいて調製した (Dignam, J. D. ら、Nucleic Acids Res. 11: 1475~1489 (1983)、Sladek, F. M. ら、Gene s Dev. 4: 2353~2365 (1990))。

【0206】

ウエスタンブロット解析

20または40 μ gのタンパク質抽出物、1 μ gの組換え型His-TARPまたは100 ngの組換え型His-TCRを16.5% トリストリシゲル (バイオラッド、ヘラクレス、カリフォルニア州) にて泳動し、0.2 μ mのImmune-Blot (商標) PVDF膜 (バイオラッド) に4にて30Vで4時間、転写緩衝液 (25 mM トリス、192 mM グリシン、20% (v/v) メタノール、pH 8.3) 中で転写した。フィルターを10 μ g/mlのPE-TARP抗血清または1 μ g/mlのTCR抗血清を用いてプロービングし、かつ各々のシグナルは化学発光ウエスタンブロットティングキットを用いて製造メーカ (ロシュ) の指示書に従い検出した。

【0207】

TARPは前立腺癌細胞において発現している核タンパク質である

TARPまたはTCRが前立腺癌細胞に存在するかを決定するために、発明者らは両方

ンパク質に対する抗体を生成し、異なる前立腺癌細胞抽出物に関してウエスタンブロット法を実施した。図3A(上部パネル)に示されているように、TARPは前立腺癌LNCaP細胞株および前立腺癌腫瘍抽出物中で検出された。7kDaのバンドは組換え型His-TARPと共移動しており、LNCaPおよび癌抽出物において検出される産物がTARPであることを示唆している。以前発明者らは、前立腺特異的TCR転写物が前立腺癌PC3細胞株において発現していないことを証明した(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))。したがって、発明者らはPC3細胞抽出物を陰性対照として使用し、7kDaバンドがこれらの抽出物に存在しないことを証明した(図3A、上部パネル)。重要なことに、免疫前抗血清またはシュードモナス外毒素(PE、材料および方法を参照)に対する抗血清が使用された時には、7kDaバンドは検出されなかった(データ未発表)。組換えタンパク質は使用した抗体を用いて非常に強いシグナルを示すけれども、TCRはこれらのいかなる抽出物においても検出されなかった(図3A、下部パネル)。これらのデータは前立腺特異的TCR転写物がTARPをコードすることを示している。

10

【0208】

TARPの細胞内局在を決定するために、発明者らは、LNCaP細胞由来の核、細胞質および膜画分を調製した。図3Bに示されているように、TARPは核において検出されたが、細胞質および膜画分においては検出されなかった。シヨ糖クッションを通して細胞抽出物を分画することにより精製された核を用いても、同様の結果が得られた(Sladek, F.M.ら、Genes Dev. 4:2353~2365(1990))(データ未発表)。

20

【0209】

TARP転写物は乳房細胞で発現している

以前、発明者らは、TCRESTクラスターもまた脳ライブラリー由来のいくつかのESTを含むことを報告した(Vesmatzis, G.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:300~304(1998))。この最初の報告後、付加的なESTがデータベースに寄託され、クラスターは現在、乳房、大腸、腎臓および胃のライブラリーにも由来するESTを含む。これらESTの存在がこれらの細胞におけるTARP転写物の発現を示すのか、またはそれはこれらのライブラリーが作成された時の浸潤性Tリンパ球の存在に起因し得るのかを決定するために、発明者らは、様々な細胞株に関してRT-PCR法を実施し、TARP転写物の存在を試験した。図4Aに示されるようにTARP転写物の発現は乳房細胞株MCF7、BT-474、SK-BR-3およびCRL-1897で検出された。神経芽細胞腫細胞株であるA172、神経膠芽細胞腫細胞株であるIMR32、大腸細胞株であるCOLO205、胃細胞株であるKATOIIIまたは腎臓細胞株であるCOS7および293においてはシグナルが検出されなかった(図4Aおよびデータ未発表)。TARP転写物が細胞株に加えてヒト乳房組織で発現しているかを決定するために、12個の異なる正常乳房cDNAおよび12個の異なる乳癌cDNAをRAPID-SCAN(商標)パネル(オリジーンテクノロジーズ、ロックビル、メリーランド州)を用いて試験した。TARP mRNAはいくつかの乳癌サンプルにおいて大量に存在することが示されたが(図4B、上部パネル)、正常乳房サンプルにおいては、35ラウンドのPCRの後、かろうじて検出できる程度であった(データ未発表)。重要なことにcDNAを欠く反応ではシグナルは検出されなかった。各レーンに同程度の量のcDNAが存在することを示すためにアクチンを使用した。正常乳房サンプルにおける弱いシグナルは、正常乳房組織由来の乳房細胞株であるHs57Bst細胞株についての、図4Aおよび5におけるTARPシグナルの欠失とよく相関している。これらの結果は、乳房におけるTARP転写物の発現が腫瘍性形質転換後に増加することを示唆している。しかしながら、何らかの断定的な結論を出す前にはさらなる研究が必要である。

30

40

【0210】

乳房細胞株で観察されたTARP転写物が前立腺細胞株で見出された転写物と同一である

50

かを決定するため、発明者らは、TARP転写物の異なる領域に対するプライマーを用いてRT-PCR法を実施した。図5Aに示されるように、前立腺のTARP転写物はJ1.2遺伝子セグメントの一部、3つのC1エクソンおよびポリ(A)テイルを伴ういくらかの非翻訳配列を含んでいる(7)。プライマー組1および3はTARP転写物全体を増幅する(図5B、上部パネル)、一方プライマー組2および3はC1領域のみを増幅する(図5B、中部パネル)。図5Bに示されるように、各プライマー組を用いて前立腺細胞株(LNCaP)と比較すると、3つの乳房細胞株(MCF7、BT-474およびSK-BR-3)において類似の大きさのバンドが検出された。重要なことにcDNAを欠く反応(dH2O)ではシグナルは検出されず、アクチン対照により証明されているように同程度の量のcDNAを使用した(図5B、下部パネル)。これらのデータは乳房細胞株で見出されたTARP転写物が前立腺細胞株で見られた転写物と同一であることを示している。この結論をさらに支持するために、発明者らはノーザンブロット法により各細胞株由来のTARP転写物の大きさを解析した。以前、発明者らは、LNCaP細胞においては、1100ヌクレオチドの転写物が主要型であり、1100および2800ヌクレオチドの転写物が存在することを証明した(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))。図5Cに示されるように、前立腺細胞株(LNCaP)と比較して、より弱い強度であるが、3つの乳房細胞株(MCF7、BT-474およびSK-BR-3)において類似の大きさのTARP転写物を見出した。したがって発明者らは、TARP mRNAは前立腺および乳房細胞株において発現していると結論した。

10

20

【0211】

TARPタンパク質が乳癌細胞株に存在するかを決定するために、TARPに対する抗体を用いて乳癌核抽出物でウエスタンブロット法を実施した。図6(上部パネル)に示されるようにTARP反応性バンドがMCF7、BT-474およびSK-BR-3細胞において検出された。TARPはこれらの乳癌細胞株の膜および細胞質画分には検出されなかった(データ未発表)。重要なことに、組換えタンパク質は使用した抗体を用いて非常に強いシグナルを示すけれども、TCRはこれらのいずれの核抽出物においても検出されなかったので、TARPは乳房細胞株において、TARP転写物によりコードされるタンパク質産物である(図6、下部パネル)。これらのデータはTARPがまた乳癌細胞にも存在することを示している。

30

【0212】

前立腺および乳癌細胞において発現しているTCR座位由来の特異的転写物によりコードされる7kDaの核タンパク質を同定したことを報告する。そのタンパク質はTCRとは異なるリーディングフレームにコードされているので、発明者らは、TCR Alternate Reading frame Protein(TCR代替リーディングフレームタンパク質)にちなんでTARPと名づける。TCR座位のイントロン内に由来する転写物の別のリーディングフレームから翻訳されることのほかに、TARPは他に2つの普通でない特徴を有する。第1に、ほとんどのものは通常細胞外に分泌されるので、そのように小さなペプチドを細胞内に見出すことは驚くべきことである。第2にTARPは有効なコザック配列(Kozak, M. Cell 44:283~92(1986))を欠いている。TCRリーディングフレームは有効なコザック配列を有するので、発明者らは、最初は短縮型TCRタンパク質がコードされていると仮定した。しかしながら図3に示されているように、発明者らの最初の仮説は間違っていた。インビトロ翻訳の結果がTARPタンパク質に対する優先度を示し、かつTARPリーディングフレーム内のいずれかのATGが、タンパク質合成を開始するために使用されることが可能であることは興味深い。TARPタンパク質合成を開始するためにどのATGが使用されるかを決定するためには、タンパク質配列決定が必要とされるであろう。

40

【0213】

TARPタンパク質配列の非常に興味深い特徴は7アミノ酸リピート内に5個のロイシンを有することであり、TARPがロイシンジッパー二量体化モチーフを含んでいるかもし

50

れないことを示唆している(図7A)。これが真実であるためには、TARPは両親媒性ヘリックスを含まなければならない。TARPが両親媒性ヘリックスを含むかもしれないという1つの証拠は、ヘリックス開始残基として機能すると信じられている残基であるセリンおよびプロリン残基が、最初のロイシンリピートの直前に見出されることである。2番目に、それによりヘリックスに両親媒性特性を与え、かつ他のヘリックスとの塩橋として機能する可能性のある多くの荷電性アミノ酸が7アミノ酸リピートの中に見出されることである。7アミノ酸リピートのロイシンの存在はロイシンジッパーモチーフの良い証拠ではあるが、ロイシンジッパータンパク質とは見なされていない7アミノ酸リピート内に5個のロイシンを含むタンパク質も同定されている。例えば、カリオフィリン(karyopherin)(Chook, Y. M.ら、Nature 399: 230~237(1999))、B.ステラロサーモフィラス(Sterarothermophilus)のピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼ(Pugmire, M. J.ら、Structure 6: 1467~1479(1998))およびT.サーモフィラスのフェニルアラニルトRNAシントターゼ(Mosyak, L.ら、Nat. Struct. Biol. 2: 537~547(1995))の結晶構造は、その配列が7アミノ酸リピートの中に5個のロイシンを含む領域において、これらのタンパク質がヘリックス構造を含まないことを示した。TARPで見出されたロイシンリピートの意義を決定するためには相互作用および構造に関する研究が必要である。

【0214】

TARPアミノ酸配列の別の通常ではない特徴は、塩基性アミノ酸の領域が潜在的なロイシンジッパーモチーフに続くことであり(図7)、DNA結合モチーフの可能性を示唆している。しかしながら塩基性領域の配置は、ロイシンリピートに先行するのではなくむしろそれらに続く点で独特である。DNAに結合するほとんどのロイシンジッパータンパク質は、ロイシンリピートの前に塩基性領域を有する(総説は(Chook, Y. M.ら、Nature 399: 230~237(1999))を参照)。TARPの塩基性領域は単に核移行シグナルとして機能しているのかもしれないが、しかしTARPが核タンパク質であるという事実はTARPがDNAに結合するかもしれないとの仮説を強化する。何らかの断定的な結論を出す前に機能研究が必要である。

【0215】

TARPが何らかの既知のタンパク質に類似性を有するかを決定するために、ジェンバンクに対してタンパク質ブラスト(BLAST)検索を実施した。この検索はTARPのアミノ酸配列がディクチオステリウム ディコイデム(Dictyostelium discoideum、細胞性粘菌)Tup1(ジェンバンクアクセション番号AAC29438)およびサッカロミセスセレビジエTup1(Williams, F. E.ら、Mol. Cell. Biol. 10: 6500~6511(1990))(図7C)とある程度の類似性を有することを示した。酵母Tup1は通常はCyc8(Ssn6)との複合体中に見出され、ブドウ糖、酸素およびDNA傷害により制御されている遺伝子の転写抑制に必要である(Tzamarías, D.ら、Genes Dev. 9: 821~831(1995))。Cyc8(Ssn6)またはTup1はいずれもDNAに結合せず、しかし各々は2、Mig1、Rox1およびa1等の特異的DNA結合タンパク質との相互作用を介して共抑制複合体の一部として作用する(Tzamarías, D.ら、Genes Dev. 9: 821~831(1995))。Tup1のC'末端側半分は、WD-40またはトランスデューシンリピートとして知られている、アスパラギン酸およびトリプトファンに富む43アミノ酸配列の7アミノ酸リピートを含む(Williams, F. E.ら、Mol. Cell. Biol. 10: 6500~6511(1990)、Fong, H. K.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2162~2166(1986))。WD-40リピートは多くのタンパク質において同定され、タンパク質-タンパク質相互作用において役割を果たしている。重要なことに、Tup1はその2つのWD-40リピートを介して2と相互作用することが示されている(Komachi, K.ら、Genes Dev. 8: 2857~2867(1994))。

94))。TARPがTup1の5番目のWD-40リピートと類似性を有していることは非常に興味深い(図7C)。TARPは核タンパク質であるので、Tup1と類似性を有することはTARPが転写制御に関与する機能的核タンパク質複合体の一員であるかもしれないことを示唆している。したがって、その機能を決定するためにはTARPが相互作用するタンパク質を同定することが必要である。

【0216】

TARP抗体は前立腺および乳房核抽出物において二重バンドを認識する(図6A)。移動度の速い7kDaのバンドはHis-TARP組換えタンパク質と共移動し、より弱いバンドはより大きな分子量として泳動する。9kDaバンドに関する可能性のある1つの説明は、翻訳後修飾であるということである。TARPが何らかの既知の翻訳後修飾部位を有しているかを決定するために、発明者らは、TARPアミノ酸配列をスイス生物情報科学研究所(Swiss Institute of Bioinformatics)EXPASYプロテオミクスサーバー(<http://www.expasy.ch>)のPROSITEプログラムを用いて解析した(Appel, R.D.ら、Trends Biochem. Sci. 19:248~260(1994)、Hofmann, K.ら、Nucleic Acids Res. 27:215~219(1999))。図7Aに示されているように、cAMP依存性およびcGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位(RRATおよびRRGT)およびプロテインキナーゼCリン酸化部位(SSRおよびSRR)を含む多くの可能性のあるリン酸化部位が見出された。リン酸化は多くの場合において、タンパク質をSDS-PAGEゲル上で見かけ上より大きな分子量で泳動させることが示されている。これが正しければ、図6の結果は未修飾型がLNCaP細胞において主要であり、MCF7およびSK-BR-3細胞においてはリン酸化型のみが存在することを示している。9kDaのバンドの真の性質、および前立腺および乳癌細胞において発現される時にTARPが翻訳後修飾されるかを決定するためには付加的な実験が明らかに必要である。

10

20

【0217】

乳癌細胞においてTARP mRNAおよびタンパク質が発現していることをここで報告する。TARP転写物に関する発明者らの最初の研究は、乳房におけるTARP発現を明らかにしなかった(Essand, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9287~9292(1999))。可能性のある1つの説明は、TARPが正常乳房において低いレベルで発現しており、検出するのが困難であるということである。結果の節に記載されているように、癌サンプルにおいて検出される強いシグナルと比較して、正常乳房サンプルのPCR分析において、非常に弱いシグナルが検出された。したがって、乳癌細胞におけるTARPの存在はTARP発現が乳房細胞の腫瘍性形質転換の後に誘導されることを示しているのかもしれない。加えて、乳癌細胞におけるTARPの存在は、TARPがエストロゲンにより制御されていることを示しているのかもしれない。この仮説は、アンドロゲン応答因子(ARE)とエストロゲン応答因子(ERE)とを組み合わせた因子をTARPのイントロン性プロモーター中に同定したことにより、強化される。この混成因子は、5'末端におけるAREに、3'末端におけるEREに特異的な2つの半部位からなる(Zillicus, J.ら、Mol. Endocrinol. 9:389~400(1995)および未発表データ)。エストロゲンがTARPを制御するかを決定するためには付加的な実験が必要である。しかしながら変異体AREが乳房腫瘍においてある前立腺特異的遺伝子の発現を引き起こす例がある。例えば、前立腺特異的タンパク質(PSA)が乳房腫瘍において発現していることが示されている(Majumdar, S.ら、Br. J. Cancer 79:1594~1602(1999))。PSAの異常発現の分子的解析は、PSAプロモーター内に見出されたAREの1つにおける単一点突然変異の発見につながる。この変異は乳房腫瘍におけるアンドロゲン制御性PSA発現の喪失につながると信じられている(Majumdar, S.ら、Br. J. Cancer 79:1594~1602(1999))。試験された3つの乳房細胞株において、TARPプロモーターにおける類似の変異が生じているかは現

30

40

50

時点では不明である。

【0218】

前立腺はその構造および機能を維持するためにアンドロゲンに依存している。前立腺細胞が悪性化する時、それらはしばしばアンドロゲン依存性を失う。この研究では、発明者らは、増殖におけるアンドロゲン依存性が異なる2つの前立腺細胞株、LNCaPおよびPC3細胞を使用した。アンドロゲン受容体はアンドロゲン依存性のLNCaP細胞株では存在しているが、アンドロゲン非依存性のPC3細胞株では存在していない(Tilly, W.D.ら、Cancer Res. 50:5382~5386(1990))。図3に示されるように、TARPはLNCaP細胞においては発現しているが、PC3細胞では発現していない。この結果は、TARP発現がアンドロゲン刺激により制御されているかもしれないことを示唆している。TARPプロモーター内にARE様因子を同定したことは、TARPがアンドロゲンにより誘導されるという考えを強化する。アンドロゲンがTARPMRNA発現を誘導するかを決定するために、実験が現在進行中である。LNCaP細胞における発現およびPC3細胞における非発現は、TARPがアンドロゲン依存性応答を制御することにおいて重要であることを示しているのかもしれない。

10

【0219】

本発明は、特に前立腺細胞、前立腺癌および乳房細胞および乳癌に関連する新規の材料および方法を提供する。具体的な例が提供されているが、上記の記載は例証的であり制限的ではない。本発明の多くの変形形態は本明細書の総説により当業者に明白であろう。したがって本発明の範囲は上記の参照を用いて決定されるべきではなく、代わりに、添付された特許請求の範囲と同一性を有するもの全範囲と共に、添付された特許請求の範囲に関する参照を用いて決定されるべきである。

20

【0220】

個々の刊行物および特許文献が各々そのように示されているのと同じ範囲内で、本出願において引用された全ての刊行物および特許は、全ての目的において参照として本明細書に組み入れられる。本明細書において様々な文献を引用することにより、いかなる特定の文献も本発明の「公知の技術」となることを出願人は許容しない。

【図面の簡単な説明】

【図1】PS-TCR 転写物のヌクレオチド配列(配列番号:13)。インビトロにおける翻訳系では、この転写物は2つのポリペプチドを産生する。第1のポリペプチドはMQM...で始まる推定アミノ酸配列を有する(「PS-TCR-1」、本明細書では「TARP」と呼ぶ、配列番号:14)。このポリペプチドは7.2 kDの予測質量を有する。それは、天然のTCR リーディングフレームに一致しないリーディングフレームから翻訳される。第2のポリペプチドはMKT...で始まる推定アミノ酸配列を有する(「PS-TCR-2」配列番号:15)。それは13 kDの予測質量を有する。それは、TCR と同じリーディングフレームから翻訳され、切断された形態のTCRを示す。図中の1本の下線を漬けた配列は転写開始部位およびポリアダニル化部位を示す。

30

【図2】TCR mRNA発現のハイブリダイゼーション分析。図2A)はヒトTCRの異なる発現を示す多数の組織のドットプロットである。陽性の組織は前立腺(C7)、小腸(E3)、脾臓(E4)、胸腺(E5)、末梢リンパ球(E6)、リンパ節(E7)、骨髄(E8)および肺(F2)。図2B)。正常な組織のTCR 転写物サイズを示すノーザンプロット分析である。前立腺において発現される2つのTCR 転写物は1.1 k Bおよび2.8 k Bであるが、脾臓、胸腺および末梢血リンパ球中の優先的な転写物は1.5 k bである。フィルムは20時間露出した。

40

【図3】TCR 発現のノーザンプロット分析。図3A)TCR 不変領域(TCRC)プロンプは1.1 k bおよび2.8 k bの前立腺特異的転写物を示す(図2Bと比較)。フィールドバックは20時間露出した。図3B)TCR 不変領域(TCRC) cDNAプロンプは、TCR mRNAは前立腺では発現されないが、発現は脾臓、胸腺および末梢血白血球において見られる。フィルムは50時間露出した。図3C)TCRC c

50

DNAプローブは、NCaP細胞系統はTCRを発現するが、PC-3細胞系統は発現しないことを示している。フィルムは20時間露出した。ヒトアクチンmRNA発現を対照として分析した。

【図4】TCR (C1-3'UTR)アンチセンス、³⁵S標識リボプローブを使用したパラフィン包埋組織切片上のRNAインサイチュハイブリダイゼーション分析。左側のパネルの写真は暗視野顕微鏡法によるが、対応する右側のパネルの写真は明視野顕微鏡法による。暗視野で撮影した写真に示す明るいつぶはRNAハイブリダイゼーションのシグナルである。4A)陽性の腺房上皮細胞および陰性の間質細胞を示す67歳の男性由来の前立腺組織である。(5倍)。4B)4Aの明視野。4C)下の右コーナーの陽性領域を示す高倍率(40倍)。4D)4Cの明視野。4E)RNAハイブリダイゼーションを示さない腎臓組織、(5倍)。4F)4Eの明視野。 10

【図5】LNCaP mRNAのプライマー伸長分析。逆方向のプライマーはTCRの不変領域でアニーリングし、C1の5'末端から75ヌクレオチドから開始する。逆転写は約128ヌクレオチドで停止した。これは矢印で示され、転写はC1の上流の約53ヌクレオチドで開始されることを示している。LNCaPのTCR逆転写が見られるレーンは72時間露出したが、マーカーレーンは8時間露出した。

【図6】前立腺TCR転写物。前立腺TCRがどのように転写され、スプライシングされるかを例示する。転写物はJ1.2セグメント、C1の3つのエクソンその後の非翻訳配列からなる。

【図7】前立腺TCRのインビトロ転写共役翻訳分析。8kDaおよび13kDaの推定サイズを有する2つのタンパク質が得られた(レーン1)。空ベクターを使用した陰性対照反応(レーン2)はどのようなタンパク質産物も生じなかった。 20

【図8】PS-TCR転写の分析に使用されるプライマー。(配列番号:1から配列番号:12)。

【図9】前立腺特異的TCR転写物のインビトロ翻訳分析。前立腺特異的TCR転写物はインビトロにおいて2つのタンパク質をコードする。³⁵S-Met標識したインビトロにおいて翻訳されたタンパク質は16.5%トリストリシゲルで走査し、オートラジオグラフ法で分析した。使用した突然変異構築物の略図を右に示す。白抜きの囲みは太字で示す開始コドンと思われるものを有する第一のリーディングフレームを示すが、第二のリーディングフレームは斜字体で示す開始コドンと思われるものを有する黒塗りの囲みで示す。「X」はATAに突然変異されたATGコドンを示す。kDaで示すサイズマーカーを上部に示す。 30

【図10】TARPは前立腺抽出物中に発現される核タンパク質である。LNCaP細胞、PC3細胞または前立腺腫瘍試料(癌)から由来するタンパク質抽出物のウェスタンブロットである。20μgの各タンパク質抽出物を16.5%トリストリシゲルで走査し、TARP(上のパネル)またはTCR(下のパネル)に対する抗体でプロービングした。陽性対照として、1μgのヒスチジン標識したTARP(上のパネル)または100ngのヒスチジン標識したTCR(下のパネル)をゲル上で走査した(Recomb.)。kDa単位のサイズマーカーは左に示す。LNCaP細胞の(B)細胞質画分(Cytoplasm)、膜画分(Membrane)および核画分(Nucleus)のウェスタンブロット分析である。40μgの各画分を16.5%トリストリシゲル上で走査し、TARPに対する抗体でプロービングした。陽性対照として、1μgのヒスチジン標識したTARPをゲル上で走査した(Recomb.)。kDa単位のサイズマーカーは左に示す。 40

【図11】TARPMRNAは乳癌細胞において発現される。(A)RT-PCR法は、以下の細胞系統由来のRNAを使用して、TARP(上のパネル)またはアクチン(下のパネル)に特異的なプライマーを用いて実施した。前立腺(LNCaPおよびPC3)、神経芽細胞腫(A172)、結腸(COLO205)、胃(KATOIII)および乳房(MCF7、BT-474、Hs57Bst、SK-BR-3、CRL-1897およびMDA-468)。鋳型を使用しないで実施したRT-PCR反応はdH₂Oとして示 50

す。(B) PCR法は、TARP(上のパネル)またはアクチン(下のパネル)に特異的なプライマーを使用し、12のヒト乳癌組織試料由来のcDNAを使用して実施した。鋳型を使用しないで実施したRT-PCR反応はdH₂Oとして示す。両パネルについて、PCR産物の20%は1%アガロースゲル上で走査し、臭化エチジウム染色で可視化した。

【図12】乳癌細胞系統において見いだされるTARP転写物は前立腺特異的な形態と同一である。(A) TCR 遺伝子座およびTARPが前立腺細胞においてどのように転写され、スプライシングされるかの略図。パネルBのRT-PCR分析に使用されるプライマーを示す。(B) TARP mRNA発現のRT-PCR分析。TARPプライマー1および3(上のパネル)、TARPプライマー2および3(真ん中のパネル)またはアクチンプライマー(下のパネル)を使用したPCR反応は、前立腺細胞系統(LNCaPおよびPC3)および乳癌細胞系統(MCF7、BT-474、SK-BR-3およびHs578Bst)由来のcDNAを用いて実施した。鋳型を使用しないで実施したRT-PCR反応はdH₂Oとして示す。PCR産物の20%は1%アガロースゲル上で走査し、臭化エチジウム染色で可視化した。(C) TARP転写物のノーザンブロット分析。前立腺細胞系統(LNCaPおよびPC3)および乳癌細胞系統(MCF7、BT-474、SK-BR-3およびHs578Bst)由来の2μgのポリ(A)mRNAをプローブとして不変領域断片を使用して分析した。24時間の露出後オートラジオグラフを作製した(上のパネル)。同じフィルターを帯状にし、ヒト-アクチンRNAプローブを用いて分析して等しい負荷量を証明した。1時間の露出後にオートラジオグラフを作製した(下のパネル)。ヌクレオチドにおけるRNAサイズマーカーは左に示す。

【図13】TARPは乳癌細胞の核に存在する。(A) LNCaP、MCF7、BT-474、SK-BR-3およびHs578Bst細胞由来の核抽出物のウェスタンブロット。各核抽出物の40μgを16.5%トリストリシゲル上で走査し、TARP(上のパネル)またはTCR(下のパネル)に対する抗体でプロービングした。陽性対照として、1μgのヒスチジン標識したTARP(His-TARP)および100ngのヒスチジン標識したTCR(His-TCR)をゲル上で走査した。kDaで示すサイズマーカーを左に示す。

【図14】TARPの可能な機能的領域。(A) TARPはロイシンジッパーモチーフおよびリン酸化部位と思われるものを含有する。ロイシンジッパーモチーフと思われるものを箱つきロイシンと次の下線つき塩基領域で示す。cAMP依存のおよびcGMP依存のタンパク質キナーゼリン酸化部位(アミノ酸46~49および55~58)ならびにプロテインキナーゼCリン酸化部位(アミノ酸19~21および20~22)を概略する。(B) TARPとTup1のタンパク質配列の比較。TARPのアミノ酸配列(42~57)、ディクチオステリウム ディコイデム(Dictyostelium discoideum) Tup1(dTup1, 521~536)およびサッカロミセスセレビジエ(Saccharomyces cerevisiae) Tup1(yTup1, 626~660)を示す。保存されている残基を囲みにしてある。

10

20

30

【 図 1 】

TCR γ 遺伝子座由来の前立腺特異的転写物

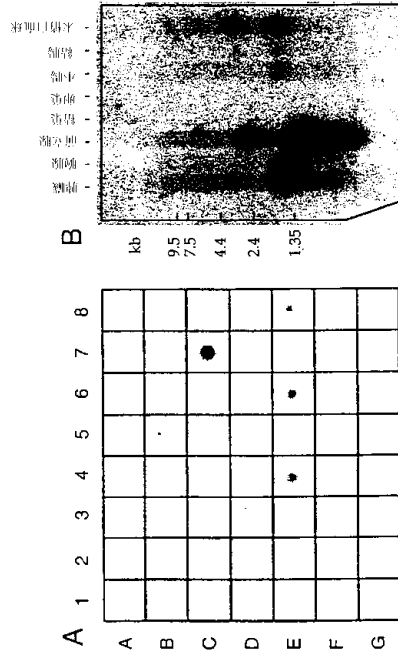
```

GGGCAAGAGCTTGGCCAAAATAAAGGTTATGGTCCCGGAACAAGCTTATCATTACA 60
<----- 1.2 ----->
N Q M F P P S P L F F F L Q L L K Q S S R R 20
GATAAACAACTTGGCAGATGTTTCCCGCAAGCCACTATTTCTCTCTCAATGCTGAACAAGCTCCGAGAGGC 140
----- C 1 (シクル CI) -----
L E H T F V F L R N F S L K L L R Y I G K K R R A T R 40
TGGACATACCTTTGTCTCTGGAGAAATTTTCCCTGATGTTATTAAGATACATTGGCAAGAAAGAGAGCAACACCA 220
-----
F W D P R R G T P 58
TTCGGGATCCCGAGGGGAACACCATGAAGACTAACGCACATACATGAAATTTAGCTGGTTAACGGTCCAGAAAAG 300
-----
S L D K E M R C I V R H E N N K N G V D Q E I I F P P 40
TCACTGGACAAAAGAACACAGATGTATGCTCGACATGAGAATAAATAAAGCGGAGTTGATCAAGAAAATATCTTCTCTCC 380
-----
I K T D V I T M D P K D N C S K D A N D T L L L L Q L 60
AATGAGACGGATGTCATCACAAATGGATCCCAAGACAATGTTCAAAAAGATGCAAAATGATACACTACTGCTCCAGCTCA 460
----- C 1 (シクル CII) -----
T N T S A Y V N L L L L L L K S V V Y P A I I T C C L 80
CAAGACCTCTGCATATACATGCTCTCTCTCTCTCAAGATGTGGCTTATTTGGCATCATCAGCTGCTGCTG 540
----- C 1 (シクル CII) -----
L R R T A P C E N S K S 100
CTTAGAAGAAGCGCTTTCTCTGCAATGGAGAGAAATCTAACAAGCGGTGGCACAGGAGGCCATCTTTTCCCTCATCGG 620
-----
TTATTGTCCTAGAAAGCGTCTTCTGAGGATCTAGTGGGCTTTCTTCTGGGTGGGGCAATTCAGTCTCATGTGTGT 700
ACTATTCTATCATATATGATTAACGGTTTCAACAGTGGGCACACAGAGAACCTCCTCTGTAATAACAATGAGGAAT 780
AGCCACGGGGATCTCCAGCCCAATCTCTCAAGTTTTCCAGAGCTCTCCGACCAACCCAAATAGCGCCCTATAGTG 860
TAGACATCTCGCGCTCTAGCCCTGCTCCCTCTCTAGTGTCTTTAAATCAGATAACTGCGTGGAAAGCTTTTCATTTTAC 940
ACGCCCTGAAGCAGTCTCTTGTGATGTAATATATGGGTGTGTTTCCCGTAATAGCAAAATAATTTAAAAAATG 1020
AAAAATT 1027

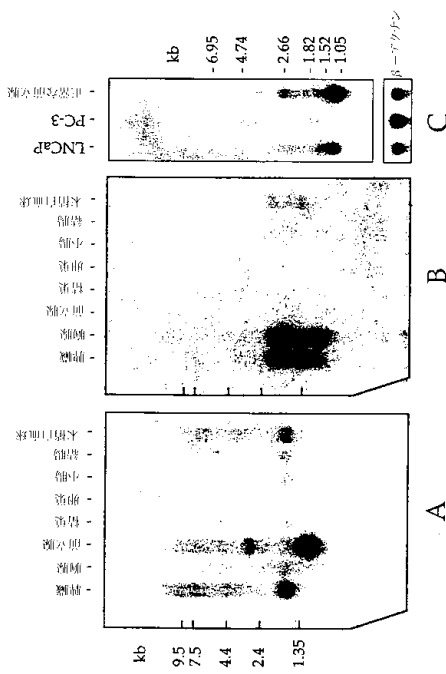
```

上線付きの配列は以下のようである:
 ・転写開始部位 (GCAAG (配列内))
 ・ポリアデニル化シグナル (AATAAA)
 下線付きの配列は以下のようである:
 ・考えられる転写開始コドン (ATC)

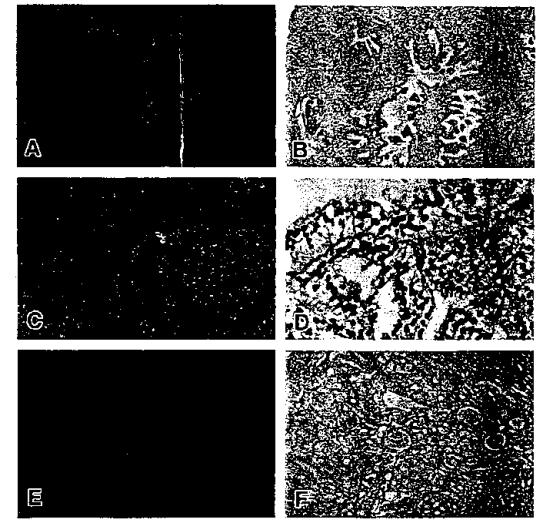
【 図 2 】



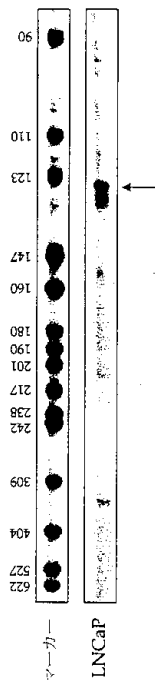
【 図 3 】



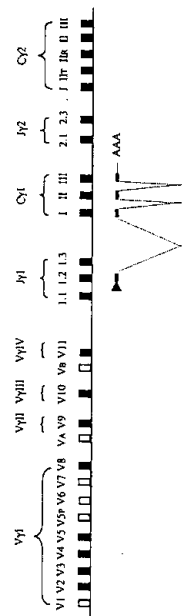
【 図 4 】



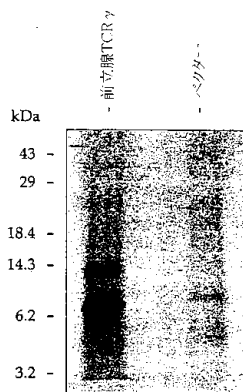
【 図 5 】



【 図 6 】

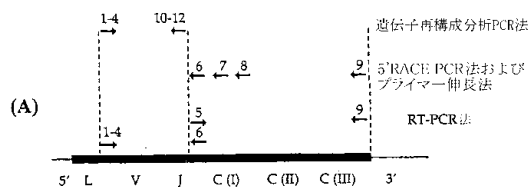


【 図 7 】



【 図 8 】

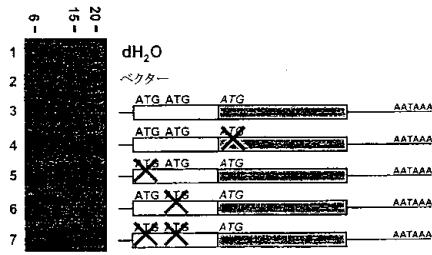
表1. 前立腺TCRγ転写物の分析に使用するプライマー()



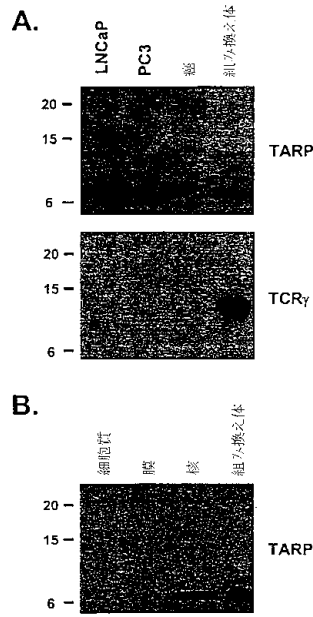
名称	アニーリング	プライマー配列 5'→3'
1. TCRV _γ I.F	V _γ サブグループ I	AACTTGGGAAGGGAACRAAGTCAGTC
2. TCRV _γ II.F	V _γ サブグループ II	AGTACTAAAACGCTGTCAAAAACAGCC
3. TCRV _γ III.F	V _γ サブグループ III	TTGGACTTGGATTATCAAAAGTGG
4. TCRV _γ IV.F	V _γ サブグループ IV	TTGGGCAGTTGGAACAACCTGAAA
5. TCR _{C_γ} F	C _γ エクソン CI	GATAAACAACCTGATGCAGATGTTCCCC
6. TCR _{C_γ} R1	C _γ エクソン CI	GGGAAACATCTGCATCAAGTGTGTTATC
7. TCR _{C_γ} R2	C _γ エクソン CI	CTGGAGCTTTGTTTCAGCAATTGAAGG
8. TCR _{C_γ} R3	C _γ エクソン CI	CTCAAGAAGACAAAGGTATGTTCCAGC
9. TCR _{C_γ} R4	C _γ エクソン CIII	TTATGATTTCTCTCCATTGCAGCAG
10. TCRJ _γ 1.1.R	J _γ 1.1	GAAGTACTATGAGCTTAGTCCCTT
11. TCRJ _γ 1.2.R	J _γ 1.2	AAGCTTTGTTCCGGGACCAATAC
12. TCRJ _γ 1.3.R	J _γ 1.3	TACCTGTGACAACAAGTGTGTTC

R=A+G

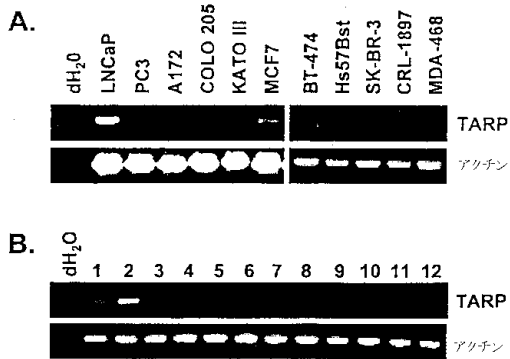
【 図 9 】



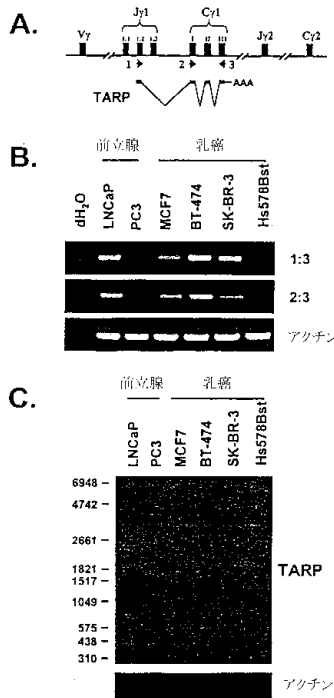
【 図 10 】



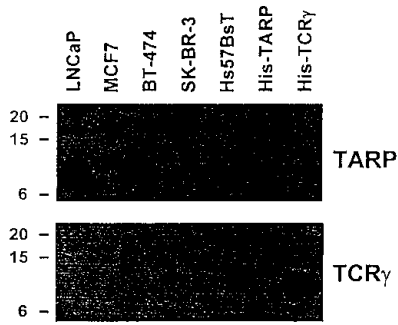
【 図 11 】



【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

A.

MQMFPPSP FFFLQL KQSSRR
LEHTFVF LRNFSLM LLRYIGKKR
RATRFWDPR RGTP

B.

TARP	G	K	K	R	R	A	T	R	F	W	D	P	R	R	G	T
DTUP1	G	S	K	D	R	S	V	Q	F	W	D	P	R	N	G	T
YTUP1	G	S	K	D	R	G	V	L	F	W	D	K	K	S	G	N

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 January 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/04309 A1

(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, A61K 38/17, C12Q 1/68, G01N 33/50,
C07K 16/18

(US) WOLFGANG, Curt [US/US]; 11479 Stony Point
Pl., Germantown, MD 20876 (US).

(21) International Application Number: PCT/US00/19039

(74) Agents: HYMAN, Laurence, J. et al.; Townsend and
Townsend and Crew LLP, 8th Floor, Two Embarcadero
Center, San Francisco, CA 94111-3834 (US).

(22) International Filing Date: 12 July 2000 (12.07.2000)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, 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,
NG, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
90/143,360 13 July 1999 (13.07.1999) US
60/157,471 1 October 1999 (01.10.1999) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BI, CE, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA, as represented by THE SECRETARY OF
THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES [US/US]; Bethesda, MD 20892 (US).

Published:

— With international search report.
— Before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments.

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): PASTAN, Ira
[US/US]; 11710 Reel Mountain Road, Potomac, MD
20854 (US), ESSAND, Magnus [SE/US]; Apartment 629,
3133 Connecticut Avenue, N.W., Washington, DC 20008
(US), LEE, Byungkook [US/US]; 10711 Sandy Landing
Road, Potomac, MD 20854 (US), VASMATZIS, George
[GR/US]; 2819 4th Avenue, N.W., Rochester, MN 55901

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/04309 A1

(54) Title: T-CELL RECEPTOR γ ALTERNATE READING FRAME PROTEIN, (TARP) AND USES THEREOF

(57) Abstract: This invention provides nucleic acids containing sequences from a TCR γ transcript from prostate epithelial cells and many breast cancer cells and a T-cell receptor gamma Alternate Reading frame Protein ("TARP") expressed from the translation of those sequences. Vaccines made from TARP are useful in raising immune responses to cells in which the protein is expressed, including prostate cancer cells and cells of many breast cancers. The invention also provides methods for diagnosing the presence of prostate cancer and TARP-expressing breast cancers, as well as methods of administering TARP and nucleic acids encoding TARP to subjects.

WO 01/04309

PCT/US00/19039

**T-CELL RECEPTOR γ ALTERNATE READING FRAME PROTEIN,
(TARP) AND USES THEREOF****CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS**

5 This application claims priority from U.S. Provisional Application No. 60/143,560, filed July 13, 1999, and U.S. Provisional Application No. 60/157,471, filed October 1, 1999. The contents of both of these applications are hereby incorporated by reference.

**STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER
10 FEDERALLY SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT**

Not applicable.

BACKGROUND OF THE INVENTION

This invention is directed to the fields of molecular biology and medical diagnostics and therapeutics.

15 Prostate cancer is the most prevalent form of human cancer and the third most common cause of cancer death in men. Methods for early detection and treatment of this disease would decrease the rate of prostate cancer deaths. Tumor-associated proteins, which are proteins expressed by malignant cells but few others, are useful as targets for detection and for intervention. Several proteins associated with prostate cancer
20 have been identified, including prostate specific antigen (PSA).

Immunotherapy is a potent new weapon against cancer. Immunotherapy involves evoking an immune response against cancer cells based on their production of target antigens. While humoral immune responses against cancer cell antigens have uses, it is preferred to invoke a cell-mediated immune response against cancer cells.

25 Immunotherapy based on cell-mediated immune responses involves generating a cell-mediated response to cells that produce particular antigenic determinants. Cancer cells produce various proteins that can become the target of immunotherapy. Certain cancers produce novel proteins, for example as a result of mutation, that are immunogenic. However, investigators also have discovered tumor infiltrating lymphocytes that
30 specifically recognize un-mutated proteins of cancer cells. For example, Rosenberg *et al.* have shown that tumor infiltrating lymphocytes target and recognize antigenic

WO 01/04309

2

PCT/US00/19039

determinants of the protein MART-1, produced by both normal melanocytes and malignant melanoma cells. Furthermore, active or passive immunotherapy directed against MART-1 or peptides of it that bind to MHC Class I molecules (epitopes of HLA A2, in particular) results in the destruction of melanoma cells as well normal cells that produce MART-1. Y. Kawakami *et al.*, *J. Immunol.* 21:237 (1998).

Novel cancer antigens are expected to provoke an immune response because the immune system will recognize them as non-self proteins. However, the ability of the immune system to invoke an immune response against an un-mutated self protein was surprising because the immune system develops tolerance to self proteins. It is believed that this immune response is directed against antigenic determinants that normally are not exposed to the immune system in sufficient quantity to invoke either tolerance or an immune response. In cancer, however, these determinants no longer escape detection by the immune system. This may result from increased presentation of the determinants by MHC Class I molecules.

The cell-mediated immune response involves the activity of Major Histocompatibility Complex molecules. In humans, this complex is called the "HLA" ("Human Leukocyte Antigen") complex. In mice, it is referred to as the "H-2" complex. The major histocompatibility complex includes three classes of proteins, MHC class I, MHC class II and MHC class III. MHC class I molecules are expressed on the surface of nearly all nucleated cells. They present antigen peptides to T_C cells (CD8+). There are three MHC class I gene loci in humans, HLA A, HLA B and HLA C. Each locus is highly polymorphic. Therefore, a person may have up to six different kinds of HLA molecules on the surface of their cells. MHC Class II proteins are expressed primarily on antigen presenting cells such as macrophages, dendritic cells and B cells, where they present processed antigenic peptides to T_H cells. There are three MHC Class II gene loci in humans, HLA DP, HLA DQ and HLA DR. MHC class III proteins are associated with various immune processes, and include soluble serum proteins, components of the complement system and tumor necrosis factors. J. Kuby, Chapter 9, IMMUNOLOGY, Third Edition W.H. Freeman and Company, New York (1997).

In cancer cells as well as healthy cells, MHC class I molecules present epitopes from endogenous proteins for presentation to T_C cells. HLA A, HLA B and HLA C molecules bind peptides of about 8 to 10 amino acids in length that have particular anchoring residues. The anchoring residues recognized by an HLA class I molecule depend upon the particular allelic form of the HLA molecule. A CD8+ T cell

WO 01/04309

3

PCT/US00/19039

bears T cell receptors that recognize a specific epitope when presented by a particular HLA molecule on a cell. When a T_C cell that has been stimulated by an antigen presenting cell to become a cytotoxic T lymphocyte contacts a cell that bears such an HLA-peptide complex, the CTL forms a conjugate with the cell and destroys it.

5 The presentation of peptides by MHC Class I molecules involves the cleavage of an endogenously produced protein into peptides by the proteasome, its processing through the ER and Golgi apparatus, its binding to the cleft in an MHC Class I molecule through the anchor residues of the peptide and ultimate presentation on the cell surface. Depending upon the particular anchor residues, among other things, certain
10 peptides may bind more tightly to a particular HLA molecules than others. Peptides that bind well are referred to as "dominant" epitopes, while those that bind less well are termed "subdominant" or "cryptic" epitopes. Dominant epitopes of either self proteins or foreign proteins evoke strong tolerance or immune responses. Subdominant or cryptic epitopes generate weak responses or no responses at all. It is hypothesized that tighter
15 binding by dominant epitopes to HLA molecules results in their denser presentation on the cell surface, greater opportunity to react with immune cells and greater likelihood of eliciting an immune response or tolerance.

Investigation has shown that in the case of the MART-1 protein, a self protein, the immune system generates the greatest CTL response against subdominant or
20 cryptic epitopes. Y. Kawakami *et al.* 1997 *Immunol. Res.* 16:313. It may be that in cancer cells subdominant or cryptic epitopes are presented much more densely or in greater amounts than is normal; consequently, the immune system encounters these previously undetected epitopes, recognizes them as foreign and generates an immune response against them. Whatever the reason, exposing the immune system to large
25 amounts of subdominant or cryptic epitopes of self proteins as a means of eliciting an immune response against cells that produce that protein is a key element of cancer immunotherapy. Of course, eliciting an immune response against a self protein will result in the destruction of both cancerous cells and healthy cells. Therefore, for such immunotherapy to succeed, the healthy cells must either be non-essential for life or have
30 functions that are replaceable by other therapies. In the case of prostate cancers and breast cancer, surgical removal of the prostate or breast, respectively, is a frequent therapeutic intervention. In such cases, most or all of the tissue displaying a prostate or breast antigen will be a tumor cell.

WO 01/04309

PCT/US00/19039

4

SUMMARY OF THE INVENTION

We have discovered that prostate cells of epithelial origin both healthy and cancerous, transcribe a portion of an unrearranged TCR γ gene. While *in vitro*, this transcript resulted in two proteins, one of which is a truncated form of TCR γ , our studies show, surprisingly, that *in vivo*, the protein expressed is not a TCR γ protein, but a protein expressed from an alternate reading frame. Accordingly, the protein has been designated the TCR γ Alternate Reading Frame Protein, or "TARP."

We have discovered that TARP is expressed in prostate cells of epithelial origin and in prostate cancer cells. Surprisingly, we have discovered that the same protein is expressed in many breast cancer cells. TARP is therefore useful as a marker of prostate cancer cells and of breast cancer cells which express TARP ("TARP-expressing breast cancers") and as a basis for immunotherapy. This invention provides both the nucleic acids and the protein in isolated or recombinant form. Although we have now found that the protein is expressed in many breast cancer cells, it was first identified in prostate cells, and will sometimes be referred to below as prostate-specific ("PS")-TCR γ .

In one aspect, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of the TCR γ Alternate Reading frame Protein ("TARP"). The invention further provides immunogenic fragments of TARP (fragments which can raise an antibody which specifically recognizes and binds to full-length TARP or which activates a T-cell to recognize a cell expressing TARP), polypeptides with at least 90% sequence identity to TARP and which are specifically recognized by antibodies which specifically recognizes TARP, and polypeptides with at least 90 % sequence identity with TARP and which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activate T lymphocytes against cells which express TARP. The invention further provides compositions in TARP, immunogenic fragments thereof, or peptides with at least 90% sequence identity and which meet the functional criteria noted above are present in a pharmaceutically acceptable carrier.

In another set of embodiments, the invention provides isolated, recombinant nucleic acid molecules which encode a polypeptide having the amino acid sequence of a TCR γ Alternate Reading frame Protein ("TARP"), which encode an immunogenic fragment thereof, which encode a polypeptide with at least 90% sequence identity to TARP and which is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP, or which encode a polypeptide which has at least 90 % sequence

WO 01/04309

5

PCT/US00/19039

identity with TARP and which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.

In yet another series of embodiments, the invention provides methods comprising administering to a subject a composition, which composition is selected from the group consisting of: an isolated polypeptide having the amino acid sequence of a TCR γ Alternate Reading frame Protein ("TARP"), an immunogenic fragment thereof, a polypeptide with at least 90% sequence identity to TARP and which is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP, and a polypeptide which has at least 90 % sequence identity with TARP and which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.

The invention further provides methods of administering to a subject a composition, which composition is selected from the group consisting of: an isolated nucleic acid encoding TARP, an immunogenic fragment thereof, a polypeptide with at least 90% sequence identity to TARP and which is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP, and a polypeptide which has at least 90 % sequence identity with TARP and which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.

The invention further provides methods of administering to a subject a composition, which composition comprises an antigen presenting cell pulsed with a polypeptide comprising an epitope of TARP. Additionally, the invention provides methods of administering to a subject a composition, which composition comprises cells sensitized in vitro to TARP, an immunogenic fragment thereof, a polypeptide with at least 90% sequence identity to TARP which is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP, or a polypeptide which has at least 90 % sequence identity with TARP which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.

The compositions of the methods described above can be administered to a subject who suffers from prostate cancer, to a subject who suffers from breast cancer, or to a female subject who has not been diagnosed with breast cancer.

WO 01/04309

PCT/US00/19039

6

The methods further contemplate sensitizing CD8+ cells *in vitro* to an epitope of a TARP protein and administering the sensitized cells to the subject. The CD8+ cells may be T_C cells. In some embodiments, the T_C cells may be are tumor infiltrating lymphocytes.

5 Additionally, the methods may comprise co-administering to the subject an immune adjuvant selected from non-specific immune adjuvants, subcellular microbial products and fractions, haptens, immunogenic proteins, immunomodulators, interferons, thymic hormones and colony stimulating factors.

10 The methods may further comprise administering an antigen presenting cell pulsed with a polypeptide comprising an epitope of TARP or administering a nucleic acid sequence encoding polypeptide comprising an epitope of TARP, which nucleic acid is in a recombinant virus. The methods further comprise administering a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising an epitope of a TARP protein.

15 Additionally, the methods comprise administering an expression vector that expresses a polypeptide comprising an epitope of a TARP protein, which expression vector is in a recombinant bacterial cell. Further, the methods comprise immunizing a subject with a expression vector that expresses a polypeptide comprising an epitope of a TARP protein, which expression vector is in an autologous recombinant cell.

20 In another aspect, this invention provides a method for detecting, in a male, a prostate cell of epithelial origin, or, in a female, a breast cancer cell, comprising detecting in a cell from said male or said female a nucleic acid transcript encoding TARP, or detecting TARP produced by translation of the transcript, whereby detection of the transcript or of the protein in a cell from said male identifies the cell as a prostate epithelial cell and whereby detection of the transcript or of the protein in a cell from said female identifies the cell as a breast cancer cell. The methods may comprise contacting RNA from the cell with a nucleic acid probe that specifically hybridizes to the transcript under hybridization conditions, and detecting hybridization. Moreover, the methods may include disrupting a cell and contacting a portion of the cell contents with a chimeric molecule comprising a targeting moiety and a detectable label, wherein the targeting moiety specifically binds to the protein, and detecting the label bound to the protein. The targeting moiety itself may also be labelled (for example, an antibody such as an scFv may have a radioactive residue).

25 30

The cell being examined may be from a lymph node, or it may be from a breast biopsy.

WO 01/04309

7

PCT/US00/19039

Finally, the invention provides antibodies that specifically bind to an epitope of a TCR γ Alternate Reading frame Protein.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5

FIGURE 1. Nucleotide sequence (SEQ ID NO:13) of PS-TCR γ transcript. In *in vitro* translation systems, this transcript produces two polypeptides. A first polypeptide has a deduced amino acid sequence beginning MQM... ("PS-TCR γ -1", now called "TARP," SEQ ID NO:14). This polypeptide has a predicted mass of 7.2 kD. It is translated from a reading frame which does not coincide with the natural TCR γ reading frame. A second polypeptide has a deduced amino acid sequence beginning MKT... ("PS-TCR γ -2" SEQ ID NO:15). It has a predicted mass of 13 kD. It is translated from the same reading frame as TCR γ and represents a truncated version of TCR γ . Single underlined sequences in the figure indicate the transcription initiation site and a polyadenylation site.

10

FIGURE 2. Hybridization analysis of TCR γ mRNA expression. Figure 2A) Multiple tissue dot blot showing differential expression of human TCR γ . Positive tissues are prostate (C7), small intestine (E3), spleen (E4), thymus (E5), peripheral leukocyte (E6), lymph node (E7), bone marrow (E8) and lung (F2). Figure 2B). Northern blot showing TCR γ transcript sizes in normal tissues. Two TCR γ transcripts expressed in prostate are 1.1 kb and 2.8 kb while the predominant transcript in spleen, thymus and peripheral blood leukocytes is 1.5 kb. The film was exposed for 20 hours.

15

FIGURE 3. Northern blot analysis of TCR $\gamma\delta$ expression. Figure 3A) A TCR γ constant domain (TCR C γ) cDNA probe shows the 1.1 and 2.8 kb prostate-specific transcripts (compare with Fig. 2B). The film was exposed for 20 hours. Figure 3B) A TCR δ constant domain (TCR C δ) cDNA probe reveals that TCR δ mRNA is not expressed in prostate while expression is seen in spleen, thymus and peripheral blood leukocytes. The film was exposed for 50 hours. Figure 3C) A TCR C γ cDNA probe shows that the LNCaP cell line expresses TCR γ while the PC-3 cell line does not. The film was exposed for 20 hours. Human β -actin mRNA expression was analyzed as a control.

20

25

30

FIGURE 4. RNA in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections using a TCR γ (C γ 1-3' UTR) anti-sense, ³⁵S-labeled riboprobe. The left panel photos are from dark field microscopy, while the corresponding right panel photos are

WO 01/04309

8

PCT/US00/19039

from in bright field microscopy. The bright grains shown in pictures taken in dark field are signals of RNA hybridization. 4A) Prostate tissues from a 67 year old man showing positive acinar epithelial cells and negative stromal cells, (5x magnification). 4B) Bright field of 4A. 4C) Higher magnification (40x) showing positive areas in the lower right corner. 4D) Bright field of 4C. 4E) Kidney tissues showing no RNA hybridization, (5x magnification). 4F) Bright field of 4E.

FIGURE 5. Primer-extension of LNCaP mRNA. The reverse primer anneals in the constant domain of TCR γ , starting 75 nucleotides from the 5' end of C γ 1. The reverse transcription stopped at approximately 128 nucleotides, indicated by the arrow, revealing that the transcript is initiated approximately 53 nucleotides upstream of C γ 1. The lane with TCR γ reverse transcription of LNCaP was exposed for 72 hours while the marker lane was exposed for 8 hours.

FIGURE 6. The prostate TCR γ transcript. Illustration on how the prostate TCR γ is transcribed and spliced. The transcript consist of a J γ 1.2 segment, the three exons of C γ 1, followed by untranslated sequence.

FIGURE 7. *In vitro* transcription-coupled translation analysis of the prostate TCR γ . Two proteins with estimated sizes of 8 and 13 kDa were obtained (lane 1). Negative control reactions using the empty vector (lane 2) did not yield any protein product.

FIGURE 8. Primers used for analysis of PS-TCR γ transcript. (SEQ ID NOs:1-12).

FIGURE 9. *In vitro* translation analysis of the prostate-specific TCR γ transcript. The prostate-specific TCR γ transcript encodes two proteins *in vitro*. ³⁵S-Met labeled *in vitro* translated proteins were run on a 16.5% Tris-Tricine gel and analyzed by autoradiography. A schematic representation of the mutant constructs used is shown on the right. An open box represents the first reading frame with potential initiation codons in bold whereas the second reading frame is represented by a shaded box with the potential initiation codon in italics. "X" indicates an ATG codon mutated to ATA. Size markers in kDa are indicated on the top.

FIGURE 10. TARP is nuclear protein expressed in prostate extracts. Western blot of protein extracts derived from LNCaP cells, PC3 cells or a prostate tumor sample (Cancer). 20 μ g of each protein extract were run on a 16.5% Tris-Tricine gel and probed with an antibody against TARP (top panel) or TCR γ (bottom panel). As a positive

WO 01/04309

9

PCT/US00/19039

control, 1 μ g of His-tagged TARP (top panel) or 100 ng of His-tagged TCR γ (bottom panel) were run on the gel (Recomb.). Size markers in kDa are indicated on the left. (B) Western blot of the cytoplasmic fraction (Cytoplasm), membrane fraction (Membrane) and nuclear fraction (Nucleus,) of LNCaP cells. 40 μ g of each fraction were run on a
 5 16.5% Tris-Tricine gel and probed with an antibody against TARP. As a positive control, 1 μ g of His-tagged TARP was run on the gel (Recomb.). Size markers in kDa are indicated on the left.

FIGURE 11. *TARP* mRNA is expressed in breast cancer cells.

(A) RT-PCR was performed with primers specific for *TARP* (top panels)
 10 or *actin* (bottom panels) using RNA derived from the following cell lines: prostate (LNCaP and PC3), neuroblastoma (A172), colon (COLO 205), gastric (KATO III) and breast (MCF7, BT-474, Hs57Bst, SK-BR-3, CRL-1897 and MDA-468). RT-PCR reactions performed without template are indicated as dH₂O. (B) PCR was performed using cDNAs derived from 12 human breast cancer tissue samples (lanes 1-12) using
 15 primers specific for *TARP* (top panel) or *actin* (bottom panel). PCR reactions performed without template are indicated as dH₂O. For both panels, 20% of the PCR products were run on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

FIGURE 12. The *TARP* transcript found in breast cell line is the same as the prostate-specific form. (A) Schematic of the *TCR γ* locus and how *TARP* is
 20 transcribed and spliced in prostate cells. Primers used for RT-PCR analysis in Panel B are indicated. (B) RT-PCR analysis of *TARP* mRNA expression. PCR reactions using *TARP* primers 1 and 3 (top panel), *TARP* primers 2 and 3 (middle panel) or *actin* primers (bottom panel) were performed with cDNAs derived from prostate cell lines (LNCaP and PC3) and breast cell lines (MCF7, BT-474, SK-BR-3 and Hs578Bst). RT-PCR reactions
 25 performed without template are indicated as dH₂O. 20% of the PCR products were run on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. (C) Northern blot analysis of *TARP* transcripts. 2 μ g poly(A) mRNA from prostate cell lines (LNCaP and PC3) and breast cell lines (MCF7, BT-474, SK-BR-3 and Hs578Bst) were analyzed using a constant domain fragment as probe. The autoradiograph was generated after a 24-hour exposure (top panel). The same filter was stripped and analyzed with a human β -*actin*
 30 RNA probe to verify equal loading. The autoradiograph was generated after a 1-hour exposure (bottom panel). RNA size markers in the nucleotides are indicated on the left.

WO 01/04309

10

PCT/US00/19039

FIGURE 13. TARP exists in the nuclei of breast cancer cells. (A) Western blot of nuclear extracts derived from LNCaP, MCF7, BT-474, SK-BR-3 and Hs578T cells. 40 µg of each nuclear extract were run on a 16.5% Tris-Tricine gel and probed with an antibody against TARP (upper panel) or TCRγ (bottom panel). As a positive control, 1 µg of His-tagged TARP (His-TARP) and 100 ng of His-tagged TCRγ (His-TCRγ) were run on the gels. Size markers in kDa are indicated on the left.

FIGURE 14. Potential functional domains of TARP. (A) TARP contains a potential leucine zipper motif and phosphorylation sites. A potential leucine zipper motif is indicated with boxed leucines followed by a basic region that is underlined. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (amino acids 46-49 and 55-58) and protein kinase C phosphorylation sites (amino acids 19-21 and 20-22) are outlined. (B) Protein sequence comparison of TARP with Tup1. Amino acids sequences for TARP (42-57), *Dictyostelium discoideum* Tup1 (dTup1, 521-536) and *Saccharomyces cerevisiae* Tup1 (yTup1, 626-660) are shown. Conserved residues are boxed.

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. INTRODUCTION

Surprisingly, it has been discovered that prostate cells of epithelial origin, and cells of many breast cancer s, express mRNA of the T-cell receptor gamma chain ("TCRγ"). The major TCRγ transcript in prostate has a different size than that expressed in T lymphocytes. The findings that prostate epithelial cells and many breast cancers express a high level of a transcript from a gene thought to be expressed exclusively in T lymphocytes is highly unexpected.

Because the TCRγ reading frame contains a good Kozak sequence (Kozak, *M. Cell* 44:283-92 (1986)), we initially hypothesized that a truncated TCRγ protein was encoded. Thus, it was an additional surprise to find that the *TCRγ* locus expressed in epithelial prostate cells and breast cancer cells encodes a 7 kDa nuclear protein. Because the protein is encoded from a reading frame different from TCRγ, we have named it "TARP," for TCRγ Alternate Reading frame Protein. Besides being translated from an alternate reading frame of a transcript originating within an intron of the *TCRγ* locus, TARP has two other unusual features. First, it is surprising to find such a small peptide in the cell because most are usually secreted. Second, TARP lacks a good Kozak sequence

In vitro and in vivo uses

The presence of this protein in prostate epithelial cells, prostate cancer cells, and cells of many breast cancers, creates a number of opportunities for *in vitro* and *in vivo* uses. First, antibodies raised against the protein can be used in *in vitro* assays to detect the presence of cells expressing TARP in a sample. For example, the Examples below demonstrate that TARP and the TARP transcript are not present, or are present at very low levels in normal breast cells, but are easily detected in cells of breast cancer which express TARP. Detection of high levels of TARP transcript or of TARP in breast cells removed from a subject therefore would be indicative of the presence of a TARP-expressing breast cancer in the subject. With respect to TARP expression in prostate cells, persons of skill in the art are aware that removal of the prostate is a frequent surgical intervention in aggressive prostate cancers. Detection of TARP in cells from an individual whose prostate has been removed is indicative that prostate cancer is present. (Persons of skill will recognize that approximately 1,000 men a year are diagnosed with breast cancer. Thus, it is not impossible that the patient also independently suffers from breast cancer. Given the fact that prostate cancer is over 200 times more common in men, and that the discussion concerns a patient already found to suffer from prostate cancer, the odds are small that the patient also independently suffers from breast cancer. The diagnosis can be confirmed by knowledge of the site from which the sample was taken, histologic and morphologic features of the cells, and other routine diagnostic criteria. In any event, since the presence of either condition demands further evaluation and monitoring, a determination that TARP-expressing cells are present in a male whose prostate has been removed is itself very useful regardless of whether the individual has prostate cancer, breast cancer, or both. Detection of TARP-expressing cells in a male who does not have prostate cancer is indicative of breast cancer.)

TARP itself, immunogenic fragments of TARP, and nucleic acids encoding TARP or immunogenic fragments thereof can also be used *in vitro* to activate cytotoxic T lymphocytes ("CTLs") derived from a subject to attack prostate cancer cells and TARP-expressing breast cancer cells when infused into the subject.

TARP itself, immunogenic fragments of TARP, nucleic acids encoding TARP, or immunogenic fragments thereof, can be administered to a subject, generally in a pharmaceutically acceptable carrier, to raise or to heighten an immune response to a prostate cancer or TARP-expressing breast cancer. Such compositions can be

WO 01/04309

12

PCT/US00/19039

administered therapeutically, in individuals who have been diagnosed as suffering from prostate cancer or a TARP-expressing breast cancer.

As discussed below, TARP is a nuclear protein which contains structural features characteristic of proteins which regulate transcription. It is expected that modulation of TARP levels in a cell will affect the growth of the cell, the replication of the cell, or both. Thus, modulation of TARP levels can be important in controlling a cancer cell's aggressiveness. TARP levels can be reduced in a cell by various modalities which impair the ability of the RNA transcript to be translated into a protein, such as ribozymes and antisense molecules. TARP levels in a cell can also be increased. For example, expression vectors containing nucleic acids encoding TARP, driven by a strong constitutive promoter, can be introduced into a cell. The constitutive transcription of the nucleic acids results in higher levels of protein expression in the cell.

The remainder of this section describes various structural features of TARP. The text continues with definitions used in this disclosure, and continues with discussions of the selection of immunogenic fragments of TARP, the administration of TARP to subjects, the formation of antibodies against TARP, detection of TARP transcript and protein, and pharmaceutical compositions.

Structural features of TARP

TARP contains five leucines in heptad repeats, suggesting that TARP contains a leucine zipper dimerization motif (Figure 7A). For this to be true, TARP must contain an amphipathic helix. One indication that TARP may contain an amphipathic helix is that serine and proline residues, residues believed to serve as a helix initiator, are found immediately before the first leucine repeat. Second, many charged amino acids are found within the heptad repeats thereby giving the helix an amphipathic nature and potentially serving as salt bridges with other helices. Even though the presence of leucines in heptad repeats is a good indication of a leucine zipper motif, there are proteins identified containing five leucines in heptad repeats that are not considered leucine zipper proteins. For example, the crystal structures for karyopherin (Chook, Y. M. *et al.*, *Nature* 399:230-237 (1999)), *B. stearothermophilus* pyrimidine nucleoside phosphorylase (Pugmire, M. J. *et al.*, *Structure* 6:1467-1479 (1998)) and *T. thermophilus* phenylalanyl-tRNA synthetase (Mosyak, L. *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 2:537-547 (1995)) have shown that these proteins do not contain α -helical structures in the region where the sequence contains five leucines in heptad repeats. Interaction and structure studies are needed to determine the significance of the leucine repeats found in TARP.

Another unusual feature of the TARP amino acid sequence is that a region of basic amino acids follows the potential leucine zipper motif (Figure 7A), suggesting a possible DNA-binding motif. However, the orientation of the basic region is rather unique in that it follows the leucine repeats rather than precedes them. Most leucine zipper proteins that bind DNA have the basic region before the leucine repeats (for a review, see (Chook, Y. M. *et al.*, *Nature* 399:230-237 (1999))). The basic region in TARP may only be functioning as a nuclear localization signal, but the fact that TARP is a nuclear protein strengthens the hypothesis that TARP may bind DNA.

To determine if TARP shares homology with any known proteins, we performed a protein BLAST search against GenBank. This search indicated that the amino acid sequence of TARP shares some homology to *Dictyostelium discoideum* Tup1 (GenBank accession no. AAC29438) and *Saccharomyces cerevisiae* Tup1 (Williams, F. E. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 10:6500-6511 (1990)) (Figure 7C). Yeast Tup1 is normally found in a complex with Cyc8(Ssn6) and is required for transcriptional repression of genes that are regulated by glucose, oxygen and DNA damage (Tzamarias, D. *et al.*, *Genes Dev.* 9:821-831 (1995)). Neither Cyc8(Ssn6) nor Tup1 binds DNA, but each acts as a part of a corepressor complex through interactions with specific DNA-binding proteins such as $\alpha 2$, Mig1, Rox1 and a1 (Tzamarias, D. *et al.*, *Genes Dev.* 9:821-831 (1995)). The C'-terminal half of Tup1 contains six repeats of a 43-amino acid sequence rich in aspartate and tryptophan, known as WD-40 or β -transducin repeats (Williams, F. E. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 10:6500-6511 (1990); Fong, H. K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2162-2166 (1986)). WD-40 repeats have been identified in many proteins and play a role in protein-protein interactions. Importantly, Tup1 has been shown to interact with $\alpha 2$ through two of its WD-40 repeats (Komachi, K. *et al.*, *Genes Dev.* 8:2857-2867 (1994)). It is interesting to note that TARP shares homology with the fifth WD-40 repeat of Tup1 (Figure 7C). Because TARP is a nuclear protein, its homology with Tup1 suggests that TARP is a member of a functional nuclear protein complex involved in transcriptional regulation.

The TARP antibody recognizes a doublet in prostate and breast nuclear extracts (Figure 6A). The faster 7 kDa band comigrates with the His-TARP recombinant protein, while the weaker band runs at a larger molecular weight. One possible explanation for the 9 kDa band is post-translational modifications. To determine if TARP contains any known post-translational modification sites, we analyzed the TARP amino acid sequence using the PROSITE program of the *Swiss Institute of Bioinformatics*

WO 01/04309

14

PCT/US00/19039

ExPASy proteomics server (<http://www.expasy.ch>) (Appel, R. D. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 19:248-260 (1994); Hofmann, K. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27:215-219 (1999)). As shown in Figure 7A, many potential phosphorylation sites were found including cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (RRAT and RRGT) and protein kinase C phosphorylation sites (SSR and SRR). Phosphorylation has been shown in many cases to cause a protein to run at a larger apparent molecular weight on an SDS-PAGE gel. If this is the case, the results from Figure 6 may indicate that the unmodified form is prevalent in LNCaP cells and that only the phosphorylated form is present in MCF7 and SK-BR-3 cells. TARP may therefore be post-translationally modified when expressed in prostate and breast cancer cells.

Our initial studies of the *TARP* transcript did not reveal *TARP* expression in the breast (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)). One possible explanation is that *TARP* is expressed at low levels in the normal breast and is difficult to detect. As described in the Results section, very weak signals were detected in a PCR analysis of normal breast samples as compared to the strong signals detected in the cancer samples. Therefore, the presence of *TARP* in breast cancer cells may indicate that *TARP* expression is induced after the oncogenic transformation of breast cells. In addition, the existence of *TARP* in breast cancer cells may indicate that *TARP* is regulated by estrogen. This hypothesis is strengthened by the identification of an element within the intronic promoter of *TARP* that combines an androgen response element (ARE) with an estrogen response element (ERE). This hybrid element consists of two half-sites specific to the ARE at the 5' end and to the ERE at the 3' end [(Zilliacus, J. *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 9:389-400 (1995) and unpublished data)]. Additional experiments are needed to determine if estrogen regulates *TARP*. There are instances, however, where mutant AREs cause the expression of certain prostate-specific genes in breast tumors. For example, *prostate specific antigen* (PSA) has been shown to be expressed in breast tumors (Majumdar, S. *et al.*, *Br. J. Cancer* 79:1594-1602 (1999)). Molecular analysis of the aberrant expression of PSA lead to the discovery of a single point mutation in one of the AREs found within the PSA promoter. It is believed that this mutation leads to the loss of androgen-regulated PSA expression in breast tumors (Majumdar, S. *et al.*, *Br. J. Cancer* 79:1594-1602 (1999)). It is unclear at this time whether a similar mutation in the *TARP* promoter occurs in the three breast cell lines tested.

The prostate is dependent on androgens for maintenance of its structure and function. When prostate cells become malignant, they often lose their androgen

WO 01/04309

15

PCT/US00/19039

dependence. In this study, we used two prostate cell lines that differ in their dependence on androgen for growth: LNCaP and PC3 cells. The androgen receptor is present in the androgen-dependent LNCaP cell line, but is absent in the androgen-independent PC3 cell line (Tilley, W. D. *et al.*, *Cancer Res.* 50:5382-5386 (1990)). As shown in Figure 3, 5 *TARP* is expressed in LNCaP cells but not in PC3 cells. This result suggests that *TARP* expression may be regulated by androgen stimulation. The identification of an ARE-like element within the *TARP* promoter strengthens the idea that *TARP* is induced by androgens. Expression in LNCaP cell but not in PC3 cells suggests that *TARP* is important in regulating androgen-dependent responses.

10

II. DEFINITIONS

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the meaning commonly understood by a person skilled in the art to which this invention belongs. The following references provide a general definition of many of the 15 terms used in this invention: Singleton *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2d ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5TH ED., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991). As used herein, the following terms have the meanings ascribed to them 20 unless specified otherwise.

"T cell receptor" refers to a heterodimer found on the surface of T cells comprising an α chain and a β chain or a γ and a δ chain. T cell receptors recognize processed antigens associated with MHC molecules.

"T-cell receptor γ Alternate Reading frame Protein" and "TARP" refer to 25 the polypeptide whose sequence is set forth, e.g., in Figure 14. The polypeptide is translated from a form of the T-cell receptor γ gene present as a transcript in prostate cells of epithelial origin, in prostate cancer cells, and in many breast cancers. Since "TARP" is an acronym the last part of which stands for the word "protein," "TARP protein" is redundant.

30 As used herein, nucleic acid transcripts from which TARP can be translated are referred to as "TARP nucleic acids" or "nucleic acids encoding TARP." The gene from which TARP is transcribed is referred to herein as a "TARP gene."

WO 01/04309

16

PCT/US00/19039

As used herein, an "immunogenic fragment" of TARP refers to a portion of TARP which, when presented by a cell in the context of a molecule of the Major Histocompatibility Complex, can in a T-cell activation assay, activate a T-lymphocyte against a cell expressing TARP. Typically, such fragments are 8 to 12 contiguous amino acids of TARP in length, although longer fragments may of course also be used.

In the context of comparing one polypeptide to another, "sequence identity" is determined by comparing the sequence of TARP, as the reference sequence, to a test sequence. Typically, the two sequences are aligned for maximal or optimal alignment.

A "ligand" is a compound that specifically binds to a target molecule.

A "receptor" is compound that specifically binds to a ligand.

"Cytotoxic T lymphocytes" ("CTLs") are important in the immune response to tumor cells. CTLs recognize peptide epitopes in the context of HLA class I molecules that are expressed on the surface of almost all nucleated cells.

Tumor-specific helper T lymphocytes ("HTLs") are also known to be important for maintaining effective antitumor immunity. Their role in antitumor immunity has been demonstrated in animal models in which these cells not only serve to provide help for induction of CTL and antibody responses, but also provide effector functions, which are mediated by direct cell contact and also by secretion of lymphokines (e.g., IFN γ and TNF- α).

"Antibody" refers to a polypeptide ligand comprising at least a light chain or heavy chain immunoglobulin variable region which specifically recognizes and binds an epitope (e.g., an antigen). This includes intact immunoglobulins and the variants and portions of them well known in the art such as, Fab' fragments, F(ab')₂ fragments, single chain Fv proteins ("scFv"), and disulfide stabilized Fv proteins ("dsFv"). An scFv protein is a fusion protein in which a light chain variable region of an immunoglobulin and a heavy chain variable region of an immunoglobulin are bound by a linker. Natural immunoglobulins are encoded by immunoglobulin genes. These include the *kappa* and *lambda* light chain constant region genes, the *alpha*, γ , *delta*, *epsilon* and *mu* heavy chain constant region genes, and the myriad immunoglobulin variable region genes. The term "antibody" includes polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies and humanized antibodies, produced by immunization, from hybridomas, or recombinantly.

"Epitope" or "antigenic determinant" refers to a site on an antigen to which B and/or T cells respond. Epitopes can be formed both from contiguous amino acids or noncontiguous amino acids juxtaposed by tertiary folding of a protein. Epitopes formed from contiguous amino acids are typically retained on exposure to denaturing solvents whereas epitopes formed by tertiary folding are typically lost on treatment with denaturing solvents. An epitope typically includes at least 3, and more usually, at least 5 or 8-10 amino acids in a unique spatial conformation. Methods of determining spatial conformation of epitopes include, for example, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. See, e.g., *Epitope Mapping Protocols* in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

A ligand or a receptor "specifically binds to" a compound analyte when the ligand or receptor functions in a binding reaction which is determinative of the presence of the analyte in a sample of heterogeneous compounds. Thus, the ligand or receptor binds preferentially to a particular analyte and does not bind in a significant amount to other compounds present in the sample. For example, a polynucleotide specifically binds to an analyte polynucleotide comprising a complementary sequence and an antibody specifically binds under immunoassay conditions to an antigen analyte bearing an epitope against which the antibody was raised.

"Immunoassay" refers to a method of detecting an analyte in a sample in which specificity for the analyte is conferred by the specific binding between an antibody and a ligand. This includes detecting an antibody analyte through specific binding between the antibody and a ligand. See Harlow and Lane (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York, for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity.

"Vaccine" refers to an agent or composition containing an agent effective to confer a therapeutic degree of immunity on an organism while causing only very low levels of morbidity or mortality. Methods of making vaccines are, of course, useful in the study of the immune system and in preventing and treating animal or human disease.

An "immunogenic amount" is an amount effective to elicit an immune response in a subject.

"Polypeptide" refers to a polymer composed of amino acid residues, related naturally occurring structural variants, and synthetic non-naturally occurring analogs thereof linked via peptide bonds, related naturally occurring structural variants,

WO 01/04309

18

PCT/US00/19039

and synthetic non-naturally occurring analogs thereof. Synthetic polypeptides can be synthesized, for example, using an automated polypeptide synthesizer. The term "protein" typically refers to large polypeptides. The term "peptide" typically refers to short polypeptides.

5 Conventional notation is used herein to portray polypeptide sequences: the left-hand end of a polypeptide sequence is the amino-terminus; the right-hand end of a polypeptide sequence is the carboxyl-terminus.

"Fusion protein" refers to a polypeptide formed by the joining of two or more polypeptides through a peptide bond formed by the amino terminus of one polypeptide and the carboxyl terminus of the other polypeptide. A fusion protein may be typically expressed as a single polypeptide from a nucleic acid sequence encoding the single contiguous fusion protein. However, a fusion protein can also be formed by the chemical coupling of the constituent polypeptides.

"Conservative substitution" refers to the substitution in a polypeptide of an amino acid with a functionally similar amino acid. The following six groups each contain amino acids that are conservative substitutions for one another:

- 1) Alanine (A), Serine (S), Threonine (T);
- 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E);
- 3) Asparagine (N), Glutamine (Q);
- 4) Arginine (R), Lysine (K);
- 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); and
- 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W).

Two proteins are "homologs" of each other if they exist in different species, are derived from a common genetic ancestor and share at least 70% amino acid sequence identity.

"Substantially pure" or "isolated" means an object species is the predominant species present (*i.e.*, on a molar basis, more abundant than any other individual macromolecular species in the composition), and a substantially purified fraction is a composition wherein the object species comprises at least about 50% (on a molar basis) of all macromolecular species present. Generally, a substantially pure composition means that about 80% to 90% or more of the macromolecular species present in the composition is the purified species of interest. The object species is purified to essential homogeneity (contaminant species cannot be detected in the composition by conventional detection methods) if the composition consists essentially of

WO 01/04309

19

PCT/US00/19039

a single macromolecular species. Solvent species, small molecules (<500 Daltons), stabilizers (e.g., BSA), and elemental ion species are not considered macromolecular species for purposes of this definition.

"Nucleic acid" refers to a polymer composed of nucleotide units

- 5 (ribonucleotides, deoxyribonucleotides, related naturally occurring structural variants, and synthetic non-naturally occurring analogs thereof) linked via phosphodiester bonds, related naturally occurring structural variants, and synthetic non-naturally occurring analogs thereof. Thus, the term includes nucleotide polymers in which the nucleotides and the linkages between them include non-naturally occurring synthetic analogs, such as, 10 for example and without limitation, phosphorothioates, phosphoramidates, methyl phosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, peptide-nucleic acids (PNAs), and the like. Such polynucleotides can be synthesized, for example, using an automated DNA synthesizer. The term "oligonucleotide" typically refers to short polynucleotides, generally no greater than about 50 nucleotides. It will be understood 15 that when a nucleotide sequence is represented by a DNA sequence (*i.e.*, A, T, G, C), this also includes an RNA sequence (*i.e.*, A, U, G, C) in which "U" replaces "T."

- Conventional notation is used herein to describe nucleotide sequences: the left-hand end of a single-stranded nucleotide sequence is the 5'-end; the left-hand direction of a double-stranded nucleotide sequence is referred to as the 5'-direction. The 20 direction of 5' to 3' addition of nucleotides to nascent RNA transcripts is referred to as the transcription direction. The DNA strand having the same sequence as an mRNA is referred to as the "coding strand"; sequences on the DNA strand having the same sequence as an mRNA transcribed from that DNA and which are located 5' to the 5'-end of the RNA transcript are referred to as "upstream sequences"; sequences on the DNA 25 strand having the same sequence as the RNA and which are 3' to the 3' end of the coding RNA transcript are referred to as "downstream sequences."

"cDNA" refers to a DNA that is complementary or identical to an mRNA, in either single stranded or double stranded form.

- "Encoding" refers to the inherent property of specific sequences of 30 nucleotides in a polynucleotide, such as a gene, a cDNA, or an mRNA, to serve as templates for synthesis of other polymers and macromolecules in biological processes having either a defined sequence of nucleotides (*i.e.*, rRNA, tRNA and mRNA) or a defined sequence of amino acids and the biological properties resulting therefrom. Thus, a gene encodes a protein if transcription and translation of mRNA produced by that gene

WO 01/04309

20

PCT/US00/19039

produces the protein in a cell or other biological system. Both the coding strand, the nucleotide sequence of which is identical to the mRNA sequence and is usually provided in sequence listings, and non-coding strand, used as the template for transcription, of a gene or cDNA can be referred to as encoding the protein or other product of that gene or
5 cDNA. Unless otherwise specified, a "nucleotide sequence encoding an amino acid sequence" includes all nucleotide sequences that are degenerate versions of each other and that encode the same amino acid sequence. Nucleotide sequences that encode proteins and RNA may include introns.

"Recombinant nucleic acid" refers to a nucleic acid having nucleotide
10 sequences that are not naturally joined together. This includes nucleic acid vectors comprising an amplified or assembled nucleic acid which can be used to transform a suitable host cell. A host cell that comprises the recombinant nucleic acid is referred to as a "recombinant host cell." The gene is then expressed in the recombinant host cell to produce, e.g., a "recombinant polypeptide." A recombinant nucleic acid may serve a non-
15 coding function (e.g., promoter, origin of replication, ribosome-binding site, etc.) as well.

"Expression control sequence" refers to a nucleotide sequence in a polynucleotide that regulates the expression (transcription and/or translation) of a nucleotide sequence operatively linked thereto. "Operatively linked" refers to a
20 functional relationship between two parts in which the activity of one part (e.g., the ability to regulate transcription) results in an action on the other part (e.g., transcription of the sequence). Expression control sequences can include, for example and without limitation, sequences of promoters (e.g., inducible or constitutive), enhancers, transcription terminators, a start codon (i.e., ATG), splicing signals for introns, and stop
codons.

"Expression cassette" refers to a recombinant nucleic acid construct
25 comprising an expression control sequence operatively linked to an expressible nucleotide sequence. An expression cassette generally comprises sufficient cis-acting elements for expression; other elements for expression can be supplied by the host cell or *in vitro* expression system.

"Expression vector" refers to a vector comprising an expression cassette.
30 Expression vectors include all those known in the art, such as cosmids, plasmids (e.g., naked or contained in liposomes) and viruses that incorporate the expression cassette.

A first sequence is an "antisense sequence" with respect to a second sequence if a polynucleotide whose sequence is the first sequence specifically hybridizes with a polynucleotide whose sequence is the second sequence.

Terms used to describe sequence relationships between two or more nucleotide sequences or amino acid sequences include "reference sequence," "selected from," "comparison window," "identical," "percentage of sequence identity," "substantially identical," "complementary," and "substantially complementary."

For sequence comparison of nucleic acid sequences, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Default program parameters are used. Methods of alignment of sequences for comparison are well-known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, e.g., by the local homology algorithm of Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual inspection (see, e.g., *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds 1995 supplement)).

One example of a useful algorithm is PILEUP. PILEUP uses a simplification of the progressive alignment method of Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987). The method used is similar to the method described by Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989). Using PILEUP, a reference sequence is compared to other test sequences to determine the percent sequence identity relationship using the following parameters: default gap weight (3.00), default gap length weight (0.10), and weighted end gaps. PILEUP can be obtained from the GCG sequence analysis software package, e.g., version 7.0 (Devereaux *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:387-395 (1984)).

Another example of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and the BLAST 2.0 algorithm, which are described in Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) and Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information

WO 01/04309

22

PCT/US00/19039

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a word length (W) of 11, alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands. The BLASTP program (for amino acid sequences) uses as defaults a word length (W) of 3, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

"Stringent hybridization conditions" refers to 50% formamide, 5 x SSC and 1% SDS incubated at 42° C or 5 x SSC and 1% SDS incubated at 65° C, with a wash in 0.2 x SSC and 0.1% SDS at 65° C.

10 "Naturally-occurring" as applied to an object refers to the fact that the object can be found in nature. For example, an amino acid or nucleotide sequence that is present in an organism (including viruses) that can be isolated from a source in nature and which has not been intentionally modified by man in the laboratory is naturally-occurring.

15 "Linker" refers to a molecule that joins two other molecules, either covalently, or through ionic, van der Waals or hydrogen bonds, e.g., a nucleic acid molecule that hybridizes to one complementary sequence at the 5' end and to another complementary sequence at the 3' end, thus joining two non-complementary sequences.

20 "Pharmaceutical composition" refers to a composition suitable for pharmaceutical use in a mammal. A pharmaceutical composition comprises a pharmacologically effective amount of an active agent and a pharmaceutically acceptable carrier.

"Pharmacologically effective amount" refers to an amount of an agent effective to produce the intended pharmacological result.

25 "Pharmaceutically acceptable carrier" refers to any of the standard pharmaceutical carriers, buffers, and excipients, such as a phosphate buffered saline solution, 5% aqueous solution of dextrose, and emulsions, such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents and/or adjuvants. Suitable pharmaceutical carriers and formulations are described in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Preferred
30 pharmaceutical carriers depend upon the intended mode of administration of the active agent. Typical modes of administration include enteral (e.g., oral) or parenteral (e.g., subcutaneous, intramuscular, intravenous or intraperitoneal injection; or topical, transdermal, or transmucosal administration). A "pharmaceutically acceptable salt" is a salt that can be formulated into a compound for pharmaceutical use including, e.g., metal

WO 01/04309

23

PCT/US00/19039

salts (sodium, potassium, magnesium, calcium, etc.) and salts of ammonia or organic amines.

A "subject" of diagnosis or treatment is a human or non-human mammal.

5 "Administration" of a composition refers to introducing the composition into the subject by a chosen route of administration. For example, if the chosen route is intravenous, the composition is administered by introducing the composition into a vein of the subject.

"Treatment" refers to prophylactic treatment or therapeutic treatment.

10 A "prophylactic" treatment is a treatment administered to a subject who does not exhibit signs of a disease or exhibits only early signs for the purpose of decreasing the risk of developing pathology.

A "therapeutic" treatment is a treatment administered to a subject who exhibits signs of pathology for the purpose of diminishing or eliminating those signs.

15 "Diagnostic" means identifying the presence or nature of a pathologic condition. Diagnostic methods differ in their sensitivity and specificity. The "sensitivity" of a diagnostic assay is the percentage of diseased individuals who test positive (percent of true positives). The "specificity" of a diagnostic assay is 1 minus the false positive rate, where the false positive rate is defined as the proportion of those without the disease who test positive. While a particular diagnostic method may not provide a definitive
20 diagnosis of a condition, it suffices if the method provides a positive indication that aids in diagnosis.

"Prognostic" means predicting the probable development (e.g., severity) of a pathologic condition.

III. TARP

25 This invention provides isolated, recombinant TARP. Because we first found isolated a prostate-specific TCR γ transcript, we initially used the terms "PS-TCR γ protein" and "PS-TCR γ polypeptide" to refer to any polypeptide that could be translated in any reading frame from the ~1.1 kb PS-TCR γ transcript. In particular, the terms referred to two proteins, PS-TCR γ -1 (SEQ ID NO:14) and PS-TCR γ -2 (SEQ ID NO:15),
30 translated in *in vitro* translation systems. We have now determined that only the first of these reading frames is translated in prostate cells. Since this reading frame is not the reading frame which results in the TCR γ chain, the protein is now referred to as the "T-

WO 01/04309

24

PCT/US00/19039

cell receptor Alternate Reading frame Protein." Full-length TARP is a 58 amino acid protein whose sequence is set forth in SEQ ID NO:14 and Figure 14.

In certain embodiments, this invention provides polypeptides comprising an epitope comprising at least 5 to at least 15 consecutive amino acids from TARP. Such proteins bind to antibodies raised against full-length TARP (in this section, references to "TARP" refer to the full-length protein unless otherwise required by context). In other embodiments, this invention provides fusion proteins comprising a first and second polypeptide moiety in which one of the protein moieties comprises an amino acid sequence of at least 5 amino acids identifying an epitope of TARP. In one embodiment the TARP moiety is all or substantially of TARP. The other moiety can be, e.g., an immunogenic protein. Such fusions also are useful to evoke an immune response against TARP. In other embodiments this invention provides TARP-like peptides ("TARP analogs") whose amino acid sequences are at least 90% identical to TARP (although they may have 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, or even higher sequence identity to TARP) and which are specifically bound by antibodies which specifically bind to TARP. In yet other embodiments this invention provides TARP-like peptides (also sometimes referred to herein as "TARP-analogs") whose amino acid sequences are at least 90% identical to TARP (although they may have 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, or even higher sequence identity to TARP) and which activate T-lymphocytes to cells which express TARP. Such proteins are useful as immunogens to break tolerance to PS-TCR γ proteins.

In another embodiment, the polypeptide comprises an epitope that binds an MHC molecule, e.g., an HLA molecule or a DR molecule. These molecules bind polypeptides having the correct anchor amino acids separated by about eight or nine amino acids. These peptides can be identified by inspection of the amino acid sequence of TARP and by knowledge of the MHC binding motifs, well known in the art.

TARP, immunogenic fragments thereof, and TARP analogs, can be synthesized recombinantly. Immunogenic fragments of TARP and the 58-residue TARP itself, can also be chemically synthesized by standard methods. If desired, polypeptides can also be chemically synthesized by emerging technologies. One such process is described in W. Lu *et al.*, *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 429:31-35 (1998).

IV. TARP NUCLEIC ACIDS

In one aspect this invention provides an isolated, recombinant nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding the TARP polypeptide (see, e.g., Figure 14). This nucleic acid is useful for expressing TARP, which can then be used, for example, to raise antibodies for diagnostic purposes. As noted, the nucleic acid molecule has three reading frames, each of which encodes different polypeptides defined by different open reading frames. In the embodiments contemplated herein, the reading frame of interest is the one which encodes TARP.

As noted, two reading frames were translated in *in vitro* translation systems. A nucleotide sequence of the ~1.1 kb PS-TCR γ transcript (SEQ ID NO:13) as obtained from LNCaP cDNA and the deduced amino acid sequence when the transcript is translated from the initiation codon at nucleotide position 74 (PS-TCR γ -1, SEQ ID NO:14) and nucleotide position 247 (PS-TCR γ -2, SEQ ID NO:15) are presented in Fig. 1. The startpoint of transcription (underlined) is within the 10 first nucleotides of the J γ 1.2 segment. The sequence data is available from EMBL/GenBank/DBJ under accession number AF151103. It should be noted that it has now been determined that the actual "+1" site is the sixth nucleotide in the sequence set forth in Figure 1.

The practitioner can use this sequence to prepare PCR primers for isolating nucleotide sequences of this invention. LNCaP cells are useful sources of cDNA for sequences of the ~1.1 kb transcript. Genomic DNA from a human cell that has not undergone TCR γ gene rearrangement, for example, cells other than T-lymphocyte precursors, are useful for longer sequences that can be processed, upon transcription, into the ~1.1 kb transcript. The sequence can be modified to engineer a nucleic acid encoding related molecules of this invention using well known techniques.

A nucleic acid comprising sequences of this invention can be cloned or amplified by *in vitro* methods, such as the polymerase chain reaction (PCR), the ligase chain reaction (LCR), the transcription-based amplification system (TAS), the self-sustained sequence replication system (3SR) and the Q β replicase amplification system (QB). For example, a polynucleotide encoding the protein can be isolated by polymerase chain reaction of cDNA using primers based on the DNA sequence of the molecule.

A wide variety of cloning and *in vitro* amplification methodologies are well-known to persons skilled in the art. PCR methods are described in, for example, U.S. Pat. No. 4,683,195; Mullis *et al.*, (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*

WO 01/04309

26

PCT/US00/19039

51:263; and Erlich, ed., PCR TECHNOLOGY, (Stockton Press, NY, 1989). Polynucleotides also can be isolated by screening genomic or cDNA libraries with probes selected from the sequences of the desired polynucleotide under stringent hybridization conditions.

- Engineered versions of the nucleic acids can be made by site-specific mutagenesis of other polynucleotides encoding the proteins, or by random mutagenesis caused by increasing the error rate of PCR of the original polynucleotide with 0.1 mM MnCl₂ and unbalanced nucleotide concentrations.

1. Expression vectors

- This invention also provides expression vectors for expressing polypeptides encoded by TARP transcript. Expression vectors can be adapted for function in prokaryotes or eukaryotes by inclusion of appropriate promoters, replication sequences, markers, *etc.* for transcription and translation of mRNA. The construction of expression vectors and the expression of genes in transfected cells involves the use of molecular cloning techniques also well known in the art. Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING -- A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989) and CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, F.M. Ausubel *et al.*, eds., (Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.) Useful promoters for such purposes include a metallothionein promoter, a constitutive adenovirus major late promoter, a dexamethasone-inducible MMTV promoter, a SV40 promoter, a MRP polIII promoter, a constitutive MPSV promoter, a tetracycline-inducible CMV promoter (such as the human immediate-early CMV promoter), and a constitutive CMV promoter. A plasmid useful for gene therapy can comprise other functional elements, such as selectable markers, identification regions, and other genes.
- Expression vectors useful in this invention depend on their intended use. Such expression vectors must, of course, contain expression and replication signals compatible with the host cell. Expression vectors useful for expressing bioactive conjugates include viral vectors such as retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses, plasmid vectors, cosmids, and the like. Viral and plasmid vectors are preferred for transfecting mammalian cells. The expression vector pcDNA1 (Invitrogen, San Diego, CA), in which the expression control sequence comprises the CMV promoter, provides good rates of transfection and expression. Adeno-associated viral vectors are useful in the gene therapy methods of this invention.

WO 01/04309

27

PCT/US00/19039

A variety of means are available for delivering polynucleotides to cells including, for example, direct uptake of the molecule by a cell from solution, facilitated uptake through lipofection (*e.g.*, liposomes or immunoliposomes), particle-mediated transfection, and intracellular expression from an expression cassette having an expression control sequence operably linked to a nucleotide sequence that encodes the inhibitory polynucleotide. See also U.S. Patent 5,272,065 (Inouye *et al.*); METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 185, Academic Press, Inc., San Diego, CA (D.V. Goeddel, ed.) (1990) or M. Krieger, GENE TRANSFER AND EXPRESSION -- A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, New York, NY, (1990). Recombinant DNA expression plasmids can also be used to prepare the polynucleotides of the invention for delivery by means other than gene therapy, although it may be more economical to make short oligonucleotides by *in vitro* chemical synthesis.

The construct can also contain a tag to simplify isolation of the protein. For example, a polyhistidine tag of, *e.g.*, six histidine residues, can be incorporated at the amino terminal end of the protein. The polyhistidine tag allows convenient isolation of the protein in a single step by nickel-chelate chromatography.

2. Recombinant cells

The invention also provides recombinant cells comprising an expression vector for expression of the nucleotide sequences of this invention. Host cells can be selected for high levels of expression in order to purify the protein. The cells can be prokaryotic cells, such as *E. coli*, or eukaryotic cells. Useful eukaryotic cells include yeast and mammalian cells. The cell can be, *e.g.*, a recombinant cell in culture or a cell *in vivo*.

Cells expressing TARP are useful for active or passive immunization of subjects against cells expressing these peptides. In certain embodiments, the cells are bacterial cells. In one version of active immunization, recombinant cells are autologous cells of the subject that can present the polypeptides in association with HLA molecules. For example, antigen presenting cells are useful for this purpose. In this case, it is preferable to use "autologous cells," that is, cells derived from the subject. Such cells are MHC compatible. The TARP-encoding nucleotide sequence should be placed under the control of a constitutive promoter in such cells because one goal is to express the polypeptides in high density on the cell surface, preferably more densely than they are expressed in healthy prostate epithelial cells.

WO 01/04309

28

PCT/US00/19039

V. METHOD OF ELICITING A CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE AGAINST CELLS EXPRESSING TARP

TARP is expressed by prostate cancer cells of epithelial origin and by cells of many breast cancers. Therefore, TARP can be used as a target of intervention in the treatment of prostate cancer and TARP-expressing breast cancers, as well as a marker for cancer cells that have metastasized from the prostate or breast, respectively. This invention provides methods of treating prostate cancer and TARP-expressing breast cancers with immunotherapy. The methods involve immunizing a subject against TARP, thereby eliciting a cell-mediated immune response against cells expressing TARP. Immunization can be active or passive. In active immunization, the immune response is elicited in the subject *in vivo*. In passive immunization, T_C cells activated against the polypeptide are cultured *in vitro* and administered to the subject. Such methods may be expected to result in the destruction of healthy epithelial prostate tissue that express TARP. However, the prostate is not an essential organ. Its loss must be counterbalanced against the chance for loss of the subject's life from the prostate cancer, and the prostate may, indeed, be surgically removed prior to institution of TARP immunotherapy. Since normal breast tissue has not been found to express TARP in significant amounts, it does not appear that immunization against TARP-expressing cells will result in the loss of normal cells in women. Thus, TARP compositions may be administered to women prophylactically to provide an immune defense in the event that a TARP-expressing breast cancer develops later.

The immunizing agent can be of full-length TARP, a peptide comprising an antigenic determinant of TARP, *e.g.*, an immunogenic fragment of TARP, or a protein or peptide that is substantially identical to TARP. When one is attempting to elicit a cell-mediated immune response against TARP, preferred peptides comprising antigenic determinants are those peptides bearing a binding motif for an HLA molecule of the subject. These motifs are well known in the art. For example, HLA-A2 is a common allele in the human population. The binding motif for this molecule includes polypeptides with 9 or 10 amino acids having leucine or methionine in the second position and valine or leucine in the last positions. Based on the polypeptide sequence of TARP, one can identify amino acid sequences bearing motifs for any particular HLA molecule. Peptides comprising these motifs can be prepared by any of the typical methods (*e.g.*, recombinantly, chemically, *etc.*). Because TARP is a self protein, the preferred amino acid sequences bearing HLA binding motifs are those that encode

subdominant or cryptic epitopes. Those epitopes can be identified by a lower comparative binding affinity for the HLA molecule with respect to other epitopes in the molecule or compared with other molecules that bind to the HLA molecule.

5 Polypeptides that comprise an amino acid sequence from TARP that, in turn, comprise an HLA binding motif also are useful for eliciting an immune response. This is because, in part, such proteins will be processed by the cell into a peptide that can bind to the HLA molecule and that have a TARP epitope.

10 A complex of an HLA molecule and a peptidic antigen acts as the ligand recognized by HLA-restricted T cells (Buus, S. et al., *Cell* 47:1071, 1986; Babbitt, B. P. et al., *Nature* 317:359, 1985; Townsend, A. and Bodmer, H., *Annu. Rev. Immunol.* 7:601, 1989; Germain, R. N., *Annu. Rev. Immunol.* 11:403, 1993). Through the study of single amino acid substituted antigen analogs and the sequencing of endogenously bound, naturally processed peptides, critical residues that correspond to motifs required for specific binding to HLA antigen molecules have been identified (see, e.g., Southwood, et al., *J. Immunol.* 160:3363, 1998; Rammensee, et al., *Immunogenetics* 41:178, 1995; Rammensee et al., Sette, A. and Sidney, J. *Curr. Opin. Immunol.* 10:478, 1998; Engelhard, V. H., *Curr. Opin. Immunol.* 6:13, 1994; Sette, A. and Grey, H. M., *Curr. Opin. Immunol.* 4:79, 1992).

20 Furthermore, x-ray crystallographic analysis of HLA-peptide complexes has revealed pockets within the peptide binding cleft of HLA molecules which accommodate, in an allele-specific mode, residues borne by peptide ligands; these residues in turn determine the HLA binding capacity of the peptides in which they are present. (See, e.g., Madden, D.R. *Annu. Rev. Immunol.* 13:587, 1995; Smith, et al., *Immunity* 4:203, 1996; Fremont et al., *Immunity* 8:305, 1998; Stern et al., *Structure* 2:245, 1994; Jones, E.Y. *Curr. Opin. Immunol.* 9:75, 1997; Brown, J. H. et al., *Nature* 364:33, 1993.)

Accordingly, the definition of class I and class II allele-specific HLA binding motifs, or class I or class II supermotifs allows identification of regions within TARP that have the potential of binding particular HLA molecules.

30 Molecules with high levels of sequence identity to TARP are also useful to elicit an immune response. Such molecules can be recognized as "foreign" to the immune system, yet generate antibodies or CTLs that cross react with TARP. Molecules that have high sequence identity to TARP include non-human TCR γ homologs, especially those from primates. TARP analogs whose amino acid sequences are at least 90%

WO 01/04309

30

PCT/US00/19039

identical to TARP (although they may have 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, or even higher sequence identity to TARP) and which are specifically bound by antibodies which specifically bind to TARP may be used. Further useful in this regard are TARP analogs, that is, peptides whose amino acid sequences are at least 90% identical to TARP

5 (although they may have 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, or even higher sequence identity to TARP) and which activate T-lymphocytes to cells which express TARP.

Another molecule that is substantially homologous to a TARP antigenic determinant can be made by modifying the sequence of a natural TARP epitope so that it binds with greater affinity for the HLA molecule.

10 One method of identifying genes encoding antigenic determinants is as follows: TILs from a subject with metastatic cancer are grown and tested for the ability to recognize the autologous cancer *in vitro*. These TILs are administered to the subject to identify the ones that result in tumor regression. The TILs are used to screen expression libraries for genes that express epitopes recognized by the TILs. Subjects then are
15 immunized with these genes. Alternatively, lymphocytes are sensitized *in vitro* against antigens encoded by these genes. Then the sensitized lymphocytes are adoptively transferred into subjects and tested for their ability to cause tumor regression. Rosenberg, et al., (1997) *Immunol. Today* 1997 18:175.

The application of these molecules is now described. These methods are
20 also described in Rosenberg et al. (1997) *Immunol. Today* 18:175 and Restifo et al. (1999) *Oncology* 11:50.

One method of invoking an immune response involves immunizing the subject with a polypeptide comprising an antigenic determinant from TARP, either alone or, more preferably, combined with an adjuvant, such as Freund's incomplete adjuvant,
25 lipids or liposomes, gp96, Hsp70 or Hsp90. The polypeptide can be TARP, an antigenic fragment of TARP, a fusion protein comprising the antigenic determinant, or a peptide comprising a sequence substantially identical to such an antigenic determinant.

Another method involves pulsing a polypeptide comprising an epitope from TARP onto antigen presenting cells and administering the cells to the subject.

30 In another method, a recombinant virus containing a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising an antigenic determinant from TARP in an expression cassette is administered to the subject. The virus optionally also can encode cytokines (e.g., IL-2), a costimulatory molecule or other genes that enhance the immune response. The virus can be, for example, adenovirus, fowlpox virus or vaccinia virus. Upon

WO 01/04309

31

PCT/US00/19039

infection, the infected cells will express the TARP peptide and express the antigenic determinant on the cell surface in combination with the HLA molecule which binds peptides having the same motif as the antigenic determinant. These cells will then stimulate the activation of CTLs that recognize the presented antigen, resulting in
5 destruction of cancer cells that also bear the determinant.

In another method, the subject is immunized with naked DNA encoding a polypeptide comprising an antigenic determinant from TARP by, e.g., intramuscular, biolistic injection or linked to lipids. Such methods have been shown to result in the stimulation of a cell-mediated response against cells that express the encoded
10 polypeptide.

In another method, a recombinant bacteria that expresses the epitope, such as Bacillus Calmette-Guerin (BCG), *Salmonella* or *Listeria*, optionally also encoding cytokines, costimulatory molecules or other genes to enhance the immune response, is administered to the subject.

15 In another method, cells expressing the antigen are administered to the subject. This includes, for example, dendritic cells pulsed with TARP epitopes, cells transfected with polypeptides comprising TARP antigenic determinants, HLA and B7 genes. The multiple transfection results in the production of several components necessary for presenting the antigenic determinant on the cell surface. In one
20 embodiment, the molecule is a fusion protein in which the polypeptide bearing the antigenic determinant is fused to an HLA molecule (usually through a linker) so as to improve binding of the peptide to the HLA molecule. In one embodiment, the cell is an antigen presenting cell. Preferably, the cells are eukaryotic cells, more preferably, mammalian cells, more preferably, human cells, more preferably autologous human cells
25 derived from the subject.

In another method, antigen presenting cells (APCs) are pulsed or co-incubated with peptides comprising an epitope from TARP *in vitro*. These cells are used to sensitize CD8 cells, such as tumor infiltrating lymphocytes from prostate cancer tumors or peripheral blood lymphocytes. The TILs or PBLs preferably are from the
30 subject. However, they should at least be MHC Class-I restricted to the HLA types the subject possesses. The sensitized cells are then administered to the subject.

In a supplemental method, any of these immunotherapies is augmented by administering a cytokine, such as IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF, interferons.

In addition to the methods for evaluating immunogenicity of peptides set forth above, immunogenicity can also be evaluated by: evaluation of primary T cell cultures from normal individuals (see, e.g., Wentworth, P. A. et al., *Mol. Immunol.* 32:603, 1995; Celis, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2105, 1994; Tsai, V. et al., *J. Immunol.* 158:1796, 1997; Kawashima, I. et al., *Human Immunol.* 59:1, 1998); by immunization of HLA transgenic mice (see, e.g., Wentworth, P. A. et al., *J. Immunol.* 26:97, 1996; Wentworth, P. A. et al., *Int. Immunol.* 8:651, 1996; Alexander, J. et al., *J. Immunol.* 159:4753, 1997), and by demonstration of recall T cell responses from patients who have been effectively vaccinated or who have a tumor; (see, e.g., Rehermann, B. et al., *J. Exp. Med.* 181:1047, 1995; Doolan, D. L. et al., *Immunity* 7:97, 1997; Bertoni, R. et al., *J. Clin. Invest.* 100:503, 1997; Threlkeld, S. C. et al., *J. Immunol.* 159:1648, 1997; Diepolder, H. M. et al., *J. Virol.* 71:6011, 1997).

In choosing CTL-inducing peptides of interest for vaccine compositions, peptides with higher binding affinity for class I HLA molecules are generally preferable. Peptide binding is assessed by testing the ability of a candidate peptide to bind to a purified HLA molecule in vitro.

To ensure that a TARP analog when used as a vaccine, actually elicits a CTL response to TARP in vivo (or, in the case of class II epitopes, elicits helper T cells that cross-react with the wild type peptides), the TARP analog may be used to immunize T cells in vitro from individuals of the appropriate HLA allele. Thereafter, the immunized cells' capacity to induce lysis of TARP sensitized target cells is evaluated.

More generally, peptides from TARP or an analog thereof (a "peptide of the invention") can be synthesized and tested for their ability to bind to HLA proteins and to activate HTL or CTL responses, or both.

Conventional assays utilized to detect T cell responses include proliferation assays, lymphokine secretion assays, direct cytotoxicity assays, and limiting dilution assays. For example, antigen-presenting cells that have been incubated with a peptide can be assayed for the ability to induce CTL responses in responder cell populations.

PBMCs may be used as the responder cell source of CTL precursors. The appropriate antigen-presenting cells are incubated with peptide, after which the peptide-loaded antigen-presenting cells are then incubated with the responder cell population under optimized culture conditions. Positive CTL activation can be determined by assaying the culture for the presence of CTLs that kill radio-labeled target cells, both

WO 01/04309

33

PCT/US00/19039

specific peptide-pulsed targets as well as target cells expressing endogenously processed forms of the antigen from which the peptide sequence was derived.

A method which allows direct quantification of antigen-specific T cells is staining with Fluorescein-labelled HLA tetrameric complexes (Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330 (1993); Altman et al., Science 274:94 (1996)). Alternatively, staining for intracellular lymphokines, interferon- γ release assays or ELISPOT assays, can be used to evaluate T-cell responses.

HTL activation may be assessed using such techniques known to those in the art such as T cell proliferation and secretion of lymphokines, e.g. IL-2 (see, e.g. Alexander et al., Immunity 1:751-761 (1994)).

VI. ANTIBODIES AGAINST TARP

In one aspect this invention provides a composition comprising an antibody that specifically binds TARP. Antibodies preferably have affinity of at least 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , or 10^9 M^{-1} . This invention contemplates both polyclonal and monoclonal antibody compositions.

A number of immunogens can be used to produce antibodies that specifically bind TARP. Full-length TARP is a suitable immunogen. Typically, the immunogen of interest is a peptide of at least about 3 amino acids, more typically the peptide is at least 5 amino acids in length, preferably, the fragment is at least 10 amino acids in length and more preferably the fragment is at least 15 amino acids in length. The peptides can be coupled to a carrier protein (e.g., as a fusion protein), or are recombinantly expressed in an immunization vector. Antigenic determinants on peptides to which antibodies bind are typically 3 to 10 amino acids in length. Naturally occurring polypeptides are also used either in pure or impure form.

Recombinant polypeptides are expressed in eukaryotic or prokaryotic cells and purified using standard techniques. The polypeptide, or a synthetic version thereof, is then injected into an animal capable of producing antibodies. Either monoclonal or polyclonal antibodies can be generated for subsequent use in immunoassays to measure the presence and quantity of the polypeptide.

Methods for producing polyclonal antibodies are known to those of skill in the art. In brief, an immunogen, preferably a purified polypeptide, a polypeptide coupled to an appropriate carrier (e.g., GST, keyhole limpet hemocyanin, etc.), or a polypeptide incorporated into an immunization vector such as a recombinant vaccinia virus (see, U.S.

WO 01/04309

34

PCT/US00/19039

Patent No. 4,722,848) is mixed with an adjuvant and animals are immunized with the mixture. The animal's immune response to the immunogen preparation is monitored by taking test bleeds and determining the titer of reactivity to the polypeptide of interest.

When appropriately high titers of antibody to the immunogen are obtained, blood is collected from the animal and antisera are prepared. Further fractionation of the antisera to enrich for antibodies reactive to the polypeptide is performed where desired. See, e.g., Coligan (1991) *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY* Wiley/Greene, NY; and Harlow and Lane (1989) *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Press, NY.

Antibodies, including binding fragments and single chain recombinant versions thereof, against predetermined fragments of TARP are raised by immunizing animals, e.g., with conjugates of the fragments with carrier proteins as described above.

Monoclonal antibodies are prepared from cells secreting the desired antibody. These antibodies are screened for binding to normal or modified polypeptides, or screened for agonistic or antagonistic activity. In some instances, it is desirable to prepare monoclonal antibodies from various mammalian hosts, such as mice, rodents, primates, humans, etc. Description of techniques for preparing such monoclonal antibodies are found in, e.g., Stites *et al.* (eds.) *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, and references cited therein; Harlow and Lane, *Supra*; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed.) Academic Press, New York, NY; and Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497.

Other suitable techniques involve selection of libraries of recombinant antibodies in phage or similar vectors. See, Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; and Ward, *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546.

Also, recombinant immunoglobulins may be produced. See, U.S. Patent No. 4,816,567 (Cabilly); and Queen *et al.* (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033.

Frequently, the polypeptides and antibodies will be labeled by joining, either covalently or non-covalently, a substance which provides for a detectable signal. A wide variety of labels and conjugation techniques are known and are reported extensively in both the scientific and patent literature. Thus, an antibody used for detecting an analyte can be directly labeled with a detectable moiety, or may be indirectly labeled by, for example, binding to the antibody a secondary antibody that is, itself directly or indirectly labeled.

The antibodies of this invention are also used for affinity chromatography in isolating TARP. Columns are prepared, *e.g.*, with the antibodies linked to a solid support, *e.g.*, particles, such as agarose, Sephadex, or the like, where a cell lysate is passed through the column, washed, and treated with increasing concentrations of a mild denaturant, whereby purified TARP is released.

An alternative approach is the generation of humanized immunoglobulins by linking the CDR regions of non-human antibodies to human constant regions by recombinant DNA techniques. See United States patent 5,585,089 (Queen *et al.*).

A further approach for isolating DNA sequences which encode a human monoclonal antibody or a binding fragment thereof is by screening a DNA library from human B cells according to the general protocol outlined by Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989) and then cloning and amplifying the sequences which encode the antibody (or binding fragment) of the desired specificity. The protocol described by Huse is rendered more efficient in combination with phage display technology. See, *e.g.*, WO 91/17271 (Dower *et al.*) and WO 92/01047 (McCafferty *et al.*). Phage display technology can also be used to mutagenize CDR regions of antibodies previously shown to have affinity for TARP. Antibodies having improved binding affinity are selected.

In another embodiment of the invention, fragments of antibodies against TARP or protein analogs are provided. Typically, these fragments exhibit specific binding to TARP similar to that of a complete immunoglobulin. Antibody fragments include separate heavy chains, light chains Fab, Fab' F(ab')₂ and Fv. Fragments are produced by recombinant DNA techniques, or by enzymic or chemical separation of intact immunoglobulins.

VII. CHIMERIC MOLECULES THAT TARGET TARP

This invention provides chimeric molecules that target TARP. The chimeric molecules comprise a targeting moiety and an effector moiety. The chimeric proteins are useful in the detection of the polypeptide and cells that bear it.

A. Targeting Moiety

The chimeric molecules of this invention comprise a targeting moiety. The targeting moiety comprises a ligand that specifically binds to TARP. Preferred ligands are antibodies, as that term is used here, including binding fragments of antibodies. However, other natural ligands for these molecules also can be used.

B. Effector Moiety

The effector moiety may be another specific binding moiety such as an antibody, a growth factor, or a ligand. The chimeric molecule will then act as a highly specific bifunctional linker. This linker may act to bind and enhance the interaction between cells or cellular components to which the fusion protein binds.

In still yet another embodiment the effector molecule may be a pharmacological agent (e.g. a drug) or a vehicle containing a pharmacological agent. Thus, the moiety that specifically binds to TARP may be conjugated to a drug such as vinblastine, doxorubicin, genistein (a tyrosine kinase inhibitor), an antisense molecule, and other pharmacological agents known to those of skill in the art, thereby specifically targeting the pharmacological agent to tumor cells.

Alternatively, the targeting molecule may be bound to a vehicle containing the therapeutic composition. Such vehicles include, but are not limited to liposomes, micelles, various synthetic beads, and the like.

One of skill in the art will appreciate that the chimeric molecules of the present invention may include multiple targeting moieties bound to a single effector or conversely, multiple effector molecules bound to a single targeting moiety. In still other embodiments, the chimeric molecules may include both multiple targeting moieties and multiple effector molecules. Detectable labels suitable for use as the effector molecule component of the chimeric molecules of this invention include any composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, electrical, optical or chemical means all as described above.

One of skill will appreciate that the targeting molecule and effector molecules may be joined together in any order. Thus, where the targeting molecule is a polypeptide, the effector molecule may be joined to either the amino or carboxy termini of the targeting molecule. The targeting molecule may also be joined to an internal region of the effector molecule, or conversely, the effector molecule may be joined to an internal location of the targeting molecule, as long as the attachment does not interfere with the respective activities of the molecules.

The targeting molecule and the effector molecule may be attached by any of a number of means well known to those of skill in the art. Typically the effector molecule is conjugated, either directly or through a linker (spacer), to the targeting molecule. However, where both the effector molecule and the targeting molecule are

WO 01/04309

37

PCT/US00/19039

polypeptides it is preferable to recombinantly express the chimeric molecule as a single-chain fusion protein.

In one embodiment, the targeting molecule is chemically conjugated to the effector molecule (e.g. a cytotoxin, a label, a ligand, or a drug or liposome). Means of chemically conjugating molecules are well known to those of skill. The procedure for attaching an agent to an antibody or other polypeptide targeting molecule will vary according to the chemical structure of the agent. Polypeptides typically contain variety of functional groups; e.g., carboxylic acid (COOH) or free amine (-NH₂) groups, which are available for reaction with a suitable functional group on an effector molecule to bind the effector thereto. Alternatively, the targeting molecule and/or effector molecule may be derivitized to expose or attach additional reactive functional groups. The derivitization may involve attachment of any of a number of linker molecules such as those available from Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

A bifunctional linker having one functional group reactive with a group on a particular agent, and another group reactive with an antibody, may be used to form the desired immunconjugate. Alternatively, derivitization may involve chemical treatment of the targeting molecule, e.g., glycol cleavage of the sugar moiety of a the glycoprotein antibody with periodate to generate free aldehyde groups. The free aldehyde groups on the antibody may be reacted with free amine or hydrazine groups on an agent to bind the agent thereto. (See U.S. Patent No. 4,671,958). Procedures for generation of free sulfhydryl groups on polypeptide, such as antibodies or antibody fragments, are also known (See U.S. Pat. No. 4,659,839).

Many procedures and linker molecules for attachment of various compounds including radionuclide metal chelates, toxins and drugs to proteins such as antibodies are known. See, for example, European Patent Application No. 188,256; U.S. Patent Nos. 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784; 4,680,338; 4,569,789; and 4,589,071; and Borlinghaus *et al. Cancer Res.* 47: 4071-4075 (1987). In particular, production of various immunotoxins is well-known within the art and can be found, for example in "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe *et al.*, MONOCLONAL ANTIBODIES IN CLINICAL MEDICINE, Academic Press, pp. 168-190 (1982), Waldmann, *Science*, 252: 1657 (1991), U.S. Patent Nos. 4,545,985 and 4,894,443.

Where the targeting molecule and/or the effector molecule is relatively short (*i.e.*, less than about 50 amino acids) they may be synthesized using standard

WO 01/04309

38

PCT/US00/19039

chemical peptide synthesis techniques. Where both molecules are relatively short the chimeric molecule may be synthesized as a single contiguous polypeptide. Alternatively the targeting molecule and the effector molecule may be synthesized separately and then fused by condensation of the amino terminus of one molecule with the carboxyl terminus of the other molecule thereby forming a peptide bond. Alternatively, the targeting and effector molecules may each be condensed with one end of a peptide spacer molecule thereby forming a contiguous fusion protein.

Solid phase synthesis in which the C-terminal amino acid of the sequence is attached to an insoluble support followed by sequential addition of the remaining amino acids in the sequence is the preferred method for the chemical synthesis of the polypeptides of this invention. Techniques for solid phase synthesis are described by Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Merrifield, *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963), and Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

In a preferred embodiment, the chimeric fusion proteins are synthesized using recombinant DNA methodology. Generally this involves creating a DNA sequence that encodes the fusion protein, placing the DNA in an expression cassette under the control of a particular promoter, expressing the protein in a host, isolating the expressed protein and, if required, renaturing the protein.

DNA encoding the fusion proteins of this invention may be prepared by any suitable method, including, for example, cloning and restriction of appropriate sequences or direct chemical synthesis by methods such as the phosphotriester method of Narang *et al. Meth. Enzymol.* 68: 90-99 (1979); the phosphodiester method of Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68: 109-151 (1979); the diethylphosphoramidite method of Beaucage *et al.*, *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862 (1981); and the solid support method of U.S. Patent No. 4,458,066.

While the two molecules are preferably essentially directly joined together, one of skill will appreciate that the molecules may be separated by a peptide spacer consisting of one or more amino acids. Generally the spacer will have no specific biological activity other than to join the proteins or to preserve some minimum distance or other spatial relationship between them. However, the constituent amino acids of the spacer may be selected to influence some property of the molecule such as the folding, net charge, or hydrophobicity.

The nucleic acid sequences encoding the fusion proteins may be expressed in a variety of host cells, including *E. coli*, other bacterial hosts, yeast, and various higher eukaryotic cells such as the COS, CHO and HeLa cells lines and myeloma cell lines. The recombinant protein gene will be operably linked to appropriate expression control sequences for each host. For *E. coli* this includes a promoter such as the T7, *trp*, or lambda promoters, a ribosome binding site and preferably a transcription termination signal. For eukaryotic cells, the control sequences will include a promoter and preferably an enhancer derived from immunoglobulin genes, SV40, cytomegalovirus, *etc.*, and a polyadenylation sequence, and may include splice donor and acceptor sequences. The plasmids and vectors of the invention can be transferred into the chosen host cell by well-known methods such as calcium chloride transformation for *E. coli* and calcium phosphate treatment or electroporation for mammalian cells.

Once expressed, the recombinant fusion proteins can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like (see, generally, R. Scopes, *PROTEIN PURIFICATION*, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, *METHODS IN ENZYMOLOGY* Vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)). Substantially pure compositions of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity are most preferred for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the polypeptides may then be used therapeutically.

VIII. METHODS OF DETECTING CELLS THAT EXPRESS TARP

In another aspect, this invention provides methods of detecting cells that express TARP. The methods involve detecting either a TARP transcript or polypeptide. Because prostate cancer cells of epithelial origin and many breast cancer cells express TARP, methods of detection are useful in the detection of prostate cancer and of TARP-expressing breast cancers. In particular, prostate cancer cells and many breast cancer cells can be distinguished from other cells by the expression of TARP.

Tissue samples can be selected from any likely site of primary or metastatic cancer including the prostate or the breast, respectively, and distal sites such as the lymph nodes and other organs. Persons of skill in the art are aware that men, as well as women, suffer from breast cancer. Breast cancer in men is relatively rare, representing only about 1% of all breast cancer cases. Because it is uncommon, however, it is

WO 01/04309

40

PCT/US00/19039

frequently diagnosed at a later stage, which affects the chances for survival. Accordingly, improved diagnosis of breast cancer in men is desirable.

In one method, a biopsy is performed on the subject and the collected tissue is tested *in vitro*. Typically, the cells are disrupted by lysing, sonic disruption, osmotic pressure, freezing and thawing, enzymatic treatment, or other means routine in the art to render the proteins of the nucleus accessible without denaturing them. The cellular contents (or the nuclear contents, if the contents have been fractionated) are then contacted, for example, with an anti-TARP antibody. Any immune complexes which result indicate the presence of TARP in the biopsied sample. To facilitate such detection, the antibody can be radiolabeled or coupled to an effector molecule which is radiolabeled. In another method, the cells can be detected *in vivo* using typical imaging systems. For example, the method can involve the administration to a subject of a labeled composition capable of reaching the cell nucleus. Then, the localization of the label is determined by any of the known methods for detecting the label. Any conventional method for visualizing diagnostic imaging can be used. For example, paramagnetic isotopes can be used for MRI.

Detection of TARP

TARP can be identified by any methods known in the art. In one embodiment, the methods involve detecting the polypeptide with a ligand that specifically recognizes the polypeptide (*e.g.*, an immunoassay). The antibodies of the invention are particularly useful for specific detection of TARP. A variety of antibody-based detection methods are known in the art. These include, for example, radioimmunoassay, sandwich immunoassays (including ELISA), immunofluorescent assays, Western blot, affinity chromatography (affinity ligand bound to a solid phase), and *in situ* detection with labeled antibodies. Another method for detecting TARP involves identifying the polypeptide according to its mass through, for example, gel electrophoresis, mass spectrometry or HPLC. Subject samples can be taken from any number of appropriate sources, such as saliva, peritoneal fluid, blood or a blood product (*e.g.*, serum), urine, tissue biopsy (*e.g.*, lymph node tissue), *etc.*

TARP can be detected in cells *in vitro*, in samples from biopsy and *in vivo* using imaging systems described above.

Detection of transcript encoding TARP

Cells that express TARP transcript can be detected by contacting the sample with a nucleic acid probe that specifically hybridizes with the transcript, and detecting hybridization. This includes, for example, methods of *in situ* hybridization, in which a labeled probe is contacted with the sample and hybridization is detected by detecting the attached label. However, the amounts of transcript present in the sample can be small. Therefore, other methods employ amplification, such as RT-PCR. In these methods, probes are selected that function as amplification primers which specifically amplify the TARP sequences from mRNA. Then, the amplified sequences are detected using typical methods.

The probes are selected to specifically hybridize with TARP transcripts. Generally, complementary probes are used. However, probes need not be exactly complementary if they have sufficient sequence homology and length to hybridize under stringent conditions.

15

IX. PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

In another aspect, this invention provides pharmaceutical compositions that comprise a pharmaceutically acceptable carrier and a composition of this invention.

In one embodiment, the pharmaceutical composition comprises TARP, an immunogenic fragment thereof, such as a polypeptide comprising a TARP epitope, or a TARP analog, in an amount effective to elicit a cell-mediated immune response or a humoral response in a subject, e.g., a polypeptide bearing an MHC binding motif. Such pharmaceutical compositions are useful as vaccines in the therapeutic methods of this invention and for preparing antibodies.

25

In another embodiment, the pharmaceutical composition comprises a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a TARP polypeptide in an amount effective to elicit an immune response against cells expressing TARP in a subject. Such composition also are useful in the therapeutic methods of this invention.

30

In another embodiment, the pharmaceutical composition comprises a ribozyme which can specifically cleave a nucleotide sequence encoding TARP, an antisense molecule which can bind to such a nucleic acid, or an expression cassette comprising a nucleic acid encoding TARP, to modulate expression of TARP in a cell of interest.

WO 01/04309

42

PCT/US00/19039

In yet another embodiment, the pharmaceutical composition may comprise a chimeric molecule comprising a targeting molecule and a detector molecule to detect cells expressing TARP. If the detector molecule is one capable of binding specifically to a nucleic acid encoding TARP (such as a DNA binding protein which can bind specifically to DNA encoding TARP), then the composition can be used to detect cells which express that nucleic acid.

The pharmaceutical compositions of this invention can be prepared in unit dosage forms for administration to a subject. The amount and timing of administration are at the discretion of the treating physician to achieve the desired purposes.

10

EXAMPLES

EXAMPLE 1. DETECTION OF T-CELL RECEPTOR γ -CHAIN IN PROSTATE CELLS

We identified expression of T-cell receptor γ -chain (TCR γ) mRNA in human prostate and showed that it originates from epithelial cells of the prostate and not from infiltrating T-lymphocytes. In contrast, the T-cell receptor δ -chain (TCR δ) gene is silent in human prostate. The major TCR γ transcript in prostate has a different size than the transcript expressed in thymus, spleen and blood leukocytes. It is expressed in normal prostate epithelium, adenocarcinoma of the prostate and the prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. The RNA originates from an unrearranged TCR γ locus and it is initiated within the intronic sequence directly upstream of the J γ 1.2 gene segment. The prostate-specific TCR γ transcript consists of the J γ 1.2 and C γ 1 gene segments, it has untranslated sequence including a polyadenylation signal and poly(A) sequence at the 3' end. The finding that prostate epithelial cells express a high level of a transcript from a gene that was thought to be exclusively expressed by T-lymphocytes is novel and highly unexpected.

20

25

1. Materials and Methods

RNA dot blot and Northern blot hybridizations

30

RNA dot blot (RNA master blot, Clontech, Palo Alto, CA), and Northern blot (MTN, Clontech, Palo Alto, CA), were performed on a variety of human tissues.

WO 01/04309

43

PCT/US00/19039

Northern blot was also performed on mRNA from prostate adenocarcinoma cell lines, LNCaP and PC-3 (ATCC, Rockville, MD). Isolation of poly(A) RNA was carried out using the FastTrack kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA was electrophoresed on a 1% agarose gel and transferred to nylon-based membranes (GeneScreen Plus, DuPont, Wilmington, DE), according to established procedures. Ausubel, *supra*. A cDNA probe specific for the untranslated 3' end (3' UTR) of the TCR γ transcript was made from EST plasmid ng79d11 (Genome Systems, St. Louis, MO). A probe specific for the constant domain of the TCR γ transcript (TCR C γ) was made from LNCaP cDNA and a probe for the constant domain of the TCR δ transcript (TCR C δ) was made from a TCR δ plasmid. A human β -actin probe was used as a quantity control of the mRNA preparations. Probes were labeled with 32 P by random primer extension (Lofstrand Labs Limited, Gaithersburg, MD) to a specific activity of 1 μ Ci/ng. The RNA membranes were blocked for 2 hours at 45° C in hybridization solution containing 50% formamide (Hybrisol I, Oncor, Gaithersburg, MD) and then probed for 15 hours at 45° C with 20 μ Ci cDNA in 20 ml hybridization solution. The membranes were washed twice for 15 minutes at room temperature in 2xSSC/0.1%SDS and twice for 20 minutes at 55-65° C in 0.1%SSC/0.1%SDS. The membranes were exposed to an imaging film (X-OMAT, Kodak, Rochester, NY) at -80° C before development.

20 RNA in situ hybridization

The TCR γ constant domain and the TCR γ untranslated 3' end nucleotide sequence was amplified by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) from LNCaP mRNA, cloned into pBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA) and verified by DNA sequencing. Anti-sense and sense TCR γ 35 S-riboprobes were made by T7 and T3 RNA polymerase, respectively. Paraffin blocks of 8 archived cases of prostatic transurethral resection specimens from the NCI were retrieved. Cases were selected which included both malignant and benign prostatic ducts. Average age of the cases was 69 and Gleason scores of the tumor ranged from 3+3=6/10 to 4+5=9/10. The blocks were processed on glass slides and hybridized using the riboprobes (Molecular Histology, Gaithersburg, MD). Following hybridization the slides were counterstained with Hematoxylin and Eosin and examined using a Zeiss Axiophot Microscope equipped with a variable condenser providing bright field and dark field.

RT-PCR analysis

Single stranded cDNAs were prepared from 150-250 ng of LNCaP and PC-3 poly(A) mRNA, respectively, using oligo-dT priming (Pharmacia-Biotech, Piscataway, NJ). PCR primers were designed to amplify different portions of the TCR γ transcript. In order to amplify cDNA only and not trace amounts of genomic DNA, which may be present in the mRNA preparations, primer pairs were always combined to generate PCR products spanning two or more exons. One PCR was set up to amplify either of the two TCR γ constant domain genes, C γ 1 or C γ 2, with a forward primer in exon CI (TCRC γ .F) and a reverse primer in exon CIII (TCRC γ .R4), Figure 8. Variable to constant domain-spanning PCRs were set up using forward primers, specific to each of the four subgroups of TCR γ variable gene segments (TCRV γ I.F, TCRV γ II.F, TCRV γ III.F, TCRV γ IV.F) in combination with a reverse primer in the TCR γ constant gene segment (TCRC γ .R1), Figure 8. Wax-mediated, hot-start PCRs were conducted for 30 cycles using high-fidelity PCR components (Expand, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). The PCR products were analyzed on 1.2% agarose gels with 0.5 μ g/ml of EtBr. Specific PCR products were gel purified (Qiagen, Valencia, CA), T/A cloned (InVitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced on an automated capillary sequencer (Perkin Elmer Applied Systems, Foster City, CA), using Perkin-Elmer's dRhodamine terminator cycle sequencing kit.

20

Analysis of TCR γ VJ gene rearrangement

Genomic DNA was prepared from 5×10^7 LNCaP cells according to established procedures. Ausubel, *supra*. A set of 12 PCRs was performed, each with a forward primer from one of the four subgroup of V γ gene segments (TCRV γ I.F, TCRV γ II.F, TCRV γ III.F, TCRV γ IV.F) in combination with a reverse primer from one of the three J γ 1 gene segments (TCRJ γ 1.1.R, TCRJ γ 1.2.R, TCRJ γ 1.3.R), Figure 8. Hot-Start PCRs were conducted for 30 cycles using 500 ng of genomic DNA and the PCRs were examined on 1.2% agarose gels with 0.5 μ g/ml of EtBr. Human placenta DNA (Clontech, Palo Alto, CA) was used as a positive control of the primers and PCR amplification of J γ 1.1 to J γ 1.2 genomic DNA was performed as a positive control of the template.

30

Primer-extension analysis of RNA

The startpoint of the prostate TCR γ transcript was determined by primer-extension analysis of LNCaP mRNA. Five μ g of mRNA was mixed with 0.08 pmol of

WO 01/04309

45

PCT/US00/19039

³²P-end labeled TCRC_γR2 primer, annealing 48-75 nucleotides from the 5' end of C_γ1. The analysis was carried out using 20 U of MMLV-reverse transcriptase (Superscript, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), according to established procedure. C.P. George et al/ (1996) "Primer-extension analysis of RNA" *In A LABORATORY GUIDE TO RNA,*

- 5 ISOLATION, ANALYSIS AND SYNTHESIS. ed. P.A. Krieg. (Wiley-Liss, Inc., New York, NY), pp. 133-139. The sample was electrophoresed on a 6% polyacrylamide-urea DNA sequencing gel in parallel with a ³²P-end labeled molecular weight marker (*MspI* digested pBR322, Lofstrand Labs Limited, Gaithersburg, MD). After electrophoresis the gel was blotted to Whatman paper, dried and subjected to autoradiography.

10

5'-RACE PCR analysis

Double-stranded cDNA was made from 500 ng of LNCaP poly(A) mRNA using the Marathon cDNA amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA) and 25 pmole of the TCR_γ gene-specific primer (TCRC_γR3), Figure 8. Marathon-adaptors were then

15 ligated to the ends of the synthesized cDNA. Rapid amplification of the 5'-cDNA ends (5'-RACE) PCR was conducted using a gene-specific primer (TCRC_γR2), Figure 8, annealing upstream of the primer used for reverse transcription, and an adaptor-specific primer. Hot start conditions were applied (Advantage, Clontech, Palo Alto, CA) and the PCR products were analyzed and cloned as described for the RT-PCR analyses. DNA

20 from the 5'-RACE PCR analytic gel was transferred to a nylon membrane and a ³²P-end labeled primer (TCRC_γR1), Figure 8, hybridizing further upstream was applied to identify possible bands not detected by EtBr/UV.

In vitro transcription-coupled translation

- 25 The complete prostate TCR_γ transcript, as obtained by RT-PCR and 5'-RACE PCR, was amplified by RT-PCR, cloned into pBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA), sequenced and examined in an *in vitro* transcription-coupled translation system, using T7 RNA polymerase and wheat germ extract (TNT, Promega, Madison, WI). ³⁵S-Met (ICN, Costa Mesa, CA) was incorporated in the reaction for visualization of
- 30 translated products. The reaction was analyzed under reducing condition on a polyacrylamide gel (16.5% Tris/Tricine, BioRad, Hercules, CA) together with a pre-stained marker (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). The gel was dried and subjected to autoradiography.

RESULTS**A. Prostate ESTs representing TCR γ were identified by database analysis.**

We identified 23 TCR γ ESTs, from 20 cDNA clones, derived from 6 tumor
5 and 2 normal prostate cDNA libraries. The TCR γ composite sequence from assembly of
prostate ESTs has 76 nucleotides of TCR γ constant domain sequence, 448 nucleotides of
untranslated 3' region sequence and poly(A) sequence. By alignment of the prostate ESTs
to mature TCR γ transcripts from cell lines established from peripheral blood T-
lymphocytes (GenBank Acc. No. M16768, M16804 and M30894) we found that the
10 prostate EST composite sequence is identical to the TCR γ transcript from peripheral
blood T-lymphocytes. The dbEST database analysis indicates that the TCR γ gene is
highly transcribed in human prostate.

B. Expression of TCR γ (3' UTR) in human prostate verified by RNA dot blot.

To analyze the transcriptional activity TCR γ gene in human prostate, a
15 cDNA probe from the untranslated 3' end (3' UTR) of the TCR γ transcript was assayed on
mRNA from 50 different human tissues, Figure 2A. We verified that normal prostate
(position C7) expresses TCR γ mRNA and we further observed that prostate has by far the
strongest expression of all tissues represented on the dot blot membrane. TCR γ gene
20 expression was also found in small intestine (E3), spleen (E4), thymus (E5), peripheral
leukocyte (E6), lymph node (E7), bone marrow (E8), and lung (F2).

C. Northern shows two size-specific TCR γ transcripts in human prostate.

Northern blot hybridization using the 3' UTR probe revealed that prostate
has two TCR γ transcripts of approximately 1.1 and 2.8 kb, Figure 2B (lane 3) while the
25 predominant transcript in spleen, thymus, small intestine and blood leukocytes is 1.5 kb.
A transcript size of 1.5 kb is consistent with TCR γ mRNA from $\gamma\delta$ T-lymphocytes
(GenBank Acc. No. M16768, M16804, (Kraegel *et al.*, *Science* **237**, 64-67 (1987));
M30894, (Littman *et al.* *Nature* **326**, 85-88 (1987)). Since the database analysis indicated
that a constant domain of TCR γ is part of the prostate transcript, we also used a TCR γ
30 constant domain probe (TCR C γ). We found the same 1.1 kb and 2.8 kb bands in the
prostate, Figure 3A (lane 3).

D. Prostate cells expressing TCR γ do not express TCR δ or CD3 transcripts.

TCR γ -chain protein is normally co-expressed with the TCR δ -chain protein. Since the TCR γ gene is transcriptionally active in human prostate, we went on to analyze the transcriptional activity of the TCR δ gene. The dbEST was analyzed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) using the TCR δ transcript nucleotide sequence. ESTs from prostate cDNA libraries did not match any part of the TCR δ -chain transcript. Furthermore, Northern blot analysis did not detect any prostate expression of TCR δ mRNA, Figure 3B (lane 3). We conclude that the TCR δ gene is silent in prostate. As expected, TCR δ transcripts are expressed in spleen, thymus and blood leukocytes, Figure 3B.

E. LNCaP cells, but not PC-3 cells, express the prostate-specific TCR γ transcripts.

Given that TCR γ mRNA is expressed in normal prostate, we next analyzed whether it is also expressed in prostate cancer. The prostate-specific 1.1 kb transcript was found in mRNA preparations from LNCaP, but not in mRNA preparations from PC-3, Figure 3C. The prostate-specific 2.8 kb transcript, expressed in normal prostate, is also present in LNCaP although to a much lesser degree.

A. RNA in situ hybridization shows TCR γ expression in prostate epithelial cells.

The prostate consists of acinar glandular tissue with variable and mixed population of simple duct lining epithelial cells, ranging to complex hyperplastic ducts in the glandular compartments. These compartments are tightly connected to smooth muscle cells, fibroblasts and other cell types in the prostate stroma. To determine the cellular localization of the human prostate TCR γ expression, RNA in situ hybridization was carried out with TCR(C γ -3' UTR) sense and anti-sense riboprobes. We found that TCR γ mRNA is highly expressed in epithelial cells within the acinar ducts of the prostate while stromal cells and other cell types in the prostate are negative, Figure 4A, 4C. TCR γ expression was also detected in hyperplastic and neoplastic areas of the prostate. The expression in benign and neoplastic acinar epithelium is comparable. TCR γ expression could not be observed in human kidney tissue, Figure 4E, or in human brain.

G. The prostate TCR γ transcript contains C γ 1 but not any VJ γ genes.

After we had established the TCR $\gamma\delta$ expression profile in the prostate we went on to characterize the predominant, 1.1 kb, prostate-specific TCR γ transcript. The LNCaP cell line was used for the characterization since one can not exclude the possibility of mRNA contamination from infiltrating T-cells in the mRNA preparations extracted from bulk prostate tissue. We knew from database analysis that the 3' end sequence of the prostate TCR γ transcript is identical to that from peripheral blood leukocytes and that the location of the polyadenylation signal is identical. Therefore, the difference in transcript size between prostate and leukocytes is due to sequence differences upstream of the stretch identified by the prostate ESTs. An RT-PCR set up to amplify the constant domain portion of the TCR γ transcript identified the TCR γ C1 gene. The slightly larger TCR γ C2 is not expressed in LNCaP. Variable domain (V γ) to constant domain (C γ)-spanning RT-PCRs did not yield any product, indicating that V γ is not part of the prostate-specific TCR γ transcript.

H. LNCaP has not undergone VJ gene rearrangement in the TCR γ locus.

Since RT-PCRs intending to amplify the variable domain of TCR γ did not yield any product we next analyzed the TCR γ locus. During the development of $\gamma\delta$ T-cells the TCR loci undergo V(D)J gene rearrangements to bring together the gene segments that make up the variable domain of the receptor. To address whether LNCaP cells have undergone TCR γ VJ gene rearrangement PCRs were carried out on genomic DNA using combinations of TCRV γ and TCRJ γ primers, to cover every possible rearrangement (see Materials and Methods). None of the primer combinations yielded any PCR product showing that LNCaP cells have not undergone VJ gene rearrangement of the TCR γ locus. The fact that TCR γ VJ rearrangement has not taken place in prostate epithelial cells, shows that the prostate expression is different from that of mature $\gamma\delta$ T-lymphocytes.

I. Prostate epithelial cells express a TCR (JC) γ transcript.

Since the identified prostate TCR γ transcripts consist of C γ but not of any V γ gene segment, we next analyzed what sequence is upstream of C γ 1. RNA primer-extension and 5'RACE PCR were carried out to obtain the startpoint of transcription. The primer-extension experiment conducted on LNCaP mRNA, showed a predominant band of approximately 128 nucleotides with minor bands in the 130-135 nucleotide area, Figure 5. Since the reverse transcription started 75 bases from the 5' end of C γ 1 (see

WO 01/04309

49

PCT/US00/19039

Materials and Methods) the transcript has about 53 nucleotides upstream of C γ 1. The 5' RACE PCR conducted on LNCaP cDNA revealed one specific PCR product. The amplified product was found to contain a J γ 1.2 gene segment, correctly spliced to the C γ 1 gene segments. A number of clones isolated by RACE PCR were sequenced. They initiated close to the start site defined by the primer extension experiment. A somewhat variable starting point of transcription is consistent with the identification of minor bands slightly larger than the predominant one in the primer-extension experiment. An illustration of how the prostate TCR γ is transcribed and spliced is shown in Figure 6. The nucleotide sequence of the TCR γ transcript, as obtained from LNCaP, is shown in Table 1. The composite sequence is 1020 \pm 3 nucleotides long. It contains ~53 bases from the J γ 1.2 gene segment, 519 bases of C γ 1, followed by 448 bases of untranslated sequence containing a polyadenylation signal and poly(A) sequence at the 3' end.

J. *In vitro* translation of the prostate-specific TCR γ transcript.

The prostate transcript has four translational initiation codons (ATG) in the original TCR γ reading frame that are double underlined in Table 1. Calculated protein sizes for the four different start points are 12.8, 12.0, 7.2 and 3.2 kDa, respectively. To analyze the translational activity of the prostate transcript, *in vitro* transcription-coupled translation was carried out using full-length prostate TCR γ cDNA. Two proteins of approximately 8 and 13 kDa were obtained, Figure 7 (lane 1). Negative control reactions did not yield any protein product.

DISCUSSION

Specific expression of TCR γ transcripts in epithelial cells of the prostate.

We identified expression of T-cell receptor γ -chain (TCR γ) mRNA in human prostate and have shown that it originates from epithelial cells of the prostate and not from infiltrating $\gamma\delta$ T-lymphocytes. We also demonstrated that the T-cell receptor δ -chain (TCR δ) gene is silent in prostate. TCR γ mRNA is expressed in epithelial cells within the acinar ducts of the prostate as well as in prostate cancer. Two TCR γ transcripts of 1.1 kb and 2.8 kb are present in human prostate. They are different in size compared to the 1.5 kb TCR γ transcript found in spleen, thymus and peripheral blood leukocytes. The TCR $\gamma\delta$ mRNA expression profile suggests that the transcription in prostate does not follow the usual pathway of $\gamma\delta$ T-lymphocytes. The prostate TCR γ expression was initially discovered by analysis of the publicly available EST database. Our results show

WO 01/04309

50

PCT/US00/19039

that EST clustering is a powerful tool to identify novel and unexpected gene expression. The prostate ESTs representing the TCR γ transcript are all from cDNA libraries made from cells isolated by laser capture microdissection (Emmert-Buck *et al.*, *Science* 274, 998-1001 (1996)). The fact that the TCR γ transcripts proved to originate from prostate epithelial cells and not from infiltrating $\gamma\delta$ T-lymphocytes verifies that microdissection is a valuable technique to procure pure cell subpopulations from specific microscopic regions of tissues.

The prostate TCR(JC) γ transcript.

10 The prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP, which was isolated from a lymph node metastasis (Horoszewicz *et al.*, *Cancer Res.* 43, 1809-1818 (1983)) expresses readily detectable levels of the 1.1 kb prostate-specific TCR γ transcript. The expression in LNCaP cells shows that the transcript originates from epithelial cells and that it can be carried on during the development of a prostatic malignancy. The LNCaP transcript
15 consists of ~53 bases of the J γ 1.2 gene segment, the three C γ 1 exons, untranslated sequence followed by poly(A) sequence. The prostate transcript is different from the mature T-lymphocyte transcript in that it lacks a V γ gene segment and that it is initiated within the intronic sequence directly upstream of J γ 1.2 (data not shown). The promoter driving the prostate TCR γ transcript and its mechanism of activation in prostate epithelial
20 cells are under investigation. The 2.8 kb prostate-specific TCR γ transcript is very faint in LNCaP and the 5' RACE PCR experiment did not retrieve any product consistent with a 2.8 kb transcript. Therefore, the 2.8 kb transcript needs further study.

Comparison with TCR (JC) γ transcripts in T-lymphocytes.

25 Many studies have shown that it is possible to detect TCR gene transcription prior to, or concomitant with, the onset of V(D)J rearrangement in hematopoietic cells (Wang *et al.*, *Mol. Immunol.* 33, 957-964 (1996); Shimamura, M., and Ohta, S., *Eur. J. Immunol.* 25, 1541-1546 (1995); Villey *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 27, 1619-1625 (1997); Sikes *et al.*, *J. Immunol.* 161, 1399-1405 (1998)). The TCR γ gene has been
30 reported to be transcriptionally active in murine bone marrow-resident T-lymphocyte precursor cells with unrearranged γ loci, resulting in sterile TCR C γ transcripts (Wang *et al.*, *Mol. Immunol.* 33, 957-964 (1996)). In addition, expression of unrearranged TCR V γ transcripts have also been reported during ontogeny (Goldman *et al.* *J. Exp. Med.* 177, 729-739 (1993)). Sterile transcription of TCR and immunoglobulin gene segments has so

WO 01/04309

51

PCT/US00/19039

far been limited to cells from the lymphoid lineages (Lauzurica, P., and Krangel, M.S., *J. Exp. Med.* 179, 1913-1921 (1994)). Furthermore, activation of germ-line transcription at nearly all TCR and immunoglobulin loci temporally correlates with activation of locus recombination (Sikes *et al.*, *J. Immunol.* 161, 1399-1405 (1998); Goldman *et al.* *J. Exp. Med.* 177, 729-739 (1993); Lauzurica, P., and Krangel, M.S., *J. Exp. Med.* 179, 1913-1921 (1994); Sleckman *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 14, 459-481 (1996)). We have shown, by independent experiments using genomic DNA and cDNA, that recombination has not taken place of the TCR γ locus of prostate epithelial cells. Therefore, the expression of the TCR (JC) γ transcript in prostate epithelium does not correlate with recombination and it may serve a different function than the sterile transcripts observed in T-lymphocyte precursor cells.

Initial hypothesis of the possibility of a novel prostate-specific protein in the TCR γ locus.

The prostate TCR γ transcript is highly expressed and we hypothesize that there is an underlying biologically important reason. The fact that VJ gene rearrangement has not taken place in the TCR γ locus of prostate epithelial cells excludes the possibility that a mature TCR γ -chain protein is made. We also exclude the possibility that a TCR γ constant domain protein is made without the TCR γ variable domain, because no translational initiation codon (ATG) is found upstream of C γ . In TCR γ -chain proteins a J γ segment encodes 16-20 amino acids of the variable domain, while the major part of the variable domain is encoded by one of the V γ segments. Unless the amino acids encoded by a J γ segment are combined with amino acids encoded by a V γ gene segment, they cannot function as a TCR in MHC recognition. This raised the possibility of a novel prostate-specific protein, encoded from within C γ . Our initial hypothesis was that one of the ATG codons in the original TCR γ reading frame initiates translation, although a different reading frame or a less frequently used initiation codon may be used.

The *in vitro* transcription-coupled translation experiment, using prostate TCR γ cDNA revealed that the transcript was fully functional. Two proteins were obtained. The 13 kDa protein most likely originates from the first double underlined ATG in Figure 1, which yield a calculated protein size of 12.8 kDa (PS-TCR γ -1). The 8 kDa protein most likely originates from the second double underlined ATG, calculated size of 7.2 kDa (PS-TCR γ -2). These proteins were further explored in the studies reported in the next Example. In conclusion, the fact that prostate epithelial cells, or that

WO 01/04309

52

PCT/US00/19039

any non-lymphoid-derived cell type, express high level of a transcript from a gene that was thought to be exclusively expressed by cells from the lymphoid lineage, was a highly unexpected discovery.

5 EXAMPLE 2. DISCOVERY OF THE TCR γ ALTERNATE READING FRAME PROTEIN

The previous Example demonstrated the unexpected discovery of TCR γ transcript in prostate and prostate cancer cells, the in vitro translation of the transcript, and the initial hypothesis that the transcript resulted in the presence of a truncated form of TCR γ chain in these cells. This Example sets forth the further unexpected discovery that the transcript in fact results in a previously unknown protein, now designated "TARP," expressed from an alternate reading frame. Even more unexpectedly, the studies reported below show that TARP is a nuclear protein, and is present in many breast cancer cells.

15 MATERIALS AND METHODS

Primers. TCR γ -upATGmut#1 (5'-TTACAGATAAACAACCTGATACAGATGTTTCCCCAAGCCC-3'); TCR γ -upATGmut#2 (5'-GGGCTTGGGGAAACATCTGTATCAAGTGTGTTATCTGTA-3'); TCR γ -upATGmut#3 (5'-GATAAACAACCTGATGCAGATATTTCCCCAAGCCC-3'); TCR γ -upATGmut#4 (5'-GGGCTTGGGGAAATATCTGCATCAAGTGTGTTATC-3'); TCR γ -upATGmut#5 (5'-GATAAACAACCTGATACAGATATTTCCCCAAGCCC-3'); TCR γ -upATGmut#6 (5'-GGGCTTGGGGAAATATCTGTATCAAGTGTGTTATC-3'); TCR γ -downATGmut#1 (5'-CCCAGGAGGGGAACACCATAAAGACTAACGACACATAC-3'); TCR γ -downATGmut#2 (5'-GTATGTGTCGTTAGTCTTATGTTTCC-3'); TCR5.1 (5'-GATAAACAACCTGATGCAGATGTTTCC-3'); TCR3.1 (5'-TTATGATTCTCTCCATGCAGCAG-3'); TCR γ 1.2R (5'-AAGCTTGTTCGGGACCAAATAC); B-Actin Forward (5'-ATCTGGCACCACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'); B-Actin Reverse (5'-CTTCATACTCCTGCTGCTGATCCACATCTGC-3'). Primers were synthesized by Sigma-Genosys (The Woodlands, TX) and Lofstrand Labs Limited (Gaithersburg, MD).

Constructs. The TARP transcript cloned into pBluescript II SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) was described previously (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)). This plasmid is referred to as pBSSK-TCR γ in this

WO 01/04309

53

PCT/US00/19039

manuscript. pBSSK-TCR γ mutATGup1, with the ATG at position 69 mutated to ATA, was constructed using the Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). The PCR reaction used TCR γ -upATGmut#1 and TCR γ -upATGmut#2 as primers and pBSSK-TCR γ as template. pBSSK-TCR γ mutATGup2, with the ATG at position 73 mutated to ATA, was constructed as above using TCR γ -upATGmut#3 and TCR γ -upATGmut#4 as primers and pBSSK-TCR γ as template. pBSSK-TCR γ mutATGup-both, with the ATGs at positions 69 and 73 mutated to ATA, was constructed as above using TCR γ -upATGmut#5 and TCR γ -upATGmut#6 as primers and pBSSK-TCR γ mutATGup1 as template. pBSSK-TCR γ mutATGdown, with the ATG at position 242 mutated to ATA, was constructed as above using TCR γ -downATGmut#1 and TCR γ -downATGmut#2 as primers and pBSSK-TCR γ as template. pET-TCR γ contains nucleotides 242-469 of the TARP transcript (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)) subcloned into the pET23a vector (Novagen, Madison, WI). pET-TARP contains nucleotides 56-242 of the TARP transcript (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)) subcloned into the pET23a vector. pVC4D-TARP contains nucleotides 69-242 of the TARP transcript (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)) subcloned into the pVC4D vector (Bruggemann, E. P. *et al.*, *BioTechniques* 10:202-209 (1991)).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

20 Isolation of poly(A) RNA was performed using the Micro-FastTrack™ 2.0 kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. 500 ng of poly(A) RNA or 5 μ g of total RNA were denatured for 2 minutes at 70°C in the presence of 50 pmol oligo-dT primer (Invitrogen). Single stranded cDNAs were prepared in a 10 μ l reaction containing 250 μ M dNTPs, 2 mM DTT, 8 U RNasin (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), 50 U Superscript II™ RT (Life Technologies, Rockville, MD) and incubated for 90 minutes at 42 °C. The samples were then diluted with 75 μ l 10 mM Tris-HCl [pH 7.5] and incubated at 72 °C for 10 minutes. 3 μ l of cDNA were used for PCR that contained 250 μ M dNTPs, 25 pmol of each respective primer, 1 unit AmpliTaq® DNA polymerase (Roche) and amplified for 35 cycles. Similar PCR conditions were used on the human breast RAPID-SCAN™ gene expression panel 30 (OriGene Technologies, Rockville, MD). Primers TCR γ J1.2R, TCR5.1 and TCR3.1 were used to detect the TARP transcript, while primers B-Actin Forward and B-Actin Reverse were used to detect the actin transcript.

Northern Blot Hybridization. Northern blot hybridization using 2 µg of poly(A) RNA was performed as described previously (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)).

5 ***In Vitro* Transcription-Coupled Translation.** *In vitro* transcription-coupled translation reactions were described previously (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)). pBSSK-TCR γ , pBSSK-TCR γ mutATGdown, pBSSK-TCR γ mutATGup1, pBSSK-TCR γ mutATGup2 and pBSSK-TCR γ mutATGup- both were used as templates.

10 **Cell Culture.** LNCaP, PC3, MCF7, BT-474 and SK-BR-3 cells were maintained in RPMI-1640 medium (Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD) at 37 °C with 5% CO₂. The medium contained 10% fetal bovine serum (FBS, Quality Biological, Inc.), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and penicillin/streptomycin. Hs57Bst cells were maintained in RPMI-1640 medium at 37 °C with 5% CO₂. The medium
15 contained 10% FBS, 30 ng/ml epidermal growth factor (EGF, Harlan, Cincinnati, OH), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and penicillin/streptomycin.

Antibody Production. Polyclonal ΔPE-TARP antibodies were made as follows. pVC4D-TARP, which contains the entire TARP open reading frame fused to the C'-terminus of a catalytically inactive form of the *Pseudomonas* exotoxin (ΔPE) (Bruggemann, E. P. *et al.*, *BioTechniques* 10:202-209 (1991)), was expressed in
20 Epicurian Coli[®] BL21-CodonPlus[™] (DE3)-RIL cells (Stratagene). Preparation of inclusion bodies and rabbit immunization were described previously (Brinkmann, U. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8616-8620 (1991)). The antiserum was purified using the ImmunoPure[®] IgG (Protein A) Purification Kit according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL).

25 TCR γ antibodies were made as described above using pET-TCR γ , an expression plasmid containing the extracellular domain of TCR γ fused to a C'-terminal six-histidine tag. Prior to immunization, the histidine-tagged TCR γ protein was purified using a Ni-NTA agarose column according to the manufacturer's instructions (QIAGEN, Valencia, CA).

30 **Preparation of Cell Extracts.** Whole cell protein extracts were prepared as follows. 5 x 10⁸ growing cells from each respective cell line were harvested and resuspended in 1X RIPA buffer containing proteinase inhibitors (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% TritonX-100, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1

WO 01/04309

55

PCT/US00/19039

µg/ml leupeptin). The extracts were sonicated briefly and clarified by centrifugation. Protein concentrations were determined using the Coomassie® Plus Protein Assay reagent according to the manufacturer's instructions (Pierce). Protein extracts from prostate tissue were prepared by grinding 0.5 g of prostate cancer tissue frozen at -80 °C into a fine powder using a cold mortar and pestle. The powdered tissue was collected, resuspended in 1X RIPA and processed as described above.

Nuclear, membrane and cytoplasmic extracts from prostate and breast cell lines were prepared based on protocols previously published (Dignam, J. D. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 11:1475-1489 (1983); Sladek, F. M. *et al.*, *Genes Dev.* 4:2353-2365 (1990)).

Western Blot Analysis. 20 or 40 µg of protein extract, 1 µg of recombinant His-TARP or 100 ng of recombinant His-TCRγ were run on a 16.5% Tris-Tricine gel (BIO-RAD, Hercules, CA) and transferred to a 0.2µm Immun-Blot™ PVDF membrane (BIO-RAD) in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.3) at 4 °C for 4 hours at 30 V. Filters were probed with either 10 µg/ml ΔPE-TARP antiserum or 1 µg/ml TCRγ antiserum and their respective signals were detected using a chemiluminescence western blotting kit according to the manufacturer's instructions (Roche).

TARP is a nuclear protein expressed in prostate cancer cells. To determine whether TARP or TCRγ exists in prostate cancer cells, we generated antibodies against both proteins and performed western blots on different prostate cancer cell extracts. As shown in Figure 3A (top panel), TARP was detected in the prostate cancer LNCaP cell line and a prostate cancer tumor extract. The 7 kDa band comigrates with the recombinant His-TARP suggesting that the product detected in the LNCaP and cancer extracts is TARP. Previously, we demonstrated that the prostate-specific *TCRγ* transcript is not expressed in the prostate cancer PC3 cell line (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)). Therefore, we used PC3 cell extracts as a negative control and demonstrated that the 7 kDa band was absent in these extracts (Figure 3A, top panel). Importantly, no 7 kDa bands were detected when the pre-bleed antiserum or an antiserum against the *Pseudomonas* exotoxin (PE, see Materials and Methods) was used (data not shown). TCRγ was not detected in any of these extracts even though the recombinant protein showed a very strong signal with the antibody employed (Figure 3A,

WO 01/04309

56

PCT/US00/19039

bottom panel). These data indicate that the prostate-specific *TCR γ* transcript encodes TARP.

To determine the cellular localization of TARP, we prepared nuclear, cytoplasmic and membrane fractions from LNCaP cells. As shown in Figure 3B, TARP
5 was detected in the nucleus and not in the cytoplasm or membrane fraction. Similar results were obtained using nuclei purified by fractionating the cell extracts through a sucrose cushion (Sladek, F. M. *et al.*, *Genes Dev.* 4:2353-2365 (1990)) (data not shown).

The *TARP* transcript is expressed in breast cells. Previously, we reported that the *TCR γ* EST cluster also contains some ESTs from brain libraries
10 (Vasmatazis, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:300-304 (1998)). After this initial report, additional ESTs have been deposited into the database and the cluster now contains ESTs from breast, colon, kidney and gastric libraries as well. To determine whether the existence of these ESTs indicates the expression of the *TARP* transcript in
15 these cells or whether it may be due to the presence of infiltrating $\gamma\delta$ T-lymphocytes when these libraries were made, we performed RT-PCR on various cell lines to test for the presence of the *TARP* transcript. As shown in Figure 4A, expression of the *TARP* transcript was detected in the breast cell lines MCF7, BT-474, SK-BR-3 and CRL-1897. No signals were detected in the neuroblastoma cell line A172, glioblastoma cell line
20 IMR32, colon cell line COLO 205, gastric cell line KATO III or kidney cell lines COS7 and 293 (Figure 4A and data not shown). To determine whether the *TARP* transcript is expressed in human breast tissues in addition to cell lines, we tested 12 different normal breast and 12 different breast cancer cDNAs using a RAPID-SCAN™ panel (OriGene
Technologies, Rockville, MD). *TARP* mRNA was shown to be abundant in some of the breast cancer samples (Figure 4B, top panel) while barely detectable in the normal breast
25 samples after 35 rounds of PCR (data not shown). Significantly, no signals were detected in reactions lacking cDNA. *Actin* was used to show that similar amounts of cDNA were present in each lane (bottom panel). The weak signals in the normal breast samples correlate well with the lack of *TARP* signal shown in Figures 4A and 5 for the Hs57Bst cell line, a breast cell line derived from normal breast tissue. These results suggest that
30 expression of the *TARP* transcript in the breast is increased after oncogenic transformation. However, more studies are needed before any definitive conclusions can be made.

WO 01/04309

57

PCT/US00/19039

To determine whether the *TARP* transcript observed in the breast cell lines is the same as the transcript found in the prostate cell line, we performed RT-PCR using primers against different regions of the *TARP* transcript. As shown in Figure 5A, the *TARP* transcript in prostate contains a portion of the *Jy1.2* gene segment, three *Cy1* exons and some untranslated sequence followed by a poly(A) tail (7). Primer set 1 and 3 amplifies the entire *TARP* transcript (Figure 5B, top panel) while primer set 2 and 3 amplifies the *Cy1* region only (Figure 5B, middle panel). As shown in Figure 5B, similar-sized bands were detected in three breast cell lines (MCF7, BT-474 and SK-BR-3) as compared to the prostate cell line (LNCaP) using either primer set. Importantly, no signals were detected in the reactions lacking cDNA (dH₂O) and similar amounts of cDNA were used as demonstrated by the *actin* control (Figure 5B, bottom panel). These data indicate that the *TARP* transcript found in the breast cell lines is the same as the transcript found in the prostate cell line. To further support this conclusion, we analyzed the *TARP* transcript sizes from each cell line by a northern blot. Previously, we showed that 1100 and 2800 nucleotide transcripts exist in LNCaP cells, with the 1100 nucleotide transcript being the predominant form (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)). As shown in Figure 5C, similar-sized *TARP* transcripts were found in three breast cell lines (MCF7, BT-474 and SK-BR-3) as compared to the prostate cell line (LNCaP), although at a weaker intensity. Therefore, we conclude that *TARP* mRNA is expressed in prostate and breast cancer cells.

To determine whether TARP protein exists in the breast cancer cell lines, we performed a western blot with breast cancer nuclear extracts using an antibody against TARP. As shown in Figure 6 (top panel), TARP reactive bands were detected in MCF7, BT-474 and SK-BR-3 cells. TARP was not detected in the membrane or cytoplasmic fractions in these breast cancer lines (data not shown). Importantly, TARP is the protein product encoded by the *TARP* transcript in the breast cell lines because TCR γ was not detected in any of these nuclear extracts even though the recombinant protein showed a very strong signal with the antibody employed (Figure 6, bottom panel). These data indicate that TARP also exists in breast cancer cells.

We report the identification of a 7 kDa nuclear protein encoded by a specific transcript derived from the *TCR γ* locus expressed in prostate and breast cancer cells. Because the protein is encoded from a reading frame different from TCR γ , we name it TARP for TCR γ Alternate ReadinG frame Protein. Besides being translated from

WO 01/04309

58

PCT/US00/19039

an alternate reading frame of a transcript originating within an intron of the *TCR γ* locus, TARP has two other unusual features. First, it is surprising to find such a small peptide in the cell because most are usually secreted. Second, TARP lacks a good Kozak sequence (Kozak, M. *Cell* 44:283-92 (1986)). Because the *TCR γ* reading frame contains a good
5 Kozak sequence, we initially hypothesized that a truncated *TCR γ* protein was encoded. However, as shown in Figure 3, our initial hypothesis was incorrect. It is of interest that the *in vitro* translation results indicate a preference for the TARP protein and that either ATG in the TARP reading frame can be used to initiate protein synthesis. Protein sequencing will be needed to determine which ATG is used to initiate TARP protein
10 synthesis.

A very interesting feature of the TARP protein sequence is that it contains five leucines in heptad repeats, suggesting that TARP may contain a leucine zipper dimerization motif (Figure 7A). For this to be true, TARP must contain an amphipathic helix. One indication that TARP may contain an amphipathic helix is that serine and
15 proline residues, residues believed to serve as a helix initiator, are found immediately before the first leucine repeat. Second, many charged amino acids are found within the heptad repeats thereby giving the helix an amphipathic nature and potentially serving as salt bridges with other helices. Even though the presence of leucines in heptad repeats is a good indication of a leucine zipper motif, there are proteins identified containing five
20 leucines in heptad repeats that are not considered leucine zipper proteins. For example, the crystal structures for karyopherin (Chook, Y. M. *et al.*, *Nature* 399:230-237 (1999)), *B. stearothermophilus* pyrimidine nucleoside phosphorylase (Pugmire, M. J. *et al.*, *Structure* 6:1467-1479 (1998)) and *T. thermophilus* phenylalanyl-tRNA synthetase (Mosyak, L. *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 2:537-547 (1995)) have shown that these proteins do
25 not contain α -helical structures in the region where the sequence contains five leucines in heptad repeats. Interaction and structure studies are needed to determine the significance of the leucine repeats found in TARP.

Another unusual feature of the TARP amino acid sequence is that a region of basic amino acids follows the potential leucine zipper motif (Figure 7A), suggesting a
30 possible DNA-binding motif. However, the orientation of the basic region is rather unique in that it follows the leucine repeats rather than precedes them. Most leucine zipper proteins that bind DNA have the basic region before the leucine repeats (for a review, see (Chook, Y. M. *et al.*, *Nature* 399:230-237 (1999))). The basic region in

WO 01/04309

59

PCT/US00/19039

TARP may only be functioning as a nuclear localization signal, but the fact that TARP is a nuclear protein strengthens the hypothesis that TARP may bind DNA. Functional studies are needed before any definitive conclusions can be made.

To determine if TARP shares homology with any known proteins, we performed a protein BLAST search against GenBank. This search indicated that the amino acid sequence of TARP shares some homology to *Dictyostelium discoideum* Tup1 (GenBank accession no. AAC29438) and *Saccharomyces cerevisiae* Tup1 (Williams, F. E. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 10:6500-6511 (1990)) (Figure 7C). Yeast Tup1 is normally found in a complex with Cyc8(Ssn6) and is required for transcriptional repression of genes that are regulated by glucose, oxygen and DNA damage (Tzamarias, D. *et al.*, *Genes Dev.* 9:821-831 (1995)). Neither Cyc8(Ssn6) nor Tup1 binds DNA, but each acts as a part of a corepressor complex through interactions with specific DNA-binding proteins such as $\alpha 2$, Mig1, Rox1 and $\alpha 1$ (Tzamarias, D. *et al.*, *Genes Dev.* 9:821-831 (1995)). The C'-terminal half of Tup1 contains six repeats of a 43-amino acid sequence rich in aspartate and tryptophan, known as WD-40 or β -transducin repeats (Williams, F. E. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 10:6500-6511 (1990); Fong, H. K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2162-2166 (1986)). WD-40 repeats have been identified in many proteins and play a role in protein-protein interactions. Importantly, Tup1 has been shown to interact with $\alpha 2$ through two of its WD-40 repeats (Komachi, K. *et al.*, *Genes Dev.* 8:2857-2867 (1994)). It is interesting to note that TARP shares homology with the fifth WD-40 repeat of Tup1 (Figure 7C). Because TARP is a nuclear protein, its homology with Tup1 suggests that TARP may be a member of a functional nuclear protein complex involved in transcriptional regulation. Therefore, it is necessary to identify TARP-interacting proteins in order to determine its function.

The TARP antibody recognizes a doublet in prostate and breast nuclear extracts (Figure 6A). The faster 7 kDa band comigrates with the His-TARP recombinant protein, while the weaker band runs at a larger molecular weight. One possible explanation for the 9 kDa band is post-translational modifications. To determine if TARP contains any known post-translational modification sites, we analyzed the TARP amino acid sequence using the PROSITE program of the Swiss Institute of Bioinformatics ExPASy proteomics server (<http://www.expasy.ch>) (Appel, R. D. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 19:248-260 (1994); Hofmann, K. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27:215-219 (1999)). As shown in Figure 7A, many potential phosphorylation sites were found including cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (RRAT and RRGTT) and

WO 01/04309

60

PCT/US00/19039

protein kinase C phosphorylation sites (SSR and SRR). Phosphorylation has been shown in many cases to cause a protein to run at a larger apparent molecular weight on an SDS-PAGE gel. If this is the case, the results from Figure 6 may indicate that the unmodified form is prevalent in LNCaP cells and that only the phosphorylated form is present in MCF7 and SK-BR-3 cells. Additional experiments are clearly needed to determine the true nature of the 9 kDa band and whether TARP is post-translationally modified when expressed in prostate and breast cancer cells.

We report here the expression of TARP mRNA and protein in breast cancer cells. Our initial studies of the *TARP* transcript did not reveal *TARP* expression in the breast (Essand, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9287-9292 (1999)). One possible explanation is that *TARP* is expressed at low levels in the normal breast and is difficult to detect. As described in the Results section, very weak signals were detected in a PCR analysis of normal breast samples as compared to the strong signals detected in the cancer samples. Therefore, the presence of *TARP* in breast cancer cells may indicate that *TARP* expression is induced after the oncogenic transformation of breast cells. In addition, the existence of *TARP* in breast cancer cells may indicate that *TARP* is regulated by estrogen. This hypothesis is strengthened by the identification of an element within the intronic promoter of *TARP* that combines an androgen response element (ARE) with an estrogen response element (ERE). This hybrid element consists of two half-sites specific to the ARE at the 5' end and to the ERE at the 3' end [(Ziliacius, J. *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 9:389-400 (1995)) and unpublished data]. Additional experiments are needed to determine if estrogen regulates *TARP*. There are instances, however, where mutant AREs cause the expression of certain prostate-specific genes in breast tumors. For example, *prostate specific antigen* (PSA) has been shown to be expressed in breast tumors (Majumdar, S. *et al.*, *Br. J. Cancer* 79:1594-1602 (1999)). Molecular analysis of the aberrant expression of PSA lead to the discovery of a single point mutation in one of the AREs found within the PSA promoter. It is believed that this mutation leads to the loss of androgen-regulated PSA expression in breast tumors (Majumdar, S. *et al.*, *Br. J. Cancer* 79:1594-1602 (1999)). It is unclear at this time whether a similar mutation in the *TARP* promoter occurs in the three breast cell lines tested.

The prostate is dependent on androgens for maintenance of its structure and function. When prostate cells become malignant, they often lose their androgen dependence. In this study, we used two prostate cell lines that differ in their dependence on androgen for growth: LNCaP and PC3 cells. The androgen receptor is present in the

WO 01/04309

61

PCT/US00/19039

androgen-dependent LNCaP cell line, but is absent in the androgen-independent PC3 cell line (Tilley, W. D. *et al.*, *Cancer Res.* 50:5382-5386 (1990)). As shown in Figure 3, *TARP* is expressed in LNCaP cells but not in PC3 cells. This result suggests that *TARP* expression may be regulated by androgen stimulation. The identification of an ARE-like element within the *TARP* promoter strengthens the idea that *TARP* is induced by androgens. Experiments are currently being done to determine whether androgens induce *TARP* mRNA expression. Expression in LNCaP cell but not in PC3 cells may indicate that *TARP* is important in regulating androgen-dependent responses.

10

The present invention provides novel materials and methods relating, *inter alia*, to prostate cells, prostate cancer, and breast cells and breast cancer. While specific examples have been provided, the above description is illustrative and not restrictive. Many variations of the invention will become apparent to those skilled in the art upon review of this specification. The scope of the invention should, therefore, be determined not with reference to the above description, but instead should be determined with reference to the appended claims along with their full scope of equivalents.

All publications and patent documents cited in this application are incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication or patent document were so individually denoted. By their citation of various references in this document Applicants do not admit that any particular reference is "prior art" to their invention.

WO 01/04309

62

PCT/US00/19039

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a TCR γ Alternate Reading frame Protein ("TARP"), an immunogenic fragment thereof, a polypeptide with at least 90% sequence identity to
5 TARP and which is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP, and a polypeptide which has at least 90 % sequence identity with TARP and which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.
2. An isolated polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide
10 comprises the sequence of TARP.
3. An isolated polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the sequence of an immunogenic fragment of TARP.
4. An isolated polypeptide of claim 1, which polypeptide has at least 90% sequence identity to TARP and is specifically recognized by an antibody which
15 specifically recognizes TARP.
5. An isolated polypeptide of claim 1, which polypeptide has at least 90 % sequence identity with TARP and which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.
- 20 6. A composition comprising a polypeptide of claim 2 and a pharmaceutically acceptable carrier.
7. A composition comprising a polypeptide of claim 3 and a pharmaceutically acceptable carrier.
8. A composition comprising a polypeptide of claim 4 and a
25 pharmaceutically acceptable carrier.
9. A composition comprising a polypeptide of claim 5 and a pharmaceutically acceptable carrier.

10. An isolated, recombinant nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide having the amino acid sequence of a TCR γ Alternate Reading frame Protein ("TARP"), an immunogenic fragment thereof, a polypeptide with at least 90% sequence identity to TARP and which is specifically
5 recognized by an antibody which specifically recognizes TARP, and a polypeptide which has at least 90 % sequence identity with TARP and which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.
11. The isolated, recombinant nucleic acid molecule of claim 10,
10 comprising the sequence of TARP.
12. The isolated, recombinant nucleic acid molecule of claim 10 wherein the polypeptide is an immunogenic fragment of a TARP.
13. The isolated, recombinant nucleic acid molecule of claim 10 wherein the polypeptide has at least 90% sequence identity to TARP and which is
15 specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP.
14. The isolated recombinant nucleic acid molecule of claim 10 which polypeptide has at least 90 % sequence identity with TARP and, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.
- 20 15. The isolated, recombinant nucleic acid molecule of claim 10 which is an expression vector comprising a promoter operatively linked to the nucleotide sequence.
16. The isolated, recombinant nucleic acid molecule of claim 15,
25 wherein said nucleotide sequence encodes a polypeptide having the amino acid sequence of a TCR γ Alternate Reading frame Protein ("TARP").
17. The isolated, recombinant nucleic acid molecule of claim 15, wherein said nucleotide sequence encodes a polypeptide having the amino acid sequence of an immunogenic fragment of TARP.

18. The isolated, recombinant nucleic acid molecule of claim 12, wherein said nucleotide sequence encodes a polypeptide with at least 90% sequence identity to TARP and which is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP.
- 5 19. The isolated, recombinant nucleic acid of claim 12, wherein said nucleotide sequence encodes a polypeptide which has at least 90 % sequence identity with TARP which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.
- 10 20. A method comprising administering to a subject a composition, which composition is selected from the group consisting of: an isolated polypeptide having the amino acid sequence of a TCR γ Alternate Reading frame Protein ("TARP"), an immunogenic fragment thereof, a polypeptide with at least 90% sequence identity to TARP and which is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes
15 TARP, a polypeptide which has at least 90 % sequence identity with TARP and which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP, an isolated nucleic acid encoding one of these polypeptides, an antigen presenting cell pulsed with a polypeptide comprising an epitope of TARP, and cells sensitized in vitro to TARP, an
20 immunogenic fragment thereof, a polypeptide with at least 90% sequence identity to TARP which is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP, or a polypeptide which has at least 90 % sequence identity with TARP which, when processed and presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules, activates T lymphocytes against cells which express TARP.
- 25 21. The method of claim 20 comprising administering to the subject TARP or an immunogenic fragment thereof.
22. The method of claim 20 wherein the polypeptide has at least 90% sequence identity to TARP and is specifically recognized by an antibody which specifically recognizes TARP.

WO 01/04309

65

PCT/US00/19039

23. The method of claim 20, wherein the polypeptide has at least 90 % sequence identity with TARP and, when processed and presented by an antigen presenting cell in conjunction with an MHC molecule, activates T lymphocytes against cells expressing TARP.
- 5 24. The method of claim 20 wherein the administration to a subject who suffers from prostate cancer.
25. The method of claim 20, wherein the administration is to a subject who suffers from breast cancer.
26. The method of claim 20, wherein the administration is to a female
10 subject who has not been diagnosed with breast cancer.
27. The method of claim 20 wherein the administration comprises sensitizing CD8+ cells *in vitro* to an epitope of a TARP protein and administering the sensitized cells to the subject.
28. The method of claim 20, further comprising co-administering to the
15 subject an immune adjuvant selected from non-specific immune adjuvants, subcellular microbial products and fractions, haptens, immunogenic proteins, immunomodulators, interferons, thymic hormones and colony stimulating factors.
29. The method of claim 20 comprising administering an antigen presenting cell pulsed with a polypeptide comprising an epitope of TARP.
- 20 30. The method of claim 20 comprising administering a nucleic acid sequence encoding polypeptide comprising an epitope of TARP, which nucleic acid is in a recombinant virus.
31. The method of claim 20 comprising administering a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising an epitope of a TARP protein.
- 25 32. The method of claim 20 comprising administering an expression vector that expresses a polypeptide comprising an epitope of a TARP protein, which expression vector is in a recombinant bacterial cell.

WO 01/04309

66

PCT/US00/19039

33. The method of claim 20 comprising immunizing the subject with a expression vector that expresses a polypeptide comprising an epitope of a TARP protein, which expression vector is in an autologous recombinant cell.
34. The method of claim 27 wherein the CD8+ cells are T_C cells.
- 5 35. The method of claim 34 wherein the T_C cells are tumor infiltrating lymphocytes.
36. A method for detecting, in a male, a prostate cell of epithelial origin, or, in a female, a breast cancer cell, comprising detecting in a cell from said male or said female a nucleic acid transcript encoding TARP, or detecting TARP produced by translation of the transcript, whereby detection of the transcript or of the protein in a cell from said male identifies the cell as a prostate epithelial cell and whereby detection of the transcript or of the protein in a cell from said female identifies the cell as a breast cancer cell.
- 10
37. The method of claim 36, comprising detecting the transcript.
- 15 38. The method of claim 36, comprising detecting the protein.
39. The method of claim 36, comprising contacting RNA from the cell with a nucleic acid probe that specifically hybridizes to the transcript under hybridization conditions, and detecting hybridization.
40. The method of claim 36, comprising disrupting said cell and contacting a portion of the cell contents with a chimeric molecule comprising a targeting moiety and a detectable label, wherein the targeting moiety specifically binds to the protein, and detecting the label bound to the protein.
- 20
41. The method of claim 36, wherein the cell is taken from a lymph node.
- 25 42. The method of claim 36, wherein the cell is taken from a breast biopsy.

WO 01/04309

67

PCT/US00/19039

43. An antibody that specifically binds to an epitope of a TCR γ Alternate Reading frame Protein.

44. A method of modulating levels of TARP in a cell, said comprising introducing into said cell a composition selected from the group consisting of: a ribozyme
5 which specifically cleaves a TARP-encoding nucleic acid, an antisense oligonucleotide which specifically binds to a TARP-encoding nucleic acid, a DNA binding protein which binds specifically to a TARP-encoding nucleic acid, and a nucleic acid encoding TARP operatively linked to a promoter.

WO 01/04309

1/14

PCT/US00/19039

Prostate-Specific Transcript from TCR γ locus

GGCCAAGAGTTGGGCAAAAAATCAAGGTATTTGGTCCCGGAACAAAGCTTATCATTACA 60
 <----- J gamma 1.2 ----->
 M Q K F P P S E L F F F L Q L L K Q S ²⁰ S R R
 GATAAACCACTTCATCCAGATCTTCCGCCAAGCCACTATTTTCTTCTCAATTGCTGAACAAAGCTCCAGAAGGC 140
 <----- C gamma 1 (exon CI) ----->
 L E H T F V F L R N F S L M L L R Y ⁴⁰ I G K K R R A T R
 TGGAACATACCTTTGTCTCTTSGAAAAATTTTCCCTGATGTTATTAAGATCAATTGGCAAGAAAGAGGCAACAGCA 220

 F W D P R R G T P ⁵⁸

 M K T N D T Y M K F S W L T V P E K
 TTCCTGGATCCCAGGAGGGGAACACCATGAAGACTAACGACACATACATGAAATTTAGCTGGTTAACGGTCCAGAAAG 300

 S L D K E H R C I V R H E H N K N G V D Q ⁴⁰ E I I P P P
 TCACCTGGCAAAAGAACACAGATGTATCGTCAGACATGAGAATAATAAAAACGGAGTTGATCAAGAAATTAATCTTCTCC 380

 I K T D V I T M D P K D N C ⁶⁰ S K D A N D T L L L L Q L
 AATAAAGACGGATGTCATCACAATGGATCCCAAGACAATGTTTCAAAGATGCAAAATGATACACTACTGCTGCAGCTCA 460
 -----><----- C gamma 1 (exon CII) -----><-----
 T N T S A Y Y M Y L L L L L K S V V Y F A I I T C C L
 CAAACACCTCTGCATATTACATGTACCTCTCTCTCAAGAGTGTGGTCTATTTTGGCATCATCACCTGCTGTCTG 540
 ----- C gamma 1 (exon CIII) -----><-----
 L R R T A F C C N G E K S ¹⁰⁰
 CTTAGAAGAAACGGCTTTCTGCTCAATGGAGCAATCATACAGACGGTGGCCAAAGGAGGCCATCTTTTCTCATCGG 620
 -----><-----
 STATGTCCTTAGAAGCGCTCTCTGAGGATCTAGTTGGGCTTTCTTCTGGGTTGGGCCATTTCACTTCATGTFGTG 700
 ACTATTCTATCATTATTGTATAACGGTTTCAAAACCAAGTGGGCACACAGAGAACCTCACTCTGTAATAACRAATGAGGAAT 780
 AGCCACGGCGATCTCCAGCAACATCTCTCCATGTTTCCACAGCTCTCCAGCCAAACCCAAATAGCCCTGCTATAGTG 860
 TAGACATCTCTGGGCTCTAGCCTGTCCCTCTCTTAGTGTCTTTAATCAGATAACTGCCCTGGAAAGCCTTTCATTTTAC 940
 AGCCCTGAAGCAGTCTTCTTTGCTAGTTGAATATGTGGTGTGTTTTCCGTAATAAGCAAATTAATTTAAAAAATG 1020
 AAAAGTT 1027

- Underlined sequences are:
- Transcription Initiation Site (within GCAAGAG sequence)
 - Polyadenylation Signal (AATAAA)
- Double Underlined sequences are:
- Possible Translation Initiation Codons (ATC)

FIG. 1

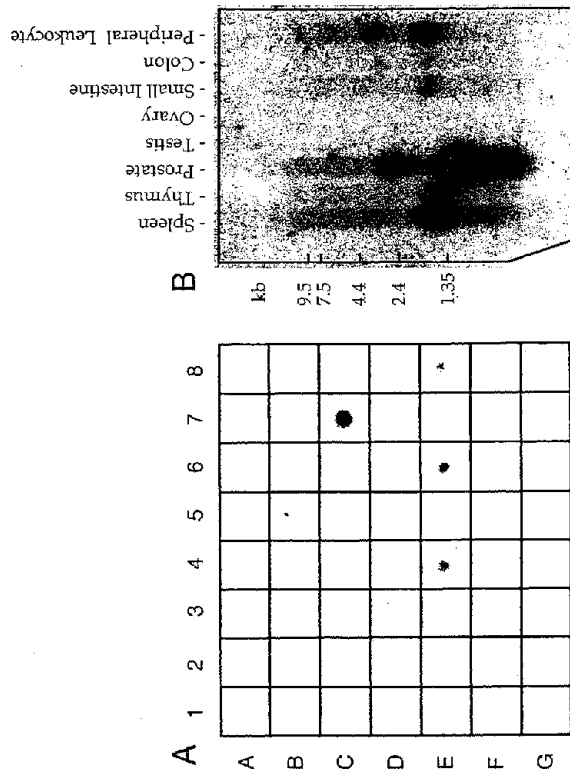


FIG. 2

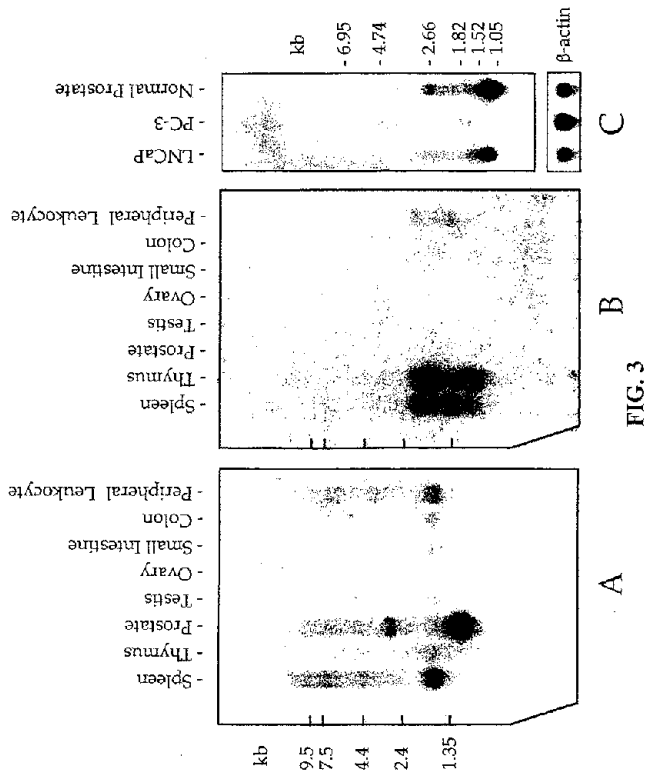


FIG. 3

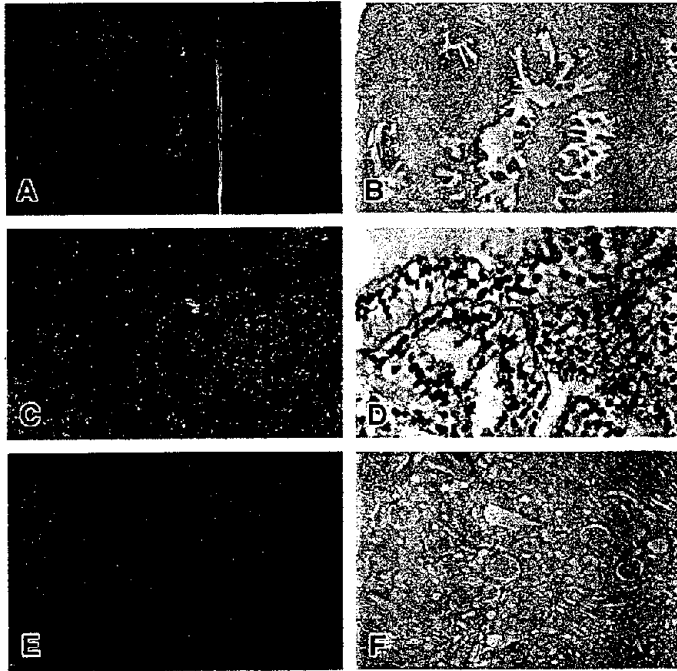


FIG. 4

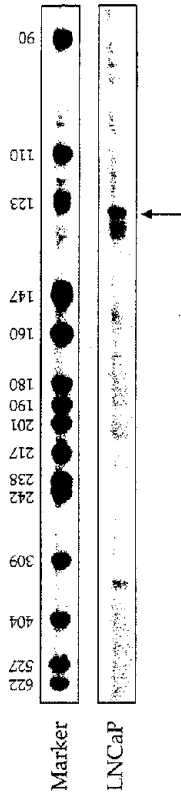


FIG. 5

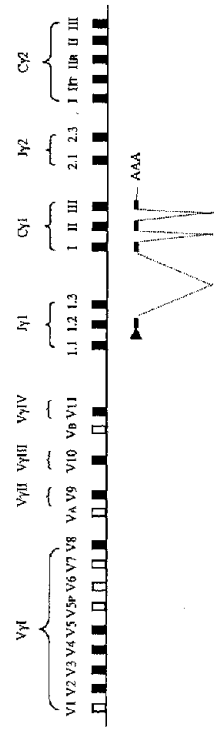


FIG. 6

WO 01/04309

7/14

PCT/US00/19039

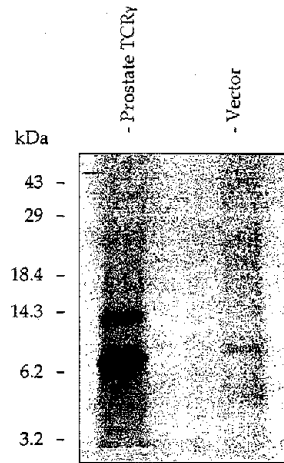
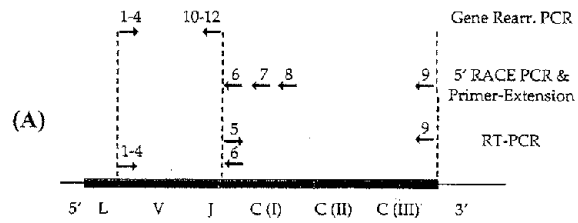


FIG. 7

WO 01/04309

8/14

PCT/US00/19039

TABLE 1. Primers (→) used for analysis of the prostate TCR γ transcript

(B)

Name	Annealing	Primer Sequence 5' -> 3'
1. TCRV γ L.F	V γ subgroup I	AACTTGGGAAGGGGAACRAAGTCAGTC
2. TCRV γ II.F	V γ subgroup II	AGTACTAAAACGCTGTCAAAAACAGCC
3. TCRV γ III.F	V γ subgroup III	TTGGACTTGGATTATCAAAAGTGG
4. TCRV γ IV.F	V γ subgroup IV	TTGGGCAGTTGGAAACACCTGAAA
5. TCRC γ .F	C γ exon CI	GATAAACAACTTGATGCAGATGTTTCCC
6. TCRC γ .R1	C γ exon CI	GGGAAACATCTGCATCAAGTTGTTTATC
7. TCRC γ .R2	C γ exon CI	CTGGAGCTTTGTTTCAGCAATTGAAGG
8. TCRC γ .R3	C γ exon CI	CTCARGAAGACAAAGGTATGTTCCAGC
9. TCRC γ .R4	C γ exon CIII	TTATGATTTCTCTCCATTCAGCAG
10. TCRJ γ 1.1.R	J γ 1.1	GAAGTACTATGAGCTTAGTCCCTT
11. TCRJ γ 1.2.R	J γ 1.2	AAGCTTTGTTCCGGGACCAATAC
12. TCRJ γ 1.3.R	J γ 1.3	TACCTGTGACAACAAGTGTGTTC

R=A+G

FIG. 8

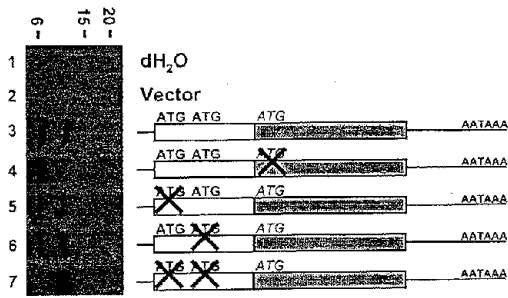


FIG. 9

WO 01/04309

10/14

PCT/US00/19039

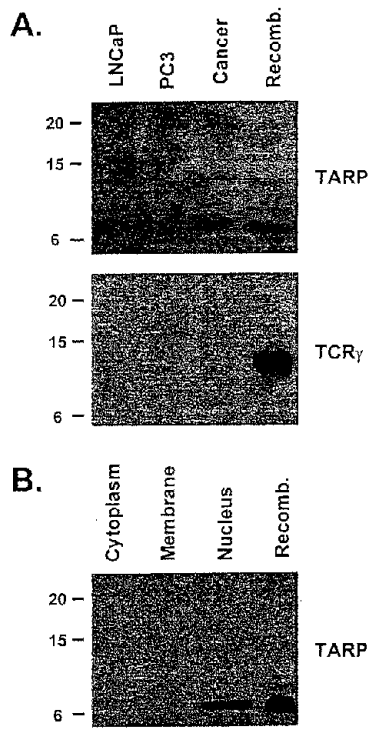


FIG. 10

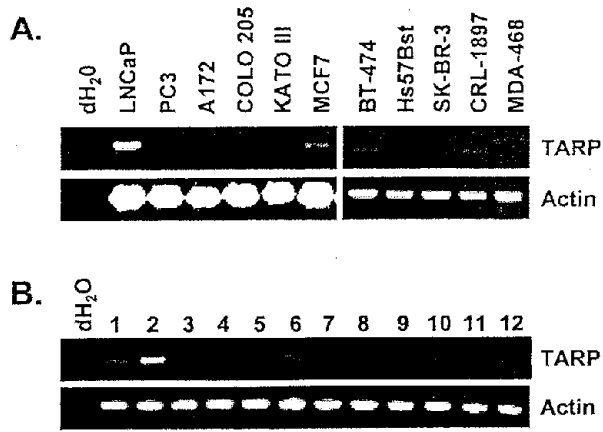


FIG. 11

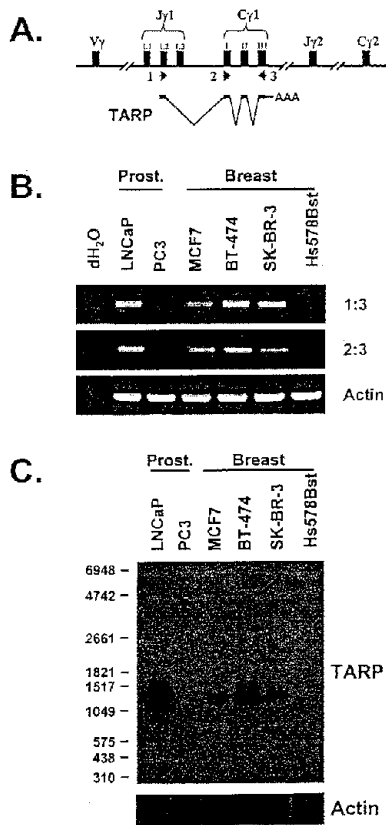


FIG. 12

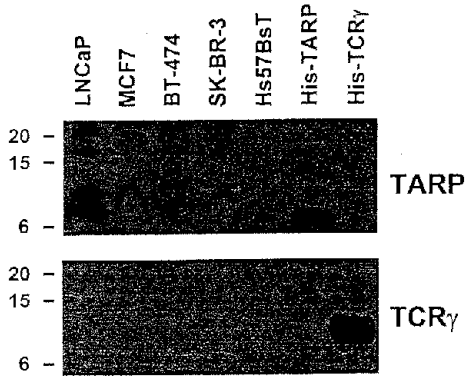


FIG. 13

WO 01/04309

14/14

PCT/US00/19039

A.

MQMFPSP [L] FFFLQL [L] KQSSRR

[L] EHTFVF [L] RNFSLM [L] LRYIGKKR

RATRFWDPRRGTP

B.

TARP	G	K	K	R	R	A	T	R	F	W	D	P	R	R	G	T
DTUP1	G	S	K	D	R	S	V	Q	F	W	D	P	R	N	G	T
YTUP1	G	S	K	D	R	G	V	L	F	W	D	K	K	S	G	N

FIG. 14

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/19039
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 A61K38/17 C12Q1/68 G01N33/50 C07K16/18		
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) IPC 7 C12N C07K A61K C12Q G01N		
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 used, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant privilege	Relevant to claim No.
P, X	ESSAND M ET AL: "High expression of a specific T-cell receptor gamma transcript in epithelial cells of the prostate" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 96, August 1999 (1999-08), pages 9287-9292, XP002151630 WASHINGTON US cited in the application figure 5 --- -/-	10-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
C earlier document but published on or after the international filing date		*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
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	31 October 2000	Date of mailing of the international search report 15/11/2000
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.O. Box 5618 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-2040, Tx. 31 65* epowl, Fax: (+31-70) 940-2016		Authorized officer Espan, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/19039
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DAVODEAU F ET AL: "Secretion of disulfide-linked human T-cell receptor gamma delta heterodimers" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 21, July 1993 (1993-07), pages 15455-15460, XP002151631 ND US sequence with GenBank/EMBL Data Bank accession number X72500	10-19
X	YOHIKAI Y ET AL: "Homo sapiens T cell receptor gamma-chain" EMBL DATABASE ENTRY HSTCRGAA4, ACCESSION NUMBER M27334, 2 February 1990 (1990-02-02), XP002151632 sequence	10-19
X	LEROY H: "Homo sapiens cDNA" EMBL DATABASE ENTRY A1557112, ACCESSION NUMBER A1557112, 25 March 1999 (1999-03-25), XP002151633 sequence	10-19
A	HAWKINS VICTORIA ET AL: "PED8: The Prostate Expression Database." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 27, no. 1, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 204-208, XP000933960 ISSN: 0305-1048	
A	VASMATZIS G: "Discovery of three genes specifically expressed in human prostate by expressed sequence tag database analysis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 95, January 1998 (1998-01), pages 300-304, XP002151634 WASHINGTON US cited in the application	

Form PCT/US 2001 (continuation of second sheet) (July 1999)

International Application No. PCT/US 00 19039

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 36-42 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 20-35 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 14/82	
C 0 7 K 14/82	C 0 7 K 16/30	
C 0 7 K 16/30	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72) 発明者 パスタン イラ
アメリカ合衆国 メリーランド州 ポトマック ビオール マウンテン ロード 1 1 7 1 0
- (72) 発明者 エサンド マグナス
スウェーデン国 ウブサラ ボトビドスガタン 3シー
- (72) 発明者 リー ビュンクーク
アメリカ合衆国 メリーランド州 ポトマック サンディー ランディング ロード 1 0 7 1 1
- (72) 発明者 バスマチス ジョージ
アメリカ合衆国 ミネソタ州 ローチェスター ファースト ストリート サウス ウェスト 2
0 0
- (72) 発明者 ウォルフギャング カート
アメリカ合衆国 メリーランド州 ジャーマンタウン ストニー ポイント ピーエル. 1 1 4
7 9
- (72) 発明者 ウルリッヒ ブリンクマン
ドイツ連邦共和国 ワイルハイム フェイチュルストラッセ 1 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 CA04 CA09 CA12 DA03 GA14
4B063 QA01 QA08 QA13 QA19 QQ08 QQ43 QQ79 QR32 QR35 QR48
QR55 QR62 QR77 QS25 QS34 QX02 QX07
4C084 AA02 AA07 AA13 BA22 BA35 CA53 CA56 NA14 ZB261 ZC781
4C085 AA03 AA38 BB11 EE01 EE06 FF11 FF24
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA05 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA41 DA76 DA86 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	T细胞受体 γ 替代阅读框架蛋白，(TARP) 及其用途		
公开(公告)号	JP2004512809A	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2001509513	申请日	2000-07-12
申请(专利权)人(译)	美利坚合众国政府，拷贝机禅特德健康与人类Sabishizu部部长		
[标]发明人	パスタンイラ エサンドマグナス リービュンクーク バスマチスジョージ ウォルフギャングカート ウルリッヒブリンクマン		
发明人	パスタン イラ エサンド マグナス リー ビュンクーク バスマチス ジョージ ウォルフギャング カート ウルリッヒ ブリンクマン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/39 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/18 C07K16/30 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	C07K14/47 A61K38/00 A61K39/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/00.H A61K39/39 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/30 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/GA14 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA22 4C084/BA35 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC781 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF11 4C085/FF24 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/143560 1999-07-13 US 60/157471 1999-10-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及含有源自前列腺上皮细胞和许多乳腺癌细胞的TCR γ 转录物的序列的核酸和含有源自许多乳腺癌细胞的TCR γ 转录物和备用阅读框架蛋白的序列的核酸。() (“TARP”)。疫苗从TARP制成，包括前列腺癌细胞和许多乳腺癌细胞的，是用于增强针对在其中表达蛋白质的细胞的免疫应答是有用的。本发明还提供了施用方法用于诊断乳腺癌的表达前列腺癌和TARP，核酸编码TARP的存在的方法和篷布的主题。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	ターマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 139 頁) 最終頁に続	

(21) 出願番号	特願2001-509513 (P2001-509513)	(71) 出願人	500357817
(86) (22) 出願日	平成12年7月12日 (2000. 7. 12)		ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッ
(85) 翻訳文提出日	平成14年1月15日 (2002. 1. 15)		ステイツ オブ アメリカ、 リブリ-
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/019039		ンテッド バイ ザ セクレタリー オ
(87) 国際公開番号	W02001/004309		ザ デパートメント オブ ヘルス
(87) 国際公開日	平成13年1月18日 (2001. 1. 18)		ンド ヒューマン サービス
(31) 優先権主張番号	60/143, 560		アメリカ合衆国 メリーランド 208
(32) 優先日	平成11年7月13日 (1999. 7. 13)		2, ベセスダ (番地なし)
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/157, 471		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成11年10月1日 (1999. 10. 1)	(74) 代理人	100108774
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 橋本 一彦