

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-159973

(P2009-159973A)

(43) 公開日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 B	4 B O 6 3
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 C O 8 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 72 O L (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-47489 (P2009-47489)	(71) 出願人	592130699
(22) 出願日	平成21年3月2日(2009.3.2)		
(62) 分割の表示	特願2000-585383 (P2000-585383) の分割		
原出願日	平成11年12月2日(1999.12.2)		
(31) 優先権主張番号	09/203, 939		
(32) 優先日	平成10年12月2日(1998.12.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	09/251, 835		
(32) 優先日	平成11年2月17日(1999.2.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	09/318, 503		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成11年5月25日(1999.5.25)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 P S C A : 前立腺幹細胞抗原およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】新規な前立腺細胞表面抗原、及び前立腺幹細胞抗原に対するモノクローナル抗体、検出/診断および処置の方法を提供する。

【解決手段】前立腺幹細胞抗原(P S C A)と称され、高い程度の前立腺上皮内の新形成(P I N)、アンドロゲン依存性およびアンドロゲン非依存性の前立腺腫瘍を含むすべての段階の前立腺癌で広く過剰発現する、新規の前立腺細胞表面抗原。P S C A特異的モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびに前立腺癌の処置の免疫治療方法および他の治療方法。

【選択図】図1

FIG. 1A

```
1 agggagaggc agtgaccatg aaggctgtgc tgcctgccct gttgatggca
51 ggcttgcccc tgcagccagg cactgccttg ctgtgtact cctgcaaacg
101 ccaggtgagc aacgaggact gctgcaggtt ggaagactgc acccagcttg
151 gggagcagtg ctggaccgag cgcctccgag cagtggcctt cctgaccgtc
201 atcagcaaa gctgcagctt gaactgcgtg gatgactcac aggaactact
251 cgtgggcaag aagaacatca cgtgctgtga caccgacttg tgcacgccca
301 gcggggccca tgccttcgag cggcgtccg ccatcctgc gctgctccct
351 geactcgccc tgcctgcttg gggaccgggc cagctatagg cctgggggg
401 ccccgctgca gccacactg ggtgtggtgc ccaagcctt tctgcccactc
451 ctacagaac ctggccaggt gggagcctgt cctggttccf gaggcacatc
501 ctacgcgaag ttgaccatg tatgtttgca cccctttcc cnaaccctg
551 accttccat gggccttttc caggattccn accnggcaga tcagttttag
601 tganacanat ccgntgcag atggcccttc caacntttn tctgtntgtt
651 tccatggccc agcaltttc accttaacc ctgtgttcag gcacttnttc
701 cccaggaag ccttccctgc ccacccatt tatgaattga gccagtttg
751 gtctgtgttg tccccgcac ccagcaggga acaggaatc aggaaggccc
801 agtaaggct gagatgaagt ggaatgagta gaactggaag ctaaggttg
851 acgtgaagtc ctgggaattt ccagagatga ggcctggaag cctggaggaa
901 ggggccaggc ctacatttg tgggntccc gaatgpcag ctgagcacag
951 cgtagccctt taataaacac ctgttgata agccaaaaa aaaaaaa
```

FIG. 1B

```
MKAYLLALLMAGLALQPGTALLCYSKAQVSNEDCLQV
ENCTQLGEQCWTARIRAVGLLTIVISKGCSLNCYVDS
QDYVVGKKNITCCDIDLNASGAHALQPAATLALLPAL
GLLWGPGL
```

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

1 G 8 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 2 )、2 A 2 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 3 )、  
2 H 9 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 4 )、3 C 5 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 6 )、  
3 E 6 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 8 )、3 G 3 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 5 )、  
または 4 A 1 0 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 7 ) と示されるモノクローナル抗体を産生  
する、ハイブリドーマ。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載のハイブリドーマによって産生される、モノクローナル抗体。

**【請求項 3】**

10

請求項 2 に記載の抗体の F a b フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントまたは F v フ  
ラグメント。

**【請求項 4】**

請求項 2 に記載のモノクローナル抗体の抗原結合領域を含む、組換えタンパク質。

**【請求項 5】**

モノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体の抗原結合領域が、請求項 2 に記載  
のモノクローナル抗体のその標的抗原への免疫特異的結合を競合的に阻害する、モノクロー  
ナル抗体。

**【請求項 6】**

マウス抗原結合部位およびエフェクター機能を調節するヒト化領域を有するキメラ抗体で  
ある、請求項 4 に記載のモノクローナル抗体。

20

**【請求項 7】**

請求項 2 に記載のモノクローナル抗体のイディオタイプと反応性である、モノクローナル  
抗イディオタイプ抗体。

**【請求項 8】**

サンプル中の P S C A タンパク質の存在を検出する方法であって、該サンプルと請求項 2  
に記載の抗体を接触させる工程、および該抗体と該サンプル中の該 P S C A タンパク質と  
の結合を検出する工程を包含する、方法。

**【請求項 9】**

前記検出する工程が、以下：

30

- a . 前記サンプル中の前記 P S C A タンパク質と複合体を形成し得る抗体を該サンプルと  
接触させる工程；および
  - b . 少しでも複合体がこのように形成されるか否かを決定する工程
- を包含する、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記サンプルが、組織または生物学的液体である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記サンプルが、骨、骨髄、膀胱組織、前立腺組織、大腸細胞、または膵臓神経内分泌細胞  
である組織である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

40

前記生物学的液体が尿または血清である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記抗体が、放射標識、酵素、発色団、および蛍光剤からなる群より選択される化合物を  
用いて検出可能シグナルを産生するために標識される、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 14】**

治療剤に結合した請求項 2、5 または 6 に記載の抗体の抗原結合領域を含む分子を含む、  
免疫複合体。

**【請求項 15】**

治療剤に結合した請求項 4 に記載の組換えタンパク質の抗原結合領域を含む分子を含む、  
免疫複合体。

50

## 【請求項 16】

前記治療剤が細胞傷害剤である、請求項 14 または 15 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 17】

前記細胞傷害剤が、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、エチジウムブロマイド、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン D、ジフテリア毒素、*Pseudomonas* 菌体外毒素 (PE) A、PE 40、リシン、アブリン、糖質コルチコイドおよび放射性同位体からなる群より選択される、請求項 16 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 18】

サンプル中の PSCA タンパク質の存在を検出する方法であって、該サンプルと請求項 2 または 5 に記載の抗体を接触させる工程および該抗体と該サンプル中の該 PSCA タンパク質との結合を検出する工程を包含する、方法。

10

## 【請求項 19】

前記検出する工程が、以下：

c．前記サンプルを該サンプル中の前記 PSCA タンパク質と複合体を形成し得る抗体と接触させる工程；および

d．少しでも複合体がこのように形成されるか否かを決定する工程を包含する、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 20】

サンプル中の前記 PSCA タンパク質の存在を検出する方法であって、該サンプルを請求項 4 に記載の組換えタンパク質と接触させる工程、および該組換えタンパク質の該サンプル中の該 PSCA タンパク質との結合を検出する工程を包含する、方法。

20

## 【請求項 21】

前記検出する工程が、以下：

e．前記サンプル中の前記 PSCA タンパク質と複合体を形成し得る組換えタンパク質と該サンプルを接触させる工程；および

f．少しでも複合体がこのように形成されるか否かを決定する工程を包含する、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記サンプルが組織または生物学的液体である、請求項 18 または 20 に記載の方法。

30

## 【請求項 23】

前記サンプルが、骨、骨髄、膀胱組織、前立腺組織、大腸細胞、または膵臓神経内分泌細胞である組織である、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記生物学的液体が尿または血清である、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 25】

前記抗体が、放射標識、酵素、発色団および蛍光剤からなる群より選択される化合物を用いて検出可能シグナルを産生するために標識される、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記組換えタンパク質が放射標識、酵素、発色団および蛍光剤からなる群より選択される化合物を用いて検出可能シグナルを産生するために標識される、請求項 20 に記載の方法。

40

## 【請求項 27】

被験体中の前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌の経過をモニターする方法であって、該方法は、請求項 18 または 20 に記載の方法によって前記 PSCA タンパク質の存在を該被験体由来の最初のサンプル中で定量的に決定する工程、およびこのように決定された量と該被験体由来の第 2 サンプル中に存在する量とを比較する工程を包含し、該サンプルは、異なる時点で採取され、該決定された量の差異が該癌の経過を示す、方法。

## 【請求項 28】

50

被験体中の前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌の経過をモニターする方法であって、該方法は、以下：

a．サンプルと図 1 B に示されるようなヒト P S C A のアミノ酸配列を有する P S C A タンパク質をコードする核酸とを接触させる工程、および複合体を形成することにより該サンプル中の成分への該核酸の結合を検出する工程を包含する、該サンプル中の P S C A タンパク質をコードする核酸の存在を検出する工程であって、該複合体が、該サンプル中の該 P S C A タンパク質をコードする核酸を示す、工程、

b．このように検出された P S C A R N A の濃度を定量的に決定する工程、および

c．このように決定された量と該被験体由来の第 2 のサンプル中に存在する量とを比較する工程であって、該サンプルは、異なる時点で採取され、該決定された量の差異が前立腺癌の経過を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 29】

前記サンプルが組織または生物学的液体である、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記組織が骨、骨髄、または前立腺組織である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記生物学的液体が尿または血清である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌を被験体中で診断する方法であって、該方法は、請求項 2 または 5 に記載の抗体を用いて、前記 P S C A タンパク質に関連する細胞の数を該被験体由来の細胞サンプル中で定量的に決定する工程、およびこのように決定された細胞の数を正常被験体由来のサンプル中の量と比較する工程であって、測定可能な異なる量の存在が該癌の存在を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 33】

前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌を被験体中で診断する方法であって、該方法は、請求項 4 に記載の組換えタンパク質を用いて、前記 P S C A タンパク質に関連する細胞の数を該被験体由来の細胞サンプル中で定量的に決定する工程、およびこのように決定された細胞の数を正常被験体由来のサンプル中の量と比較する工程であって、測定可能な異なる量の存在が該癌の存在を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 34】

前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌を被験体中で診断する方法であって、該方法は、該被験体由来の細胞サンプル中で、請求項 2 または 5 に記載の抗体を用いて、該細胞によって発現される P S C A タンパク質の量を定量的に決定する工程、およびこのように決定された量を正常被験体由来のサンプル中の量と比較する工程であって、測定可能な異なる量の存在が該癌の存在を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 35】

前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌を被験体中で診断する方法であって、該方法は、該被験体由来の細胞サンプル中で、請求項 4 に記載の組換えタンパク質を用いて、該細胞によって発現される P S C A タンパク質の量を定量的に決定する工程、およびこのように決定された細胞の量を正常被験体由来のサンプル中の量と比較する工程であって、測定可能な異なる量の存在が該癌の存在を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 36】

前記細胞サンプルが骨由来、骨髄由来、または前立腺組織由来である、請求項 32、33、34、または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌を被験体中で診断する方法であって、該方法は、該被験体由来の生物学的液体サンプル中で請求項 2 または 5 に記載の抗体を用いて、該生物学的液体中の P S C A タンパク質の数を定量的に決定する工程、およびこのように決定された数と正常被験体由来の生物学的液体サンプル中の量とを比較する工程であって、測定可能な異なる量の存在が該癌の存在を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 3 8】

前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌を被験体中で診断する方法であって、該方法は、請求項 4 に記載の組換えタンパク質を用いて、P S C A タンパク質の数を該被験体由来の生物学的液体サンプル中で定量的に決定する工程、およびこのように決定された数を正常被験体由来の生物学的液体サンプル中の量と比較する工程であって、測定可能な異なる量の存在が該癌の存在を示す、工程を包含する、方法。

10

【請求項 3 9】

前記生物学的液体が尿または血清である、請求項 3 7 または 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前立腺癌、膀胱癌および前立腺癌の骨転移巣からなる群より選択されるいずれかの癌を被験体中で診断する方法であって、該方法は、図 1 B に示されたようにヒト P S C A のアミノ酸配列を有する P S C A タンパク質をコードする核酸を用いて、P S C A タンパク質をコードする R N A の量を該被験体由来のサンプル中で定量的に決定する工程およびこのように決定された R N A の量を正常被験体由来のサンプル中の量と比較する工程であって、測定可能な異なる量の存在が該癌の存在を示す、工程を包含する、方法。

20

【請求項 4 1】

前記サンプルが組織または生物学的液体である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記組織が骨、骨髄、または前立腺組織である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記生物学的液体が尿または血清である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

請求項 2 7 または 2 8 に記載の方法によって、癌の経過をモニターすることにより該癌に苦しんでいる被験体の予後を決定する方法であって、該方法は、異なる時点で前記サンプル中の P S C A の量の増加が、乏しい予後を示す、工程である、方法。

30

【請求項 4 5】

P S C A 抗原を発現する細胞を選択的に阻害する方法であって、該方法が、請求項 1 4 または 1 5 に記載の免疫複合体を、該細胞を阻害するために十分な量の細胞と反応させる工程を包含する、方法。

【請求項 4 6】

P S C A と関連する癌細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法は、P S C A 陽性癌細胞を、抗体または該抗体の F a b フラグメント、F ( a b ) 2 フラグメントもしくは F v フラグメント、あるいは P S C A に対する組換えタンパク質と接触させて、その結果、P S C A / 抗体複合体または P S C A / 組換えタンパク質複合体が形成される工程であって、該複合体の形成が該癌細胞の増殖を阻害する、工程を包含する、方法。

40

【請求項 4 7】

前記抗体が、1 G 8 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 2 )、2 A 2 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 3 )、2 H 9 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 4 )、3 C 5 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 6 )、3 E 6 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 8 )、3 G 3 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 5 )、または 4 A 1 0 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 7 ) と示されるモノクローナル抗体であるか、抗原結合領域が、1 G 8 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 2 )、2 A 2 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 3 )、2 H 9 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 4 )、3 C 5 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 6 )、3 E 6 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 8 )、3 G 3 (

50

A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 5 )、または 4 A 1 0 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 7 ) と示される該モノクローナル抗体のいずれかのその標的抗原への免疫特異的結合を競合的に阻害するモノクローナル抗体である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 F a b フラグメント、F ( a b ' ) 2 フラグメントもしくは F v フラグメントが、1 G 8 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 2 )、2 A 2 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 3 )、2 H 9 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 4 )、3 C 5 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 6 )、3 E 6 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 8 )、3 G 3 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 5 )、または 4 A 1 0 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 7 ) と示されるモノクローナル抗体のフラグメントであるか、あるいは抗原結合領域が、1 G 8 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 2 )、2 A 2 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 3 )、2 H 9 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 4 )、3 C 5 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 6 )、3 E 6 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 8 )、3 G 3 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 5 )、または 4 A 1 0 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 7 ) と示される該モノクローナル抗体のいずれかのその標的抗原への免疫特異的結合を競合的に阻害するモノクローナル抗体のフラグメントである、請求項 4 6 に記載の方法。

10

【請求項 4 9】

前記組換えタンパク質が、1 G 8 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 2 )、2 A 2 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 3 )、2 H 9 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 4 )、3 C 5 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 6 )、3 E 6 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 8 )、3 G 3 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 5 )、または 4 A 1 0 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 7 ) と示されるモノクローナル抗体の組換えタンパク質であるか、あるいは抗原結合領域が 1 G 8 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 2 )、2 A 2 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 3 )、2 H 9 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 4 )、3 C 5 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 6 )、3 E 6 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 8 )、3 G 3 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 5 )、もしくは 4 A 1 0 ( A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 7 ) と示される該モノクローナル抗体のいずれかのその標的抗原への免疫特異的結合を競合的に阻害するモノクローナル抗体のタンパク質である、請求項 4 6 に記載の方法。

20

【請求項 5 0】

P S C A 上流調節領域からなる、核酸分子。

【請求項 5 1】

前記 P S C A 上流調節領域がヒト由来である、請求項 5 0 に記載の核酸分子。

30

【請求項 5 2】

前記 P S C A 上流調節領域がマウス由来である、請求項 5 0 に記載の核酸分子。

【請求項 5 3】

前記 P S C A 上流調節領域がプロモーター活性を有する配列を含む、請求項 5 0 に記載の核酸分子。

【請求項 5 4】

前記 P S C A 上流調節領域がエンハンサー活性を有する配列を含む、請求項 5 0 に記載の核酸分子。

40

【請求項 5 5】

A T C C 番号 P T A - 8 0 と示される、請求項 5 0 に記載の核酸分子。

【請求項 5 6】

図 4 2 に示されるような、A T C C 番号 P T A - 8 0 の B g l I - H i n d I I I フラグメント。

【請求項 5 7】

図 4 2 に示されるような、A T C C 番号 P T A - 8 0 の B a m H I - H i n d I I I フラグメント。

【請求項 5 8】

図 4 2 に示されるような、A T C C 番号 P T A - 8 0 の、K p n I - H i n d I I I フラグメント。

50

## 【請求項 59】

前記 P S C A 上流調節領域に作動可能に連結される導入遺伝子をさらに含む、請求項 50 に記載の核酸分子。

## 【請求項 60】

前記導入遺伝子が、レポーター遺伝子をコードする、請求項 59 に記載の核酸分子。

## 【請求項 61】

前記導入遺伝子が、腫瘍の形成を誘導する遺伝子産物をコードする、請求項 59 に記載の核酸分子。

## 【請求項 62】

前記導入遺伝子が、毒素遺伝子、サイトカイン遺伝子、インターフェロン遺伝子、増殖因子遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、プロドラッグ酵素遺伝子、アンチセンス RNA、抗体遺伝子、またはオンコスタチン遺伝子からなる群より選択される治療遺伝子である、請求項 59 に記載の核酸分子。

10

## 【請求項 63】

請求項 50 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

## 【請求項 64】

前記 P S C A 上流調節領域に作動可能に連結される P S C A タンパク質をコードする配列をさらに含む、請求項 63 に記載のベクター。

## 【請求項 65】

前記 P S C A 上流調節領域に作動可能に連結される導入遺伝子をさらに含む、請求項 63 に記載のベクター。

20

## 【請求項 66】

適合性の宿主細胞にトランスフェクトされた、請求項 63 に記載のベクターを含む、宿主 - ベクター系。

## 【請求項 67】

前記宿主細胞が前立腺細胞である、請求項 66 に記載の宿主 - ベクター系。

## 【請求項 68】

遺伝子産物を産生する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 前記遺伝子産物を産生するために請求項 67 の宿主 - ベクター系を増殖させる工程；  
および

30

b) このようにして産生された該遺伝子産物を回収する工程  
を包含する、方法。

## 【請求項 69】

請求項 68 に記載の方法により産生される、タンパク質。

## 【請求項 70】

P S C A 上流調節領域に作動可能に連結される癌遺伝子を含む導入された核酸分子を有する生殖細胞および体細胞を有するトランスジェニック動物であって、該導入された核酸分子がマウスの組織における該癌遺伝子の発現に効果的であり、そして該マウスの泌尿生殖組織における腫瘍形成を誘導するために効果的であり、ここで該核酸が、胚段階で該マウスまたは該マウスの祖先に導入された、トランスジェニック動物。

40

## 【請求項 71】

前立腺腫瘍細胞を死滅させる方法であって、該方法は、前立腺腫瘍細胞に請求項 65 に記載のベクターを導入し、その結果、該ベクターが、該腫瘍細胞を死滅させるに十分な量の機能的な分子を発現する工程を包含する、方法。

## 【請求項 72】

前立腺腫瘍細胞を死滅をさせる方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 前立腺腫瘍細胞に請求項 65 に記載のベクターを導入する工程であって、ここで、前記導入遺伝子がプロドラッグ酵素をコードする、工程；

b) 該ベクターによって発現される該プロドラッグ酵素によって有害物質に変換されるプロドラッグを投与、それにより該腫瘍細胞を死滅させる、工程を包含する、方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

本出願の全体にわたって、種々の刊行物が括弧内に参照される。これらの刊行物の開示は、本明細書中にそれらの全体が参考として援用される。

## 【0002】

(発明の背景)

前立腺癌は、現在、アメリカ人男性に最も普通の型の癌であり、この集団において癌に関連する死の第2の主要な原因である。進行した段階において、前立腺癌は、優先的に骨に転移し、そこで前立腺癌は骨芽細胞の病巣を形成する。アンドロゲン除去治療での初期の処置後、ほとんどの転移性前立腺癌は、ホルモン治療抵抗性および致死となる。現行の診断様式および治療様式は、特異性がないことおよび、どの患者が、転移性の疾患を発症する危険性があるかを予測できないことにより限定される。

10

## 【0003】

ほとんどの前立腺癌は、尿道からは遠い前立腺の末梢領域において初めに起こる。この領域内の腫瘍は、いかなる症状も生じないかもしれない、そしてその結果、初期段階の前立腺癌を有するほとんどの男性は、顕著な進行が起こるまで、その疾患の臨床的な症状を示さない。前立腺の転移領域への腫瘍の進行は、尿道の閉塞を導き得、従って、この疾患の第1の症状を生じ得る。しかし、これらの臨床的な症状は、良性の前立腺過形成(BPH)の通常の非悪性状態と識別不能である。

20

## 【0004】

前立腺癌の診断および処置における基本的な問題の1つは、初期段階の局在化した腫瘍を正確に検出できるマーカーの欠如である。多数のマーカーが同定されており、そしてPSAのようないくつかは、広範に臨床的に使用されているが、理想的な前立腺腫瘍マーカーは、まだ特徴付けられていない。同様の問題は、どの癌が不活性であり、そしてどの癌が攻撃的であるか、または攻撃的になるかを決定するための効果的な予後マーカーの欠如である。例えば、PSAは、不活性な癌と攻撃的な癌とを正確に識別できない。加えて、抗体指向性の治療、免疫治療、および遺伝子治療のような治療方法の標的として役立ち得るマーカーについての大きな必要性もまた存在する。

## 【0005】

30

現在、手術もしくは放射線治療の後に再発性の疾患を発症する患者の20~40%のための、または診断時に転移性の疾患を有する患者のための効果的な処置は、存在しない。ホルモン除去治療は、これらの患者を和らげることができるが、大部分は回避不能に進行して、不治のアンドロゲン非依存性の疾患を発症する(Lalaniaら、1997、Cancer Metastasis Rev. 16:29-66(非特許文献1))。

## 【0006】

前立腺癌の初期の検出および診断は、現在、デジタル直腸検査(DRE)、前立腺特異的抗原(PSA)測定、経直腸的な超音波検査法(TRUS)、および経直腸的な針生検(TRNB)に依存する。現在、DREと組み合わせた血清PSA測定は、前立腺癌を検出および診断するために使用される主な手段を表す。この両方は、この疾患のより優れた診断マーカーを発見するための激しい研究を刺激した主要な制限を有する。

40

## 【0007】

PSAは、今日、前立腺癌をスクリーニングし、診断し、そしてモニターするために最も広く使用される腫瘍マーカーである。特に、血清PSAの検出のためのいくつかの免疫アッセイは、広範に臨床的に使用されている。最近、血清中のPSA mRNAに対する逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)アッセイが開発された。しかし、上昇したレベルのPSAが、BPHおよび前立腺炎を有する患者のうちの大きな割合において(25~86%)(Gaoraら、1997、Prostate 31:264-281(非特許文献2))、ならびに他の非悪性の障害およびいくらかの

50



正常な男性（このマーカーの診断の特異性をかなり制限する因子）において検出可能であるので、P S Aは疾患特異的マーカーではない。例えば、B P Hにおいて4 ~ 1 0 n g / m lの間の血清P S Aの上昇が観察され、そして前立腺炎において（特に急性前立腺炎において）さらに高い値が観察された。男性において、B P Hは、極度に普通の状態である。さらにこの状況を混乱させるのは、血清P S Aの上昇は、D R Eによる疾患の何の指標も伴わず観察され得、その逆もまた同じであるという事実である。さらに今や、P S Aは前立腺特異的ではないと認識される（概説について、G a oら、前出）。

#### 【0008】

P S Aに基づいた検出の特異性を改良するために設計された種々の方法（例えば、P S A密度および遊離のP S A対複合体P S Aの比の測定）が、記述された。しかし、これらの方法論はどれも、悪性の前立腺疾患と良性の前立腺疾患とを再現可能に区別し得なかった。加えて、P S Aの診断は、5 7 ~ 7 9 %の感度を有し（C u p pおよびO s t e r l i n g、1 9 9 3、M a y o C l i n P r o c 6 8 : 2 9 7 - 3 0 6（非特許文献3））、従ってこの疾患を有する有意な男性の集団における前立腺癌の同定を失敗する。

10

#### 【0009】

前立腺特異的膜抗体（P S M A）は、診断マーカーおよび治療マーカーとしてのその使用を評価する種々の研究の主題であった、前立腺癌の、最近記載された細胞表面マーカーである。P S M A発現は、主に前立腺組織に制限されるが、検出可能なレベルのP S M A m R N Aは、脳、唾液腺、小腸および腎細胞癌において観察された（I s r a e l i iら、1 9 9 3、C a n c e r R e s 5 3 : 2 2 7 - 2 3 0（非特許文献4））。P S M Aタンパク質は、大部分の原発性前立腺癌および転移性前立腺癌において高度に発現されるが、大部分の正常な上皮内新形成標本においてもまた発現される（G a oら、前出）。再発性の前立腺癌を画像化するためのインジウム1 1 1標識された抗P S M Aモノクローナル抗体（m A b）を使用した予備的な結果は、いくらかの見込みを示す（S o d e eら、1 9 9 6、C l i n N u c M e d 2 1 : 7 5 9 - 7 6 6（非特許文献5））。P S M Aが、有用な治療標的であると立証されるか否かは、今だに決定されていない。しかし、P S M Aは、機能的なアンドロゲンレセプターの存在を必要とするホルモン依存性抗原である。全ての前立腺癌細胞が、アンドロゲンレセプターを発現するわけではないことから、治療標的としてのP S M Aの有用性は、本質的に限定され得る。

20

30

#### 【0010】

前立腺癌の臨床病期分類は、今日、泌尿器科医が直面する別の基本的問題である。現在、臨床病期分類は、血清P S A決定および経直腸的な超音波誘導生検と組み合わせた、腫瘍が前立腺嚢（局所的に閉じ込められる）の辺縁内に残っている、またはそれを超えている（局所的に進行している）か否かを決定する、直腸検査に依存する。しかし、主観性が関わるせいで、D R Eによる臨床病期分類は、腫瘍の局所的な伸展を一樣に過小評価または過大評価し、頻繁にその位置を誤って判断し、そして腫瘍の容積および程度とはほとんど相関しない（L e e , C . T . およびO s t e r l i n g , J . E . C a n c e r o f t h e P r o s t a t e : D i a g n o s i s a n d S t a g i n g , U r o l o g i c O n c o l o g y , W . B . S a u n d e r s C o m p a n y , P h i l a d e l p h i a , 3 5 7 ~ 3 7 7 頁（1 9 9 7）（非特許文献6））。血清P S Aレベルはまた、病期分類の目的のために利用されるが、P S A単独では前立腺腫瘍を信頼性良く病期分類できていない。この疾患の進行を予測することに信頼性があると立証された技術はない。従って、前立腺癌の管理において、より信頼でき、かつより有益な病期分類および予後方法についての必要性が存在する。

40

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0011】

【非特許文献1】L a l a n iら、1 9 9 7、C a n c e r M e t a s t a s i s R e

50

v . 1 6 : 2 9 - 6 6

【非特許文献2】Gaoら、1997、Prostate 31:264-281

【非特許文献3】CuppおよびOsterling、1993、Mayo Clin Proc 68:297-306

【非特許文献4】Israeliら、1993、Cancer Res 53:227-230

【非特許文献5】Sodeeら、1996、Clin Nuc Med 21:759-766

【非特許文献6】Lee, C. T. およびOsterling, J. E. Cancer of the Prostate: Diagnosis and Staging, Urologic Oncology, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 357~377頁(1997)

10

【発明の概要】

【0012】

(発明の要旨)

本発明は、前立腺幹細胞抗原(PSCA)と称され、高い程度の前立腺上皮内の新形成(PIN)、アンドロゲン依存性およびアンドロゲン非依存性前立腺腫瘍を含むすべての段階の前立腺癌で広く過剰発現する、新規の前立腺細胞表面抗原を提供する。PSCA遺伝子は、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)系留細胞表面抗原のThy-1/Ly-6ファミリーのメンバーである幹細胞抗原-2(SCA-2)に対して30%の相同性を示し、アミノ末端シグナル配列、カルボキシ末端GPI系留配列、および複数のN-グリコシル化部位を有する123アミノ酸のタンパク質をコードする。PSCA mRNA発現は、アンドロゲン依存性およびアンドロゲン非依存性の両方の前立腺癌の異種移植片において、高度に上方制御される。インサイチュでのmRNA分析は、前立腺の推定幹細胞区画である基底細胞上皮にPSCA発現を局在化させる。フローサイトメトリ分析は、PSCAが主に細胞表面で発現され、そしてGPI連結により係留されることを実証する。蛍光インサイチュハイブリダイゼーション分析は、80%を超える前立腺癌において得られる対立遺伝子領域である、染色体8q24.2に対してPSCA遺伝子を局在化させる

20

PSCAは、その細胞表面位置、前立腺癌細胞のような特定の型の癌における非常に上方制御された発現の観点から最適な治療標的であり得る。この点において、本発明は、そのような前立腺癌細胞を破壊するために治療的に使用できるPSCAに結合可能な抗体を提供する。加えて、PSCAタンパク質およびPSCAコード核酸分子は、前立腺腫瘍の免疫媒介破壊を促進する種々の免疫治療方法に使用され得る。

30

【0013】

PSCAはまた、理想の前立腺癌マーカーを示し得、それは、悪性前立腺癌と、正常な前立腺と非悪性新形成とを識別するために使用され得る。例えば、PSCAは、良性前立腺過形成(BPH)と比較して前立腺癌で非常に高いレベルで発現される。対照的に、広範に使用される前立腺癌マーカーPSAは、正常な前立腺およびBPHの両方で高いレベルで発現されるが、前立腺癌ではより低いレベルで発現され、PSA発現をBPHまたは正常な腺と悪性前立腺癌とを区別するために役に立たなくする。PSCAの発現は、本質的にPSAの発現の逆であるから、PSCAの発現の分析は、非悪性状態と前立腺癌とを区別するために使用され得る。

40

【0014】

ヒトおよびマウスの両方のPSCAコード遺伝子が単離され、そしてそれらのコード配列は本明細書中で説明され、そして提供される。ヒトおよびマウスの両方のPSCAのアミノ酸配列もまた提供される。本発明はさらに、核酸に基づいたアッセイおよび免疫学的なアッセイを含む、前立腺癌の検出、モニタリング、および予後のための種々の診断アッセイを提供する。PSCA特異的モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびに前立腺癌の処置の免疫治療方法および他の治療方法もまた提供される。本発明のこれら

50

の局面および他の局面は、さらに以下に記載される。

(発明の詳細な説明)

本発明は、前立腺幹細胞抗原(本明細書中以降「PSCA」)に関する。PSCAは新規の、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)-固着細胞表面抗原であり、これは、正常な細胞(例えば、前立腺細胞、尿路上皮、腎集合管、結腸神経内分泌細胞、胎盤、正常な膀胱細胞および尿管移行上皮細胞)において発現される(図16)。正常な細胞に加えてPSCAはまた、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞およびアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞の両方(図9~11)、骨に転移する前立腺癌(図20~24および26~32)、ならびに膀胱癌腫(図6および25)によって過剰発現される。癌(例えば、前立腺癌)におけるPSCAの発現は、増加するグレードと相関して現れる。さらに、癌(例えば、前立腺癌)に苦しんでいる患者におけるPSCAの過剰発現(すなわち、正常な細胞において見いだされる、より高い発現)は、乏しい予後の指標であるようである。

10

【0015】

PSCA mRNAはまた、正常な前立腺において基底細胞のサブセットにより発現される。基底細胞上皮は、末期の分化型分泌細胞についての前駆体細胞を含むと考えられる(Bonkhoffら、1994、Prostate 24:114~118)。サイトケラチンマーカーを使用した最近の研究は、基底細胞上皮が少なくとも2つの異なる細胞部分集団を含み、1つはサイトケラチン5および14を発現し、そしてもう一方は、サイトケラチン5、8および18を発現することを示唆する(BonkhoffおよびRemberger、1996、Prostate 28:98~106)。PSCAは、基底細胞の1つのサブセットにしか発現されないという知見は、PSCAが、それら2つの基底細胞系統のうちの1つに対するマーカーであり得ること示唆する。

20

【0016】

PSCAの生物学的機能は知られていない。Ly-6遺伝子ファミリーは、シグナル伝達および細胞-細胞の接着を含む、多様な細胞機能に関与する。SCA-2を通じたシグナル伝達は、未成熟の胸腺細胞におけるアポトーシスを妨げることが示されている(Nodaら、1996、J. Exp. Med. 183:2355~2360)。Thy-1は、src様チロシンキナーゼを通じたT細胞の活性化およびシグナルの移行を含む(Thomasら、1992、J. Biol. Chem. 267:12317~12322)。Ly-6遺伝子は、腫瘍形成および同型の細胞の接着の両方に関係している(BamezaiおよびRock、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4294~4298; Katzら、1994、Int. J. Cancer 59:684~691; Brakenhoffら、1995、J. Cell Biol. 129:1677~1689)。基底細胞、および基底細胞とSCA-2との相同性における制限された発現に基づいて、本発明者らは、PSCAは、幹細胞機能/前駆体細胞機能(例えば、自己再生(抗アポトーシス)および/または増殖)において役割を果し得るという仮説を立てた。

30

【0017】

PSCAは、マウスおよびヒトにおいて高度に保存される。前立腺に優性に制限される保存された遺伝子の同定は、PSCAが正常な前立腺の発達において重要な役割を果し得るという仮説を支持する。

40

【0018】

種々の局面において、以下に詳細に記載されるように、本発明は、PSCAタンパク質、抗体、核酸分子、組換えDNA分子、形質転換宿主細胞、産生方法、アッセイ、免疫的治療法、トランスジェニック動物、免疫学的アッセイおよび核酸に基づくアッセイ、ならびに組成物を提供する。

【0019】

(PSCAタンパク質)

本発明の1つの局面は、種々のPSCAタンパク質、およびそのペプチドフラグメント

50

を提供する。本明細書中で使用されるように、P S C A は、図 1 B および 3 に提供されるような、ヒト P S C A のアミノ酸配列、図 3 に提供されるようなマウス P S C A ホモログのアミノ酸配列、または他の哺乳動物の P S C A ホモログのアミノ酸配列を有するタンパク質、および P S C A 活性を有するそれらタンパク質の対立遺伝子改変体、および保存的置換変異体に関する。本発明の P S C A タンパク質には、本明細書中に記載される具体的に同定され、かつ特徴づけられた改変体ならびに下記に要約される以下の方法に従って過度の実験をせずに単離 / 産生され、そして特徴づけられ得る対立遺伝子改変体、保存的置換改変体およびホモログが挙げられる。便宜のため、全ての P S C A タンパク質は集合的に P S C A タンパク質、本発明のタンパク質、または P S C A といわれる。

#### 【0020】

用語「P S C A」は、図 1 B および 3 に提供されるような、ヒト P S C A の全ての天然に存在する対立遺伝子改変体、アイソフォーム、および前駆体、ならびに図 3 に提供されるようなマウスの P S C A を含む。一般的に、例えば、天然に存在するヒト P S C A の対立遺伝子改変体は、図 1 B および 3 において提供される P S C A アミノ酸配列と有意な相溶性（例えば、70 ~ 90 %）を共有する。改変体は、わずかに異なるアミノ酸配列を有する対立遺伝子が G I P 結合タンパク質として前立腺細胞の表面で発現され得るか、または分泌され得るか、もしくは解離され得る。典型的に、P S C A タンパク質の対立遺伝子改変体は、本明細書中に記載の P S C A 配列からの保存的アミノ酸配列の置換を含むか、または P S C A ホモログ（例えば、本明細書中に記載のマウス P S C A ホモログ）に対応する位置からのアミノ酸配列の置換を含む。

#### 【0021】

P S C A 対立遺伝子改変体の 1 つのクラスは、図 1 B および 3 に示される P S C A アミノ酸配列の少なくとも小さな領域と高い程度の相溶性を共有するタンパク質であるが、さらにその配列由来の遊離基離脱（例えば、非保存的置換、切断、挿入またはフレームシフト）を含む。そのような対立遺伝子は、P S C A の変異体対立遺伝子と呼ばれ、そして典型的に、同じ生物学的機能を行わないタンパク質を提示する。

#### 【0022】

保存的アミノ酸置換は、タンパク質中において、しばしばタンパク質の高次構造またはタンパク質の機能のいずれかを变化させずになされ得る。このような変化には、イソロイシン（I）、バリン（V）、およびロイシン（L）のいずれかを、これらの疎水性アミノ酸の他のいずれかへの置換；アスパラギン酸（D）のグルタミン（E）への置換、およびその反対の置換；グルタミン（Q）のアスパラギン（N）への置換、ならびにその反対の置換；およびセリン（S）のスレオニン（T）への置換、およびその反対の置換が挙げられる。特にアミノ酸の環境、およびタンパク質の三次構造におけるその役割に依存した他の置換はまた、保存的であるとみなされ得る。例えば、グリシン（G）とアラニン（A）は、しばしばアラニン（A）とバリン（V）に互換可能であり得る。比較的疎水性のメチオニン（M）は、しばしばロイシンおよびイソロイシン、そして時にはバリンと互換され得る。リジン（K）およびアルギニン（R）は、アミノ酸残基の有意な特徴がその電荷であり、そしてこれら 2 つのアミノ酸残基の異なった p K が有意でない位置においてしばしば互換可能である。なお、特定の環境中の他の変化は「保存的」とであるとみなされ得る。

#### 【0023】

ヒト P S C A タンパク質のアミノ酸配列は、図 1 B および 3 に提供される。ヒト P S C A は、1 2 3 アミノ酸の単一のサブユニットから構成され、そしてアミノ末端シグナル配列、カルボキシ末端 G P I 固着配列および多重 N グリコシル化部位を含む。P S C A は、造血発達の最初期段階を特徴付ける細胞表面タンパク質の群である T h y - 1 / L y - 6 遺伝子ファミリーのメンバーである幹細胞抗原 - 2（S C A - 2）と 30 % の相溶性を示す。マウス P S C A ホモログのアミノ酸配列は、図 3 に示される。マウスの P S C A は、ヒト P S C A および類似構造の生物とおよそ 70 % の相溶性を有する 1 2 3 アミノ酸の単一のサブユニットタンパク質である。

## 【0024】

PSCAタンパク質は、多くの形態で、好ましくは単離された形態で具体化され得る。本明細書中で使用されるように、タンパク質は、物理的方法、機械的方法または化学的方法を使用して、正常にタンパク質を付随する細胞成分からPSCAタンパク質を除去した場合、単離されたと言われる。当業者は、標準的精製方法を容易に使用し、単離されたPSCAタンパク質を入手し得る。精製されたPSCAタンパク質分子は、抗体または他のリガンドへのPSCAの結合を損なう他のタンパク質または分子を実質的に含まない。単離および精製の性質ならびに程度は、意図された使用に依存する。PSCAタンパク質の実施形態は、精製されたPSCAタンパク質および機能的に可溶性のPSCAタンパク質を含む。機能的に可溶性のPSCAタンパク質の1つの例は、図1Bにおいて示されるアミノ酸配列、またはそのフラグメントを有する。1つの形態において、そのような機能的に可溶性のPSCAタンパク質またはそのフラグメントは、抗体または他のリガンドを結合する能力を保持する。

10

## 【0025】

本発明はまた、図1Bおよび3に示されるヒトおよびマウスのPSCAアミノ酸配列の生物学的に活性なフラグメントを含むペプチドを提供する。例えば、本発明は、アミノ酸配列TARI RAVGLLTVISK（配列番号：9）を有するペプチドフラグメント、アミノ酸配列VDDSQDY YVGKK（配列番号：10）およびSLNCVDDSQDY YVGK（配列番号：11）を有するペプチドフラグメントを提供する。

20

## 【0026】

本発明のペプチドは、PSCAに関連するエピトープと特異的に結合する抗体の産生を誘導する能力のような、PSCAの特徴を示す。PSCAタンパク質のそのようなペプチドフラグメントは、標準のペプチド合成技術および本明細書中に開示されるヒトまたはマウスPSCAタンパク質のアミノ酸配列を用いて産生され得る。あるいは、組換え方法が、このPSCAタンパク質のフラグメントをコードする核酸分子を産生するために使用され得る。この点に関して、本明細書中に記載されるPSCAコード核酸分子は、PSCAの規定されたフラグメントを産生するための手段を提供する。

## 【0027】

以下に議論されるように、PSCAのペプチドフラグメントは、：ドメイン特異的抗体の産生；PSCAまたはPSCAドメインに結合する因子の同定；PSCAまたはPSCAドメインに結合する細胞因子の同定；およびヒトPSCAのホモログまたは他の対立遺伝子型の単離において、特に有用である。特に興味深い構造を含むPSCAペプチドは、当該分野で周知の種々の分析技術（例えば、Chou-Fasman分析、Garnier-Robson分析、Kyte-Doolittle分析、Eisenberg分析、Karpplus-Schultz分析またはJameson-Wolf分析、あるいは免疫原性に基づく方法が挙げられる）を使用して予想および/または同定され得る。例として、ヒトPSCAの疎水性プロットおよびChou-Fasmanプロットは、それぞれ、図4および5に提供される。そのような残基を含むフラグメントは、サブユニット特異的抗PSCA抗体の産生またはPSCAに結合する細胞因子の同定において特に有用である。

30

40

## 【0028】

本発明のPSCAタンパク質は、以下に挙げられる使用を含む、種々の目的に対して有用であり得るが、これらの使用に限定されない：前立腺癌の診断および/または予後のマーカーとして、抗体の産生を誘導するための能力の診断および/または予後のマーカーとして、ならびに以下にさらに記載されるような種々の治療的物理療法に対する標的として。PSCAタンパク質はまた、PSCAに結合するリガンドおよび他の因子を同定および単離するために使用され得る。正常な前立腺において、PSCAは、基底細胞のサブセットにもっぱら発現し、これは、PSCAが、基底上皮内の特定の細胞系に関してマーカーとして使用され得ることを示唆する。さらに、本出願者らの結果は、基底細胞のこのセットが、悪性形質転換の標的を表すことを示唆する。従って、例えば、形質転換の原因であ

50

る分子因子を除去または調節するように設計された治療的な戦略は、P S C A 細胞表面タンパク質を介して細胞のこの集団を特異的に指向し得る。

【0029】

(P S C A 抗体)

本発明はさらに、P S C A に結合する抗体 (例えば、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) を提供する。最も好ましい抗体は、選択的に P S C A へ結合し、そして非 P S C A タンパク質に結合しない (またはより弱く結合する)。特に意図された抗 P S C A 抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体ならびにそれらのフラグメント (例えば、組換えタンパク質) を含み、このフラグメントは、抗原結合ドメインおよび / またはこれらの抗体の 1 つ以上の補体決定領域を含む。これらの抗体は、任意の供給源 (例えば、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、マウス、およびヒト) 由来であり得る。

10

【0030】

1 つの実施形態において、この P S C A 抗体は、例えば、初代病巣および前立腺癌骨転移由来の前立腺癌細胞の細胞表面上の P S C A タンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する。他の実施形態において、この P S C A 抗体は、P S C A タンパク質または前駆体の他のドメインに特異的に結合する。当業者によって理解されるように、抗体が指向する P S C A タンパク質の領域またはエピトープは、意図された適用により変化し得る。例えば、生存可能な前立腺癌細胞上の膜結合 P S C A の検出のためのイムノアッセイにおける使用を意図される抗体は、膜結合 P S C A 上の到達可能なエピトープに指向されるべきである。そのような抗体の例は、以下の実施例に記載される。他のエピトープを認識する抗体は、損傷した細胞または瀕死の細胞中の P S C A の同定のため、分泌された P S C A タンパク質またはそのフラグメントの検出のために有用であり得る。本発明はまた、P S C A タンパク質を特異的に認識する抗体フラグメントを含む。本明細書中で使用される場合、抗体フラグメントとは、その標的に結合する免疫グロブリン分子の可変領域の少なくとも部分 (すなわち、抗原結合領域) であるとして定義される。免疫グロブリンの定常領域のいくつかは、含まれ得る。

20

【0031】

例えば、アンドロゲン依存性およびアンドロゲン非依存性の前立腺癌細胞の両方における P S C A の過剰発現、および P S C A の細胞表面位置は、スクリーニングアッセイ、診断アッセイ、予後アッセイおよび追跡 (follow-up) アッセイおよび画像化方法のための優れたマーカーの特徴を示す。さらに、これらの特徴は、P S C A が、標的抗体療法、免疫療法、および遺伝子療法のような治療方法のための優れた標的であり得ることを示す。

30

【0032】

本発明の P S C A 抗体は、前立腺癌の治療技術における診断アッセイ、画像化方法論、および治療的方法において、特に有用であり得る。本発明は、P S C A タンパク質の検出および前立腺癌の診断に有用な、種々の免疫学的アッセイを提供する。そのようなアッセイは、一般的に、P S C A タンパク質を認識し結合し得る 1 つ以上の P S C A 抗体を含み、そして以下に挙げられる当該分野で周知の種々の免疫学的アッセイ形式を含むが、これらに限定されない: 種々の型の沈降、凝集、補体結合、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合免疫測定法 (ELISA)、酵素結合免疫蛍光測定法 (ELIFA) (H. L. i u ら、Cancer Research 58: 4055 - 4060 (1998))、免疫組織化学的分析など。さらに、前立腺癌を検出し得る免疫学的画像化方法もまた、本発明によって提供され、標識した P S C A 抗体を用いた放射性シンチグラフィ (radio scintigraphy) 画像化方法を含むがこれに限定されない。このようなアッセイは、前立腺癌の検出、モニタリングおよび予後において、臨床的に有用であり得る。

40

【0033】

1 つの実施形態において、P S C A 抗体およびそのフラグメント (例えば、F v、F a

50

b'、F(ab')<sub>2</sub>は、前立腺癌、膀胱癌腫、前立腺癌の骨転移、PIN、またはPSCAタンパク質を発現する基底上皮細胞の存在を検出することに使用される。種々の生物学的サンプル（血清、前立腺および他の組織生検標本、骨のような他の組織、尿などが挙げられる）中の、そのようなPSCA陽性（+）細胞の存在は、PSCA抗体を用いて検出され得る。さらに、PSCA抗体は、インジウム-111（または他の同位体）結合抗体を用いた免疫シンチグラフィのような、種々の画像化方法論において使用され得る。例えば、In-111結合抗PSMA抗体を用いる最近記載されたプロトコールに類似した画像化プロトコールを、再発性および転移性の前立腺癌腫の検出に使用し得る（Sodeeら、1997、Clin Nucl Med 21:759-766）。例えば、SPMAのような前立腺癌の他のマーカーに関連して、PSCAは、アンドロゲン非依存性の前立腺癌細胞の標的化のために特に有用であり得る。PSCA抗体はまた、PSCA機能を阻害するために治療的に使用され得る。

#### 【0034】

PSCA抗体はまた、PSCAタンパク質およびペプチドの精製のための方法ならびにPSCAホモログおよび関連する分子の単離のための方法において使用され得る。例えば、1つの実施形態において、PSCAタンパク質を精製する方法は、以下の工程を包含する：固体マトリックス結合したPSCA抗体を、PSCAを含む溶解物または他の溶液とともに、そのPSCA抗体がPSCAに結合することを可能にする条件下でインキュベートする工程；不純物を除去するために固体マトリックスを洗浄する工程；そしてそのPSCAを結合した抗体から溶出する工程。さらに、PSCA抗体は、細胞ソーティング（sorting）および精製技術を用いてPSCA陽性細胞を単離するために使用され得る。前立腺腫瘍細胞上のPSCA（単独または他の細胞表面マーカーとの組み合わせ）の存在は、ヒト前立腺癌細胞を他の細胞から区別し、そして単離するために使用され得る。特に、PSCA抗体は、抗体に基づく細胞ソーティングまたはアフィニティー精製技術を使用して異種移植腫瘍組織、培養中の細胞などから前立腺癌細胞を単離するために使用され得る。本発明のPSCA抗体の他の使用は、PSCAタンパク質を模倣する抗イディオタイプ抗体の産生を含み、例えば、モノクローナル抗イディオタイプ抗体は、1G8、2A2、2H9、3C5、3E6、3G3および4A10のような本発明の任意のモノクローナル抗体上のイディオタイプと反応性である。

#### 【0035】

多量の比較的に純粋なヒトPSCA陽性前立腺癌細胞（これは、組織培養において増殖し得るかまたは動物モデル（例えば、SCIDマウスまたは他の免疫不全マウス）における異種移植腫瘍として増殖し得る）を産生する能力は、多くの利点を提供し、例えば、前立腺癌細胞の比較的均質な集団の増殖または他の表現型特徴に対する種々の導入遺伝子または候補治療的化合物の評価を可能にすることが挙げられる。さらに、本発明の特徴はまた、種々の分子操作のために十分な量の、ヒトPSCA陽性前立腺癌特異的核酸の非常に濃縮した調製物の単離を可能にする。例えば、多量なそのような核酸調製物は、前立腺癌疾患の進行に生物学的に関連した珍しい遺伝子の同定を補助する。

#### 【0036】

本発明のこの局面の別の価値がある適用は、局所的に進行した疾患または転移性の疾患を有する個体患者からクローン化した生存可能なPSCA陽性前立腺癌細胞の比較的に純粋な調製物を単離し、分析しそしてそれをも用いて実験する能力である。このようにして、例えば、個々の患者の前立腺癌細胞は、制限された生検サンプルから増殖され得、次いで、潜在的に混乱させる混入している細胞という変数を伴わずに、診断および予後の遺伝子、タンパク質、染色体異常、遺伝子発現プロファイル、または他の関連する遺伝型および表現型の特徴の存在について試験される。さらに、そのような細胞は、動物モデルにおいて、新生物の攻撃性および転移能力について評価され得る。同様に、患者特異的な前立腺癌ワクチンおよび細胞性免疫治療剤が、そのような細胞調製物から作製され得る。

#### 【0037】

抗体の調製についての種々の方法が当該分野で周知である。例えば、抗体は、単離形態または免疫結合体形態で P S C A タンパク質、ペプチド、またはフラグメントを用いて適切な哺乳動物宿主に免疫されることによって調製され得る (Harlow、Antibodies、Cold

Spring Harbor Press、NY (1989))。さらに、P S C A の融合タンパク質 (例えば、はまた、P S C A G S T 融合タンパク質) もまた、使用され得る。P S C A を発現または過剰発現する細胞 P S C A もまた、免疫のために使用され得る。同様に、P S C A を発現するように操作された任意の細胞が、使用され得る。この戦略は、内因性 P S C A を認識する能力が増強されたモノクローナル抗体の産生をもたらし得る。例えば、実施例 5 に記載の標準技術および標準のハイブリドーマプロトコール (Harlow および Lane、1988、Antibodies : A

Laboratory Manual、(Cold Spring Harbor Press)) を使用することによって、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが生成された。このハイブリドーマは、1 G 8 (ATCC 番号 HB - 12612)、2 A 2 (ATCC 番号 HB - 12613)、2 H 9 (ATCC 番号 HB - 12614)、3 C 5 (ATCC 番号 HB - 12616)、3 E 6 (ATCC 番号

HB - 12618)、および 3 G 3 (ATCC 番号 HB - 12615)、4 A 1 0 (ATCC 番号 HB - 12617) と呼ばれる。これらの抗体は、1998 年 12 月 11 日、American

Type Culture Collection (ATCC)、12301 Parklawn Drive、Rockville、MD 20852 に寄託された。

#### 【0038】

本発明のキメラ抗体は、ヒト部分および非ヒト部分を含む、免疫グロブリン分子である。キメラ抗体の抗原結合領域 (可変領域) は、非ヒト供給源 (例えば、マウス) に由来し得、そしてその免疫グロブリンに生物学的エフェクター機能を与えるキメラ抗体の定常領域は、ヒト供給源由来であり得る。このキメラ抗体は、非ヒト抗体分子の抗原結合特異性およびこのヒト抗体分子により付与されるエフェクター機能を有するはずである。

#### 【0039】

一般的に、キメラ抗体を産生するために使用される手順は、以下の工程を含み得る：  
a) 抗体分子の抗原結合部分をコードする正確な遺伝子セグメントの同定およびクローニング；この遺伝子セグメント (重鎖について V D J 領域 (可変領域、多様性 (diversity) 領域および接合 (joining) 領域) または軽鎖について V J 領域 (可変領域、接合領域) として公知であるか、または単に V 領域または可変領域として公知) は、c D N A 形態またはゲノム形態のいずれかであり得る；

b) 定常領域またはその所望される部分をコードする遺伝子セグメントのクローニング；  
c) 完全なキメラ抗体が転写され得かつ翻訳され得る型でコードするように可変領域を定常領域と連結；

d) この構築物を、選択可能なマーカー、ならびにプロモーター、エンハンサーおよびポリ (A) 付加シグナルのような遺伝子制御領域を含む、ベクター中に連結；

e) 細菌中でこの構築物の増幅；

f) 真核生物細胞 (最も頻繁には、哺乳動物リンパ球) へのこの D N A の導入 (トランスフェクション)；

g) 選択可能なマーカーを発現する細胞の選択；

h) 所望するキメラ抗体を発現する細胞についてのスクリーニング；および

k) 適切な結合特異性およびエフェクター機能についての抗体の試験。

#### 【0040】

幾つかの異なる抗原結合特異性の抗体が、キメラタンパク質を産生するためのこれらのプロトコールにより操作された [例えば、抗 T N P : Boulianne ら、Nature

10

20

30

40

50



312:643(1984);および抗腫瘍抗原:Sahaganら、J.Immunol.137:1066(1986)]。同様に、幾つかの異なるエフェクター機能が、この抗原結合領域をコードする配列に対する新規の配列を連結することによって達成された。これらの幾つかは酵素[Neubergerら、Nature 312:604(1984)]、別の種由来の免疫グロブリンの定常領域、および別の免疫グロブリン鎖の定常領域[Sharonら、Nature 309:364(1984);Tanら、J.Immunol.135:3565-3567(1985)]を含む。さらに、抗体分子を改変するため、および遺伝子改変を目標とするための相同組換えを用いたキメラ抗体分子の産生についての手順は、記載されている(Fellら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:8507-8511(1989))。

#### 【0041】

これらの抗体は、例えば、前立腺癌細胞の細胞表面上のPSCAに結合し得、これによって、PSCAの細胞表面位置が確認される。これらのmAbが、細胞表面の外側のエピトープを認識するので、これらのmAbは、前立腺癌の診断および治療のための有用性を有する。例えば、これらのmAbは、転移性の疾患の部位を位置付けるために使用された(実施例6)。別の可能性は、mAbが、単独あるいは放射性同位体または他の毒素と結合されて使用される際、前立腺癌細胞を治療学的に標的化するために(例えば、全身的に)使用され得ることである。

#### 【0042】

PSCA mAbは、細胞表面を斑点状の様式で染色し(実施例5参照)、これは、PSCAが、細胞表面の特定の領域に局在し得ることを示唆する。GPIに固着されたタンパク質は、細胞表面の界面活性剤不溶性の糖脂質に富んだマイクロドメイン(DIGS)において密集することが公知である。小胞およびスフィンゴ脂質(shingolipid)-コレステロールラフを含むこれらのマイクロドメインは、シグナル伝達および分子輸送において重要な役割を果たすと考えられている。PSCAの相同体であるThy-1は以前、脂質-マイクロドメインにおける相互作用を介してsrcキナーゼへシグナルを伝達することが示された。本発明者らの研究室における細胞下分画実験は、DIGS中のPSCAの存在を確認する。

#### 【0043】

さらに、本発明のいくつかの抗体は、内部移行する抗体であり、すなわち、この抗体は、結合の際または結合の後に、細胞内へ内部移行する。さらに、いくつかの抗体は、PSCA陽性癌細胞の増殖の阻害を誘導する。

#### 【0044】

例えば、前立腺癌の検体におけるこれらの抗体の特徴は、PSCAタンパク質が、正常細胞と比較して前立腺癌において過剰発現していること、そしてこの発現が、前立腺癌の進行および転移の間にアップレギュレートされるようであることを示す。これらの抗体は、PSCA生物学および機能研究、ならびにPSCA関連癌(例えば、ヒト前立腺癌、前立腺癌の骨への転移、および膀胱癌腫)のインビボ標的化において有用である。

#### 【0045】

本明細書中に示されるPSCAのアミノ酸配列は、抗体を産生するためのPSCAタンパク質の特異的領域を選択するために使用され得る。例えば、このPSCAアミノ酸配列の親水性および疎水性の分析は、PSCAの構造における疎水性領域を同定するために使用され得る。免疫原性構造を示すPSCAタンパク質の領域ならびに他の領域およびドメインは、当該分野で公知の種々の他の方法(例えば、Chou-Fasman分析、Garnier-Robson分析、Kyte-Doolittle分析、Eisenberg分析、Karpplus-Schultz分析またはJameson-Wolf分析)を用いて容易に同定され得る。これらの残基を含むフラグメントは、特定のクラスの抗PSCA抗体の産生に特に適する。特に有用なフラグメントには、配列TARIRAVGLLTVISK(配列番号:9)およびSLNCVDDSQDYVVGK(配列番号:11

10

20

30

40

50

）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0046】

以下の実施例2に記載されるように、ウサギポリクローナル抗体を、合成ペプチドとして調製した前者のフラグメントに対して産生し、そしてPSCA-グルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパク質を用いたアフィニティー精製をした。この抗体によるPSCAの認識は、PSCAを用いてトランスフェクトした293T細胞の抽出液およびGST-PSCA融合タンパク質の、イムノブロット分析および免疫沈降分析によって確立した。この抗体はまた、PSCAでトランスフェクトされた293T細胞およびLAPC-4細胞におけるPSCAの細胞表面発現を、蛍光細胞分析分離装置(FACS)を用いて同定した。

10

【0047】

さらに、ヒツジのポリクローナル抗体を、合成ペプチドとして調製した後者のフラグメントに対して産生し、そしてペプチドAffi-ゲルカラムを用いてアフィニティー精製した(実施例2の方法にもよる)。この抗体によるPSCAの認識は、PSCAを用いてトランスフェクトしたLNCaP細胞の抽出液のイムノブロット分析および免疫沈降分析によって確立された。この抗体はまた、蛍光細胞分析分離装置(FACS)および免疫組織化学的分析を用いて、PSCAでトランスフェクトされたLNCaP細胞におけるPSCAの細胞表面の発現を同定した。

【0048】

免疫原としての使用のためのタンパク質を調製するための方法、およびキャリア(例えば、BSA、KLH、または他のキャリアタンパク質)とのタンパク質の免疫原性結合体を調製するための方法は、当該分野で周知である。いくつかの状況において、例えば、カルボジイミド試薬の使用による直接的な結合が、使用され得、他の場合において、Pierce Chemical Co.、Rockford、ILによって供給されるような結合試薬は、効果的であり得る。PSCA免疫原の投与は、当該分野で一般的に理解されるように、適切な期間に渡って、適切なアジュバントの使用と共に、注射によって一般的に行なわれる。免疫スケジュールの間、抗体の力価が、抗体形成の適切さを決定するために得られ得る。

20

【0049】

この方法で産生されるポリクローナル抗血清は、いくつかの適用にとって十分であり得るが、薬学的組成物については、モノクローナル抗体調製物が好ましい。所望するモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株は、一般的に公知であるように、KohlerおよびMilsteinの標準的な方法、またはリンパ球細胞および脾細胞の不死化をもたらす改変形を使用して調製され得る。所望する抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原がPSCAタンパク質またはPSCAフラグメントであるイムノアッセイによってスクリーニングされる。所望の抗体を分泌する適切な不死化細胞培養物が同定された場合、その細胞は、インビトロで培養され得るか、または腹水中の産生により培養され得るかのいずれかである。

30

【0050】

次いで、所望のモノクローナル抗体は、培養上清または腹水上清から回収される。免疫学的に重要な部分(すなわち、PSCAを認識し、そして結合する部分)を含む本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗血清のフラグメント(例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fvフラグメント、融合タンパク質)は、アンタゴニストならびにインタクト抗体として使用され得る。PSCAに対して指向されるヒト化抗体もまた有用である。本明細書中で使用されるように、ヒト化PSCA抗体は、PSCAと結合可能であり、そして実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するFR領域および実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するCDRまたはPSCAを結合するように操作された配列を含む免疫グロブリン分子である。

40

【0051】

50

免疫学的反応性フラグメント（例えば、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、または F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント）の使用が、特に治療的状况においてしばしば好ましい。なぜなら、これらのフラグメントは、免疫グロブリン全体よりも、一般的に免疫性ではないからである。本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体または抗イディオタイプモノクローナル抗体を有する薬学的組成物を提供する。

【0052】

細胞表面 P S C A と結合可能であるモノクローナル抗体 ( M A b ) の産生は、実施例 5 において記載されている。これらの M A b のエピトープマッピングは、これらが P S C A タンパク質上の異なるエピトープを認識することを示す。たとえば、一方は、カルボキシ末端領域内のエピトープを認識し、そして他方は、アミノ末端領域内のエピトープを認識する。このような P S C A 抗体は、それらの異なるエピトープ結合特性を与えられたサンドウィッチ形式 ( s a n d w i c h - f o r m a t t e d ) E L I S A において使用するために特に十分適切であり得る。

10

【0053】

この抗体またはフラグメントはまた、現在の技術を利用して、組換え手法により産生され得る。P S C A タンパク質の所望の領域に特異的に結合する領域もまた、多様な種起源のキメラ抗体または C D R 移植抗体の状況において産生され得る。本発明は、モノクローナル抗体、標的抗原に対して本発明の任意のモノクローナルの免疫特異的結合を競合的に阻害する抗原結合領域を含む。さらに、本発明は、本発明の任意のモノクローナル抗体の抗原結合領域を含む組換えタンパク質を提供する。

20

【0054】

本発明の抗体またはそのフラグメントは、検出マーカーを用いて標識され得るか、または第 2 の分子（例えば、それによって免疫結合体を生じる治療剤（例えば、細胞毒因子））と結合体化され得る。例えば、この治療剤としては、抗腫瘍薬物、毒素、放射性因子、サイトカイン、二次抗体または酵素が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、本発明は、実施形態を提供し、ここで本発明の抗体は、プロドラッグを細胞毒薬物に変換する酵素と連結される。

【0055】

免疫結合体は、P S C A 陽性細胞に対してこの第 2 の分子を標的とするために使用され得る ( V i t e t t a , E . S . ら、1993、Immunotoxin therapy , i n D e V i t a , J r . , V . T . ら編、Cancer : Principles and Practice of Oncology、第 4 版、J . B . L i p p i n c o t t C o . , P h i l a d e l p h i a , 2 6 2 4 - 2 6 3 6 ) 。

30

【0056】

細胞毒因子の例としては、リシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、エチジウムブロマイド、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド ( t e n o p o s i d e ) 、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン D、ジフテリア毒素、P s e u d o m o n a s 体外毒素 ( P E ) A、P E 40、アブリン、およびグルココルチコイドならびに他の化学療法剤、ならびに放射性同位元素が挙げられるがこれらに限定されない。適切な検出マーカーとしては、放射性放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0057】

さらに、本発明の任意のモノクローナル抗体の抗原結合領域を含む本発明の組換えタンパク質は、癌を処置するために使用され得る。このような状況において、組換えタンパク質の抗原結合領域は、治療的活性を有する第 2 のタンパク質の少なくとも機能的に活性な部分と結合される。この第 2 のタンパク質としては、酵素、リンホカイン、オンコスタチンまたは毒素が挙げられるがこれに限定されない。適切な毒素としては、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、エチジウムブロマイド、マイトマイシン、エトポシド、

50

テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシンD、ジフテリア毒素、Pseudomonas 体外毒素 (PE) A、PE 40、リシン、アブリン、グルココルチコイドおよび放射性同位元素が挙げられる。

#### 【0058】

抗体に対して、治療剤を結合体化または結合するための技術は、周知である (例えば、Amonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting

Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら、(編)、243 - 56 頁 (Alan

R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery (第2版)、Robinsonら、(編)、623 - 53 頁 (Marcel

Dekker, Inc. 1987); Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical

Applications、Pincheraら、(編)、475 - 506 頁 (1985); および Thorpeら、「The Preparation And Cytotoxic

Properties Of Antibody - Toxin Conjugates」、Immunol. Rev., 62: 119 - 58 (1982) を参照のこと)。治療剤としての PSCA 抗体の使用は、以下の小節「PROSTATE

CANCER IMMUNOTHERAPY」においてさらに記載される。

#### 【0059】

(PSCA をコードする核酸分子)

本発明の別の局面は、PSCA タンパク質およびそのフラグメントをコードする種々の核酸分子を、好ましくは単離された形態において (DNA、RNA、DNA/RNA ハイブリッド、および関連分子、PSCA をコードする配列に相補的な核酸分子またはその一部、ならびに PSCA 遺伝子または PSCA コード核酸とハイブリダイズするものを含む) 提供する。特に好ましい核酸分子は、本明細書中で開示されるヒト DNA 配列またはマウス DNA 配列と実質的に同一のヌクレオチド配列または相補的なヌクレオチド配列を有する。ゲノム DNA、cDNA、リボザイム、およびアンチセンス分子、ならびに天然供給源由来であろうと合成由来であろうと、代替の骨格に基づいた核酸または代替の塩基を含む核酸が、特に意図される。

#### 【0060】

例えば、アンチセンス分子は、RNA、または塩基対依存様式 (base pair - dependent manner) において DNA もしくは RNA と特異的に結合する他の分子 (ペプチド核酸 (PNA) または非核酸分子誘導体 (例えば、ホスホロチオエート) を含む) であり得る。当業者は、本明細書中に記載されている PSCA 配列を使用して、これらのクラスの核酸分子を容易に獲得し得る。便宜上、PSCA コード核酸分子は、本明細書中で、PSCA コード核酸分子、PSCA 遺伝子または PSCA 配列といわれる。

#### 【0061】

ヒト PSCA の 1 つの対立遺伝子形態をコードする cDNA のヌクレオチド配列は、図 1A において提供される。マウス PSCA ホモログをコードする cDNA のヌクレオチド配列 (「マウス PSCA」) は、図 2 において提供される。ヒト PSCA およびマウス PSCA のゲノムクローンはまた、実施例 4 において記載されるように単離された。ヒトゲノムクローンおよびマウスゲノムクローンの両方が、PSCA 遺伝子の翻訳領域および 3

5'非翻訳領域をコードする3つのエキソンを含む。5'非翻訳領域をコードする4番目のエキソンが、L y - 6 遺伝子ファミリーおよびT h y - 1 遺伝子ファミリーの他のメンバーに対するP S C Aの相同性に基づいて存在するために推定される(図8)。

#### 【0062】

ヒトP S C A遺伝子は、染色体8 q 2 4 . 2に位置する。ヒト幹細胞抗原2 ( R I G - E )、ならびに1つの他の最近同定されたヒトL y - 6 ホモログ ( E 4 8 ) もまた、この領域に局在し、関連遺伝子の大きなファミリーが、この遺伝子座に存在し得ることを示唆する ( B r a k e n h o f f ら、1995、前出; M a o ら、1996、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A

93:5910-5914)。興味深いことに、染色体8 q は、進行した前立腺癌および再発した前立腺癌の大部分において、対立遺伝子の増加および対立遺伝子の増幅の領域であることが報告されている ( C h e r ら、1994、G e n e s

C h r o m . C a n c e r 11:153-162)。c - m y c は、染色体8 q 2 4 のP S C Aの近位に局在し、そしてc - m y cの過剰コピー(対立遺伝子の増加または対立遺伝子の増幅のいずれかを介して)が、初期前立腺腫瘍の68%および転移の96%において見出された ( J e n k i n s ら、1997、C a n c e r R e s . 57:524-531)。

#### 【0063】

本発明のP S C Aコード核酸分子の実施形態は、プライマー(これは、本発明の核酸分子またはその任意の特異的部分の特異的な増幅を可能にする)、および本発明の核酸分子またはその任意の部分と選択的にまたは特異的にハイブリダイズするプローブを含む。この核酸プローブは、検出マーカを用いて標識され得る。検出マーカの例としては、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が挙げられるがこれらに限定されない。このような標識プローブは、P S C Aタンパク質を発現している細胞を診断するための手段としてP S C Aタンパク質の存在を診断するために使用され得る。DNAプローブおよびRNAプローブを生成するための技術は、周知である。

#### 【0064】

本明細書中で使用されるように、核酸分子は、この核酸分子がP S C A以外のポリペプチドをコードする夾雑核酸分子から実質的に分離される場合、「単離される」と言われる。当業者は、単離されたP S C Aコード核酸分子を獲得するために核酸単離手順を容易に用い得る。

#### 【0065】

本発明は、本発明のP S C Aコード核酸分子のフラグメントをさらに提供する。本明細書中で使用されるように、P S C Aコード核酸分子のフラグメントは、P S C Aコード配列全体の小さい部分をいう。このフラグメントの大きさは、その意図された使用により決定される。

#### 【0066】

例えば、このフラグメントが、P S C Aタンパク質の活性部分(活性ドメイン、エフェクター結合部位またはG P I結合ドメインのような)をコードするように選択される場合、このフラグメントは、P S C Aタンパク質の機能的領域をコードするのに十分に大きいことが必要とされる。このフラグメントが核酸プローブまたはP C Rプライマーとして使用される場合、このフラグメントの長さは、プローブ化/プライマー化の間に比較的少数の疑陽性物を獲得するように選択される。

#### 【0067】

選択的ハイブリダイゼーションプローブまたはP C Rプライマーとして特に有用であるヒトP S C Aのフラグメントは、当該分野で公知の方法を使用してP S C A配列全体から容易に同定され得る。R T - P C R分析のために有用であるP C Rプライマーの1つのセットは、5'プライマー - T G C T T G C C C T G T T G A T G G C A G - (配列番号: 12) および3'プライマー - C C A G A G C A G C A G G C C G A G T G C A - (配列

10

20

30

40

50

番号：13)を包含する。

【0068】

(他のPSCAコード核酸分子を単離するための方法)

本明細書中で記載されるPSCAコード核酸分子は、PSCAホモログ、あるいはPSCAタンパク質のスライスされた同位体、対立遺伝子改変体、および変異体形態、ならびにそれらのコード配列および遺伝子配列の単離を可能にする。PSCAホモログの最も好ましい供給源は、哺乳動物生物である。

【0069】

例えば、本明細書中に記載されるPSCAコード配列の部分が、合成され得、そしてヒト以外の生物、本明細書中に記載されるヒトPSCAタンパク質の対立遺伝子改変体、およびPSCA遺伝子を含むゲノム配列由来のPSCAファミリーのタンパク質の1つのメンバーをコードするDNAを回収するためのプローブとして使用され得る。およそ18~20ヌクレオチドを含むオリゴマー(約6~7アミノ酸ストレッチ(stretch))をコードする)が、ストリンジェントな条件または過度のレベルの擬陽性物を除去するために十分にストリジェンシーな条件下で、ハイブリダイゼーションを獲得するためのゲノムDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーをスクリーニングするために調製され、そして使用される。特定の実施形態において、ヒトPSCAをコードするcDNAが、本明細書中の実施例3に記載されるように、マウスPSCAホモログをコードする全長cDNAを単離するために、使用された。マウスクローンは、ヒトPSCAに対して70%のアミノ酸同一性を有するタンパク質をコードする。

10

20

【0070】

さらに、ヒトPSCAタンパク質のアミノ酸配列は、細胞から調製される発現ライブラリーをスクリーニングするための抗体プローブを生成するために使用され得る。典型的に、哺乳動物(例えば、精製されたタンパク質(以下に記載されるような))を用いて免疫化されたウサギ)由来のポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体が、PSCAホモログのための適切なコード配列を獲得するために、標的生物から調製された発現ライブラリーをプローブ化するために使用され得る。クローニングされたcDNA配列が、融合タンパク質として発現され得るか、それ自身の制御配列を使用して直接発現され得るか、またはその酵素の発現のために使用される特定の宿主に対して適切な、制御配列を使用して発現カセットを構築することにより発現され得る。

30

【0071】

PSCA遺伝子を含むゲノムクローンが、当業者に周知の分子クローニング方法を使用して、獲得され得る。1つの実施形態において、PSCA遺伝子のエキソン1~4を含むおよそ14kbのヒトゲノムクローンが、本明細書中の実施例4でより完全に記載されるように、ヒトPSCA

cDNAプローブを用いたファージライブラリーをスクリーニングすることにより獲得された。別の実施形態において、マウスPSCA遺伝子を含むおよそ10kbのゲノムクローンが、マウスPSCA

cDNA(実施例4にもまた記載される)を用いたマウスBAC(バクテリア人工染色体)ライブラリーをスクリーニングすることにより獲得された。

40

【0072】

さらに、対のオリゴヌクレオチドプライマーが、PSCAコード核酸分子またはそのフラグメントを選択的に増幅/クローニングするために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)における使用のために調製され得る。このようなPCRプライマーを使用するためのPCRの変性/アニーリング/伸長サイクルは、当業者に周知であり、そして、他のPSCAコード核酸分子を単離する際の使用のために容易に適用され得る。プローブとしてまたはプライマーとしての使用のために特に十分に適切なヒトPSCA遺伝子の領域は、容易に同定され得る。

【0073】

PSCAの非ヒトホモログ、PSCAの天然に存在する対立遺伝子改変体、およびゲノ

50

ム P S C A 配列は、本明細書中に記載されるヒト P S C A 配列と高度な相同性を共有する。一般に、このような核酸分子は、ストリンジェントな条件下でヒト P S C A 配列にハイブリダイズする。このような配列は、代表的に、ヒト P S C A 配列に対して少なくとも 70 % の相同性、好ましくは少なくとも 80 % の相同性、最も好ましくは少なくとも 90 % の相同性を含む。

【 0 0 7 4 】

ストリンジェントな条件は、( 1 ) 洗浄のために低イオン強度および高温を用いる ( 例  
えば、50 で 0 . 0 1 5 M

N a C l / 0 . 0 0 1 5 M 硝酸ナトリウム / 0 . 1 % S D S )、または ( 2 ) ハイブリ  
ダイゼーションの間、ホルムアミドのような変性剤 ( 例えば、42 で、0 . 1 % ウシ血清  
アルブミン / 0 . 1 % F i c o l l / 0 . 1 % ポリビニルピロリドン / 7 5 0 m M N a  
C l、7 5 m M クエン酸ナトリウムを含有する p H 6 . 5 の 5 0 m M リン酸ナトリウム緩  
衝液を含有する、50 % ( v o l / v o l ) ホルムアミド ) を用いる条件である。

【 0 0 7 5 】

別の例は、42 で、50 % ホルムアミド、5 x S S C ( 0 . 7 5 M  
N a C l、0 . 0 7 5 M クエン酸ナトリウム )、50 m M リン酸ナトリウム ( p H 6 . 8  
)、0 . 1 % ピロリン酸ナトリウム、5 x デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子 D  
N A ( 5 0 μ g / m l )、0 . 1 % S D S、および 10 % 硫酸デキストラン ( 42 で、  
0 . 2 x S S C および 0 . 1 % S D S 中において洗浄 ) の使用である。当業者は、明瞭か  
つ検出可能なハイブリダイゼーションシグナルを獲得するために適切な、ストリンジェン  
シー条件を容易に決定し得、そして変更し得る。

【 0 0 7 6 】

( P S C A コード核酸を含む組換え D N A 分子 )

本明細書中に記載されるような P S C A コード配列またはそのフラグメントを含む組  
換え D N A 分子 ( r D N A ) もまた提供される。本明細書中において使用されるように、r  
D N A 分子は、インビトロの分子操作に供された D N A 分子である。r D N A 分子を生成  
するための方法は、当該分野において周知であり、例えば、S a m b r o o k ら、M o l  
e c u l a r

C l o n i n g ( 1 9 8 9 ) を参照のこと。本発明の好ましい r D N A 分子において、P  
S C A タンパク質または P S C A のフラグメントをコードする P S C A コード D N A 配列  
は、1 つ以上の発現制御配列および / またはベクター配列と作動可能に連結される。r D  
N A 分子は、P S C A タンパク質全体をコードし得るかまたは P S C A タンパク質のフラ  
グメントをコードし得るかのいずれかである。

【 0 0 7 7 】

P S C A コード配列が作動可能に連結されるベクター配列および / または発現制御配列  
の選択は、当該分野において周知のように、所望される機能的特性 ( 例えば、タンパク質  
発現、および形質転換されるべき宿主細胞 ) に直接的に依存する。本発明により意図され  
るベクターは、少なくとも複製または宿主染色体への挿入を指向することが可能であり、  
そして好ましくは r D N A 分子に含まれる P S C A コード配列の発現もまた可能である。

【 0 0 7 8 】

作動可能に連結されるタンパク質コード配列の発現を調節するために使用される発現制  
御エレメントは、当該分野において公知であり、そして誘導プロモーター、構成性プロモ  
ーター、分泌シグナル、エンハンサー、転写ターミネーターおよび他の調節エレメントが  
挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、容易に制御される誘導プロモーター ( 例  
えば、宿主細胞培地における栄養素に応答性である ) が、使用される。

【 0 0 7 9 】

1 つの実施形態において、P S C A コード核酸分子を含むベクターは、それを用いて形  
質転換される原核生物レプリコン ( すなわち、原核生物宿主細胞 ( 例えば、細菌宿主細胞  
) において、染色体内に自律的複製および組換え D N A 分子の維持を指向する能力を有す  
る D N A 配列 ) を含む。このようなレプリコンは、当該分野において周知である、さらに

10

20

30

40

50

、原核生物レプリコンを含むベクターはまた、発現が薬物耐性のような検出マーカーを付与する遺伝子を含み得る。代表的な細菌性薬物耐性遺伝子は、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与する遺伝子である。

#### 【0080】

原核生物レプリコンを含むベクターは、細菌宿主細胞（例えば、*E. coli*）におけるPSCAコード配列の発現（転写および翻訳）を指向し得る原核生物プロモーターまたはウイルスプロモーターをさらに含み得る。プロモーターは、起こるべきRNAポリメラーゼの結合および転写を可能にするDNA配列により形成される発現制御エレメントである。細菌宿主と適合性のプロモーター配列は、代表的に、本発明のDNAセグメントの挿入のための都合の良い制限部位を含むプラスミドベクターにおいて提供される。当業者に周知である種々のウイルスベクター（例えば、多くの周知のレトロウイルスベクター）もまた使用され得る。

10

#### 【0081】

真核生物細胞に適合性の発現ベクター、好ましくは脊椎動物細胞に適合性のある発現ベクターはまた、PSCAコード配列を含むrDNA分子を改変するために用いられ得る。真核生物細胞発現ベクターは、当該分野で周知であり、そしていくつかの商業的な供給源から入手可能である。代表的に、そのようなベクターは、所望のDNAセグメントの挿入に関して都合のよい制限部位を含んで、供給される。このようなベクターの代表は、PSVLおよびpKSV-10（Pharmacia）、pBPV-1/pML2d（International Biotechnologies, Inc.）、pTDTI（ATCC, #31255）、本明細書中に記載されるベクターpCDM8、および真核発現ベクターのようなベクターである。

20

#### 【0082】

本発明のrDNA分子を構築するために使用される真核細胞発現ベクターは、真核細胞において効果的である選択マーカー、好ましくは薬物耐性選択マーカーをさらに含み得る。好ましい薬物耐性マーカーは、遺伝子であり、その発現は、ネオマイシン耐性（すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（neo）遺伝子）を生じる（Southern、J

Mol Anal Genet（1982）1：327-341）。あるいは、選択マーカーは、別のプラスミド上に存在し得、その2つのベクターは、宿主細胞の同時トランスフェクションにより導入され、そして選択マーカーに対して適切な薬物の存在下で培養することにより選択される。

30

#### 【0083】

本発明の実施に従い、ベクターは、上記で議論されたcDNA分子をコードしているプラスミド、コスミドまたはファージベクターであり得る。さらに、本発明は、適切な真核宿主細胞中にトランスフェクトされるプラスミド、コスミド、またはファージベクターを含む宿主ベクター系を供給する。適切な真核宿主細胞の例は、酵母細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞のような動物細胞を含む。適切な細胞の例は、LnCaP、LAPC-4、および他の前立腺癌細胞株を含む。この宿主ベクター系は、PSCAタンパク質の産生のために有用である。あるいは、宿主細胞は、細菌細胞のような真核細胞であり得る。

40

#### 【0084】

（形質転換された宿主細胞）

本発明は、PSCAタンパク質またはそのフラグメントをコードしている核酸分子で形質転換された宿主細胞をさらに供給する。この宿主細胞は、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかであり得る。PSCAタンパク質の発現に有用である真核細胞は、細胞株が、細胞培養方法に対して適合性があり、そして発現ベクターの増殖およびPSCA遺伝子の発現に適合性のある限り、限定されない。好ましい真核細胞宿主細胞は、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒト繊維芽細胞株に由来するような脊椎動物細胞を含むが、これらに限定されない。LnCaP、LAPC-4

50



細胞株のような前立腺癌細胞株もまた、使用され得る。任意の原核宿主が、使用され、P S C Aをコードしているr D N A分子を発現し得る。好ましい原核宿主は、E . c o l iである。

#### 【0085】

本発明のr D N A分子を用いる、適切な細胞宿主の形質転換は、使用したベクターの型および利用された宿主系に代表的に依存した周知の方法により達成される。原核宿主細胞の形質転換に関しては、エレクトロポレーションおよび塩処理方法が、代表的に使用される(例えば、C o h e n ら、P r o c A c a d S c i U S A ( 1 9 7 2 ) 6 9 : 2 1 1 0 ; およびM a n i a t i s ら、M o l e c u l a r C l o n i n g , 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 L a b o r a t o r y , C o l e S p r i n g H a r b o r , N Y ( 1 9 8 2 ) を参照のこと)。r D N Aを含むベクターを用いる脊椎動物細胞の形質転換に関しては、エレクトロポレーション、陽イオン性脂質または塩処理方法が代表的に利用される(例えば、G r a h a m ら、V i r o l ( 1 9 7 3 ) 5 2 : 4 5 6 ; W i g l e r ら、P r o c N a t u l A c a d S c i U S A ( 1 9 7 9 ) 7 6 : 1 3 7 3 - 7 6 を参照のこと)。

10

#### 【0086】

首尾よく形質転換された細胞、すなわち本発明のr D N A分子を含む細胞は、周知の技術により同定され得る。例えば、本発明のr D N Aの導入から生じる細胞は、クローニングされ、単一のコロニーを産生し得る。それらのコロニー由来の細胞は、回収され得、溶解され得、そしてそれらのD N A成分は、S o u t h e r n , J M o l B i o l ( 1 9 7 5 ) 9 8 : 5 0 3、もしくはB e r e n t ら、B i o t e c h ( 1 9 8 5 ) 3 : 2 0 8により記載されるような方法、または免疫学的方法を介してアッセイされる細胞から産生されるタンパク質を使用して、r D N Aの存在について実験され得る。

20

#### 【0087】

( P S C A タンパク質を産生する組換え方法 )

本発明は、本明細書中に記載されるP S C Aをコードしている核酸分子の1つを使用してP S C Aタンパク質を産生するための方法をさらに提供する。大まかに言えば、組換え型P S C Aタンパク質の生成は、代表的に以下の工程を含み得る( M a n i a t i s、前出)。

30

#### 【0088】

第一に、図1 Aに示される核酸分子のような、P S C Aタンパク質またはそれらのフラグメントをコードする核酸分子が、得られる。次いで、P S C Aをコードしている核酸分子は、上記のように、適切な制御配列と共に作動可能に連結して好ましくは、配置され、P S C Aコード配列を含む発現ユニットを産生する。この発現ユニットは、適切な宿主を形質転換するために用いられ、そして形質転換された宿主は、P S C Aタンパク質の産生を可能にする条件下で培養される。必要に応じて、そのP S C Aタンパク質は、培地から、または細胞から単離され；いくつかの不純物が許容され得るいくつかの場合は、このタンパク質の回収および精製は不必要であり得る。

40

#### 【0089】

前述の工程の各々は、種々の方法で行われ得る。例えば、所望のコード配列は、ゲノムフラグメントから得られ得、そして適切な宿主において直接的に使用され得る。種々の宿主において作動可能である発現ベクターの構築は、レプリコンおよび制御配列の適切な組み合わせを使用して達成される。この制御配列、発現ベクター、および形質転換方法は、遺伝子を発現するために用いられる宿主細胞の型に依存しており、そして以前に詳細に議論された。適切な制限部位は、通常的には入手不可能な場合、切除可能な遺伝子を供給してこれらのベクター中へ挿入するために、コード配列の末端に付加され得る。当業者は、P S C Aタンパク質を産生するP S C Aコード配列を用いる用途のために、当該分野で公

50

知の任意の宿主 / 発現系を容易に適合させ得る。

【 0 0 9 0 】

( P S C A リガンドおよび他の結合剤を同定するためのアッセイ )

本発明の別の局面は、P S C A に結合する P S C A リガンドおよび他の因子ならびに細胞成分を、検出および同定するために使用され得るアッセイおよび方法に関する。具体的に、P S C A に結合する P S C A リガンドもしくは他の因子または細胞成分は、P S C A に結合する P S C A リガンドおよび他の因子ならびに細胞成分の能力、ならびに / または P S C A 活性を阻害 / 刺激する能力により同定され得る。P S C A タンパク質を使用する P S C A 活性 (例えば、結合) のためのアッセイは、高処理能スクリーニング方法における使用に関して適切である。

10

【 0 0 9 1 】

1 つの実施形態では、このアッセイは、P S C A を試験剤または細胞の抽出物と混合する工程を包含する。この因子または抽出物の成分と P S C A の結合を可能にする条件下での混合後、その混合物は、分析され、因子 / 成分が P S C A に結合するか否かを検出する。因子 / 成分の結合は、P S C A に対して結合する能力として同定される。あるいはまたは継続して、P S C A 活性は、P S C A 活性のアゴニストおよびアンタゴニストを同定するための手段として、直接的に評価され得る。

【 0 0 9 2 】

あるいは、P S C A タンパク質に結合する標的は、酵母ツーハイブリッド系 ( F i e l d s , S . および S o n g , O . ( 1 9 8 9 ) 、 N a t u r e 3 4 0 : 2 4 5 - 2 4 6 ) を使用して、または結合 - 捕獲アッセイ ( H a r l o w 、前出 ) を使用して、同定され得る。酵母ツーハイブリッド系において、2 つのサブユニット転写因子の 1 つのサブユニットおよび P S C A タンパク質から作製される融合タンパク質をコードしている発現ユニットは、酵母細胞に導入され、そして発現される。この細胞は、( 1 ) その発現が、発現に関する 2 つのサブユニット転写因子を必要とする、検出可能なマーカーをコードしている発現ユニット、ならびに ( 2 ) 転写因子の第二のサブユニットおよび D N A のクローン化セグメントから作製される融合タンパク質をコードしている発現ユニット、を含むようにさらに改変される。D N A のクローン化されたセグメントが、P S C A タンパク質に結合するタンパク質をコードする場合、その発現は、P S C A およびそのコードされるタンパク質との相互作用を生じる。このことは、転写因子の 2 つのサブユニットを結合の近位へ誘導し、転写因子の再構築を可能にする。このことは、検出可能なマーカーの発現を生じる。酵母ツーハイブリッド系は、P S C A の、細胞の結合パートナーに関するセグメントをコードしている c D N A のライブラリーのスクリーニングにおいて、特に有用である。

20

30

【 0 0 9 3 】

上記アッセイにおいて使用され得る P S C A タンパク質は、単離された P S C A タンパク質、P S C A タンパク質のフラグメント、P S C A タンパク質を発現するために改変された細胞、または P S C A タンパク質を発現するために改変された細胞の画分を含むが、それらに限定されない。さらに P S C A タンパク質は、P S C A タンパク質の全体または P S C A タンパク質の限定されたフラグメントであり得る。P S C A タンパク質が、結合している因子について、例えば、分子量または活性におけるシフトによりアッセイされ得る限り、本アッセイは使用され得ることが当業者には明白である。

40

【 0 0 9 4 】

薬剤 / 細胞の成分が P S C A タンパク質に結合するか否かを同定するために使用されるこの方法は、使用される P S C A タンパク質の性質に主に基づく。例えば、ゲル遅延アッセイは、因子が P S C A またはそのフラグメントに結合するか否かを決定するために使用され得る。あるいは、免疫検出およびバイオチップ技術は、P S C A タンパク質を用いる用途に適合され得る。当業者は、特定の因子が P S C A タンパク質に結合するか否かを決定するための多くの当該分野で公知の技術を容易に利用し得る。

【 0 0 9 5 】

50

因子および細胞の成分は、無細胞アッセイ系または細胞アッセイ系を使用して、P S C A タンパク質の活性を調節する能力についてさらに試験され得る。P S C A タンパク質の活性がより限定的になる場合、同定される活性に基づく機能的アッセイが利用され得る。

【0096】

本明細書において使用されるように、薬剤がP S C A 活性を減少する場合、その薬剤は、P S C A 活性をアンタゴナイズするといわれる。好ましいアンタゴニストは、他の細胞性タンパク質のいずれにも影響せずに、選択的にP S C A をアンタゴナイズする。さらに、好ましいアンタゴニストは、P S C A 活性を50%を超えるまで、より好ましくは、90%を超えるまで、最も好ましくは全てのP S C A 活性を除去するまで減少させる。

【0097】

本明細書において使用されるように、薬剤がP S C A 活性を増加する場合、その薬剤は、P S C A 活性をアゴナイズするといわれる。好ましいアゴニストは、他の細胞性タンパク質のいずれにも影響せずに、選択的にP S C A をアゴナイズする。さらに、好ましいアンタゴニストは、P S C A 活性を50%を超えるまで、より好ましくは、90%を超えるまで、最も好ましくは二倍のP S C A 活性を超えるまで増加させる。

【0098】

上記の方法においてアッセイされる薬剤は、無作為に選択され得るか、あるいは合理的に選択または設計され得る。本明細書中で使用されるように、因子がP S C A タンパク質の特異的配列を考慮すること無しに無作為に選択される場合、この因子は、無作為に選択されると言われる。無作為に選択された因子の例は、化学的ライブラリーまたはペプチドコンビナトリアルライブラリーの使用、あるいは生物抽出物または植物抽出物の増殖培養物である。

【0099】

本明細書において使用されるように、因子が標的部位の配列および/あるいはその因子の作用と関連するそのコンフォメーションを考慮する非無作為な基準に基づいて選択される場合、この因子は、合理的に選択または設計されると言われる。因子は、P S C A タンパク質を構成するペプチド配列を利用することにより、合理的に選択、または合理的に設計され得る。例えば、合理的に選択されるペプチド剤は、アミノ酸配列がP S C A タンパク質のフラグメントに対して同一であるペプチドであり得る。

【0100】

実施例のように、本発明の方法において試験される因子は、ペプチド、小分子、およびビタミン誘導体、ならびに糖質であり得る。当業者は、本スクリーニング方法において使用される因子の構造的性質に関しては制限が存在しないことを容易に認識し得る。

【0101】

本発明の因子の1つのクラスは、そのアミノ酸配列がP S C A タンパク質のアミノ酸配列に基づいて選択されるペプチド剤である。小ペプチド剤は、P S C A タンパク質アセンブリの競合的インヒビターとして働き得る。

【0102】

ペプチド剤は、当該分野で公知のような標準の固相（または液相）ペプチド合成方法を使用して調製され得る。さらに、それらのペプチドをコードしているDNAは、市販のオリゴヌクレオチド合成機器を使用して合成され得、そして標準の組換え産生系を使用して組換え的に産生され得る。非遺伝子コードアミノ酸が含まれている場合、この固相ペプチド合成を使用した産物が、必要とされる。

【0103】

本発明の薬剤の別のクラスは、P S C A タンパク質の重要な位置に対して免疫反応性の抗体である。上記のように、抗体は、抗原性領域として、抗体により標的化されるように意図されるP S C A のそれらの部分を含むペプチドを用いた適した哺乳動物被検体の免疫化により得られる。重要な領域は、図15において同定されるドメインを含み得る。このような薬剤は、競合的結合研究において使用され得、第二世代の抑制性薬剤を同定する。

【0104】

本発明の方法において試験される細胞の抽出物は、例えば細胞または組織水性抽出物、細胞または組織の有機抽出物、あるいは部分的に精製された細胞画分であり得る。当業者は、本発明のスクリーニング方法において使用される細胞抽出物の供給源には制限がないことを容易に認識し得る。

【0105】

PSCA抗体のようなPSCAタンパク質に結合する因子は、PSCAの活性を調節するため、抗癌剤を適切な哺乳動物細胞に標的化するため、またはPSCAとの相互作用をブロックする因子を同定するために使用され得る。PSCAを発現する細胞は、PSCAに結合する因子を使用することにより標的化あるいは同定され得る。

【0106】

どのようにPSCA結合剤が使用されるかは、PSCA結合剤の性質に依存する。例えば、PSCA結合剤は、PSCA発現細胞にジフテリア毒素、コレラ毒素、リシンまたはシュードモナス外毒素のような複合毒物を送達するため；PSCA活性を調節するため；PSCA発現細胞を直接的に殺傷するため；または競合的結合剤を同定するためのスクリーニングにおいて使用され得る。例えば、PSCA阻害薬剤は、PSCA発現細胞の増殖を直接的に阻害するために使用され得、一方、PSCA結合剤は診断的薬剤として使用され得る。

【0107】

複数の本発明の診断的用途が存在する。例えば、本発明は、被検体（例えば、動物被検体またはヒト被検者）において、PSCAタンパク質の存在と関連する癌を診断するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、本発明の抗体の任意の1つまたは組み合わせを使用して、サンプル（例えば、細胞または生物学的液体サンプル）中のPSCAタンパク質の数を定量的に決定する工程を包含する。次いで、そうして決定されるその数は、正常な被検体由来のサンプル中の量と比較され得る。このサンプル中のはっきりと異なる量の存在（すなわち、その試験サンプル中のPSCAの数が正常なサンプル由来の数を超える）は、癌の存在を示す。試験サンプル中のPSCAの数が正常なサンプル由来の数を超える場合、PSCAは、細胞で過剰発現される。

【0108】

別の実施形態では、診断は、本発明の核酸を使用して、被検体由来のサンプルにおいてPSCAタンパク質をコードしているRNAの量を定量的に決定することを含む。そうして決定された量は、正常な被検体由来のサンプル中のRNAの量と比較され得る。ここでも、はっきりと異なる量の存在は、癌の存在を示す。

【0109】

さらに、本発明は、種々の時点で被検体由来のサンプルにおけるPSCAの量を測定することにより、被検体中のPSCAと関連する癌（例えば、前立腺癌）または障害の経過をモニタリングするための方法を提供する。このことは、サンプルにおけるPSCAの量の変化を決定する（例えば、その変化が量的に小さな変化であるかまたは大きな変化（すなわち、PSCAの過剰発現）であるかを決定する）目的で行われる。1つの実施形態では、この方法は、被検体由来の第一のサンプルにおいて、PSCAタンパク質の存在を定量的に決定する工程、およびそのように決定された量をその被検体由来の第二のサンプル中に存在する量と比較する工程を包含し、ここでそのようなサンプルは、異なる時点で取り出されており、その量における決定された差は癌の経過を示している。

【0110】

別の実施形態では、モニタリングは、被検体由来の第一のサンプルにおいてPSCAのRNAの存在を定量的に決定すること、およびそのように決定された量をその被検由来の第二のサンプル中に存在する量と比較することにより達成され、ここでそのようなサンプルは、異なる時点で取り出されており、その量における決定された差は癌（例えば、前立腺癌）の経過を示唆している。

【0111】

さらなる実施形態として、PSCAと関連する疾患または障害は、PSCA遺伝子コピ

10

20

30

40

50

一数における増加または増加した P S C A 遺伝子コピー数を検出することにより、サンプルにおいてモニタリングされ得る。P S C A 遺伝子コピー数における増加または増加した P S C A 遺伝子コピー数は、重要である。なぜならば、乏しい結果と関連し得るからである。

【 0 1 1 2 】

このサンプルは、動物またはヒト由来であり得る。さらに、このサンプルは、細胞のサンプルであり得る。例えば、本発明の方法を使用して、前立腺組織、膀胱組織、神経内分泌組織および骨（前立腺癌および膀胱癌が転移し得る任意の組織、例えば、結節、肺、肝臓、脾臓）は、癌または転移病巣の存在について評価され得る。あるいは、そのサンプルは、生物学的液体（例えば、尿、血清または血漿）であり得る。

10

【 0 1 1 3 】

本発明の実施に従って、検出は、組織学、プロットティング、E L I S A および E L I F A を含む免疫学的検出手段により達成され得る。サンプルが組織または細胞サンプルである場合、そのサンプルは、ホルマリン漬け、パラフィン包埋または凍結され得る。

【 0 1 1 4 】

本発明は、正常組織由来の組織切片における P S C A の量および分布と比較して、試験されるべき新生物形成組織由来の組織切片中の P S C A の量および分布における差異を決定する方法を、さらに提供する。1つの実施形態において、この方法は、試験されるべき組織と正常組織の両方を、P S C A との複合体を特異的に形成するモノクローナル抗体と接触させ、それによって、P S C A の量および分布における差異を検出する工程を包含する。

20

【 0 1 1 5 】

さらに、本発明は、被験体における新生物形成状態または前新生物状態を診断する方法を提供する。この方法は、組織のサンプルを被験体から得る工程、上記の方法の使用における、P S C A の量および分布の差異（このような新生物形成状態または前新生物状態を示している明瞭な測定可能な差異）を検出する工程を包含する。

【 0 1 1 6 】

本発明の実施に従って、抗体は、本発明のモノクローナル抗体のいずれかが指向するエピトープに対して指向され得る。さらに、組織切片は、膀胱、前立腺、骨または筋肉由来であり得る。

30

【 0 1 1 7 】

本発明はまた、生物学的な流体サンプル中の、P S C A の濃度を検出し、そして定量的に決定する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、モノクローナル抗体が固体支持体の表面に付着することを可能にする条件下で、P S C A と複合体を形成する（好ましくは、特異的に形成する）過剰の1つ以上のモノクローナル抗体と、固体支持体を接触させる工程を包含する。次いで、モノクローナル抗体が付着する得られた固体支持体が、生物学的な流体サンプルと接触され、その結果、生物学的な流体中の P S C A が抗体と結合し、そして P S C A - 抗体複合体を形成する。この複合体は、検出可能なマーカーで、直接的または間接的に標識され得る。あるいは、P S C A または抗体のいずれかが、複合体の形成前に標識され得る。次いで、この複合体が検出および定量的に決定され、それによって、生物学的な流体サンプル中の P S C A の濃度を検出および定量的に決定し得る。正常細胞と比較して、サンプル中の高濃度の P S C A は、新生物形成状態または前新生物状態を示す。

40

【 0 1 1 8 】

本発明の実施に従って、生物学的な流体は、組織抽出物、尿、血液、血清および痰を含むが、これらに限定されない。さらに、検出可能なマーカーは、酵素、ビオチン、蛍光団、発色団、重金属、常磁性同位体または放射性同位体を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 1 9 】

さらに、本発明は、P S C A を認識および結合する抗体（抗 P S C A 抗体）；ならびに検出可能な標識の結合体、ならびに抗 P S C A 抗体の特異的結合パートナーを含む診断キ

50

ットを提供する。本発明の実施に従って、標識は、酵素、放射性標識、発色団および蛍光剤を含むが、これらに限定されない。

#### 【0120】

(前立腺癌免疫療法)

PSCAタンパク質は、近傍の正常な腺と比較した場合に、多くの前立腺腫瘍において過剰発現されるので、PSCAタンパク質は、前立腺癌免疫療法の標的である。これらの免疫治療的方法としては、抗体治療、インビボワクチンおよびエキソビボ免疫治療アプローチの使用が挙げられる。

#### 【0121】

1つのアプローチにおいて、本発明は、前立腺癌を処置するために全身的に用いられ得るPSCA抗体を提供する。例えば、非結合体化PSCA抗体(モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびそのフラグメント(例えば、組換えタンパク質)を含む)が、患者に導入され得、その結果、相補体媒介性細胞溶解、抗体依存性細胞性細胞傷害性を含み得るメカニズム(PSCAの生理学的機能および/またはリガンド結合もしくはシグナル伝達経路の阻害を変化させること)によって、抗体が、前立腺癌細胞上のPSCAに結合し、そしてこのような細胞および腫瘍の増殖阻害(この破壊を含む)を媒介する。本発明の非結合体化PSCA抗体、そのフラグメントおよび組換えタンパク質に加えて、リシンのような毒物と結合体化されたPSCA抗体がまた、治療的に用いられ、毒物を、PSCAを保有する前立腺腫瘍細胞へ直接的に送達し得、それによって、腫瘍を破壊する。

10

20

#### 【0122】

PSCA抗体を用いた前立腺癌免疫療法は、結腸癌(Arlénら、1998、Crit Rev Immunol 18:133-138)、多発性骨髄腫(Ozakiら、1997、Blood 90:3179-3186; Tsunenariら、1997、Blood 90:2437-2444)、胃癌(Kasprzykら、1992、Cancer Res 52:2771-2776)、B細胞リンパ腫(Funakoshiら、1996、J Immunother Emphasis Tumor Immunol 19:93-101)、白血病(Zhongら、1996、Leuk Res 20:581-589)、結腸直腸癌(Mounら、1994、Cancer Res 54:6160-6166; Veldersら、1995、Cancer Res 55:4398-4403)および乳癌(Shepherdら、1991、J Clin Immunol 11:117-127)を含むが、これらに限定されない他の型の癌に関して、首尾よく利用されている種々のアプローチから生じた技術に従い得る。

30

#### 【0123】

例えば、臨床的に抗腫瘍モノクローナル抗体を適用するための1つの方法は、抗腫瘍活性(例えば、ADCC活性およびCDC活性)および/またはインビトロおよび/または動物モデルにおいて、内部移行化する能力を提示する、本発明のモノクローナル抗体を用いて、改変されない形態でその抗体を投与することである(例えば、Hellstromら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985)を参照のこと)。ADCC活性およびCDC活性を検出するために、モノクローナル抗体が、4時間のインキュベーション時間にわたり、培養された<sup>51</sup>Cr標識化腫瘍標的細胞の溶解について試験され得る。標的細胞は、<sup>51</sup>Crで標識され、次いで、エフェクター細胞(リンパ球分離培地の使用によって精製されたヒトリンパ球の形態で)と抗体との組み合わせに4時間曝露され得、これは例えば、0.1 μg/mlと10 μg/mlの間で変化する濃度で添加される。標的細胞からの<sup>51</sup>Crの放出が、腫瘍細胞溶解(細胞傷害)の証拠として測定される。コントロールは、標的細胞単独の、または別々にリンパ球もしくはモノクローナル抗体のいずれかとの標的細胞のインキュベーションを含む。放出され得る<sup>51</sup>Crの総量が測定され、そして単独でインキュ

40

50

ベートされる標的細胞と比較して、ADCCが、モノクローナル抗体およびエフェクター細胞を用いて観察される標的細胞のパーセント殺傷として算出される。CDCについての手順は、相補体の供給源としてのヒト血清（1：3から1：6に希釈された）が、エフェクター細胞の代わりに添加されることを除いて、ADCCを検出するために用いたものと同一である。

#### 【0124】

本発明は、PSCAタンパク質またはそのフラグメントを含むように処方されたワクチンを、さらに提供する。抗癌治療における使用についての、体液性免疫および細胞媒介性免疫を産生するためのワクチンにおける腫瘍抗原の使用は、当該分野で周知であり、そしてヒトPSMA免疫抗原および齧歯類PAP免疫抗原を用いた前立腺癌において、利用されている（Hodgersonら、1995、Int. J. Cancer 63：231-237；Fongら、1997、J. Immunol. 159：3113-3117）。このような方法は、PSCAタンパク質もしくはそのフラグメント、または、PSCA免疫原を発現および適切に提示し得るPSCAをコードする核酸分子および組換えベクターの利用によって容易に実施され得る。

10

#### 【0125】

例えば、ウイルス遺伝子の送達系が、PSCAをコードする核酸分子の送達に使用され得る。本発明のこの局面の実施において用いられ得る種々のウイルス遺伝子の送達システムとしては、ワクシニア、鶏痘、カナリア痘、アデノウイルス、インフルエンザ、ポリオウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルスおよびシンドビスウイルス（sindbis virus）が挙げられるが、これらに限定されない（Restifoら、1996、Curr. Opin. Immunol. 8：658-663）。非ウイルス性送達システムがまた、患者に導入された（例えば、筋肉内に）PSCAタンパク質またはそのフラグメントをコードする裸のDNAの使用によって利用され、抗腫瘍応答を誘導し得る。1つの実施形態において、全長のヒトPSCAcDNAが利用され得る。別の実施形態において、特定の細胞傷害性Tリンパ球（CTL）エピトープをコードするPSCA核酸分子が、利用され得る。CTLエピトープが、特定のアルゴリズム（例えば、Epimer, Brown University）を用いて決定され、特定化されたHLA対立遺伝子に最適に結合し得るPSCAタンパク質内のペプチドを同定し得る。

20

30

#### 【0126】

種々のエキソビボ戦略がまた、利用され得る。1つのアプローチは、樹状細胞の使用を含み、患者の免疫系に対してPSCA抗原を提示する。樹状細胞は、MHCクラスIおよびMHCクラスII、B7同時刺激因子（costimulator）ならびにIL-12を発現し、従って、高度に特定化された抗原提示細胞である。前立腺癌においては、前立腺特異的膜抗原（PSMA）のペプチドを用いてパルスされた自己樹状細胞が、第I相臨床試験において用いられ、前立腺癌患者の免疫系を刺激する（Tjoaら、1996、Prostate 28：65-69；Murphyら、1996、Prostate 29：371-380）。樹状細胞は、PSCAペプチドをMHCクラスI分子およびMHCクラスII分子の状況におけるT細胞に提示するために用いられ得る。1つの実施形態において、自己樹状細胞は、MHC分子と結合し得るPSCAペプチドを用いてパルスされる。別の実施形態において、樹状細胞は、完全なPSCAタンパク質を用いてパルスされる。さらに別の実施形態は、アデノウイルス（Arthurら、1997、Cancer Gene Ther. 4：17-25）、レトロウイルス（Hendersonら、1996、Cancer Res. 56：3763-3770）、レンチウイルス、アデノ関連ウイルス、DNAトランスフェクション（Ribasら、1997、Cancer Res. 57：2865-2869）および腫瘍誘導性RNAトランスフェクション（Ashleyら、1997、J. Exp. Med. 186：1177-1182）のような

40

50

、当該分野において公知の種々の実行 ( i m p l e m e n t i n g ) ベクターを用いた樹状細胞における P S C A 遺伝子の過剰発現を操作する工程を包含する。

【 0 1 2 7 】

抗イディオタイプ抗 P S C A 抗体はまた、P S C A タンパク質を発現する細胞に対する免疫応答を誘導するためのワクチンとして、抗癌治療において用いられ得る。特に、抗イディオタイプ抗体の産生は、当該分野で周知であり、そして、P S C A タンパク質上のエピトープを模倣する抗イディオタイプ抗 P S C A 抗体を産生するために、容易に適応され得る ( 例えば、W a g n e r ら、1 9 9 7、H y b r i d o m a 1 6 : 3 3 - 4 0 ; F o o n ら、1 9 9 5、J C l i n I n v e s t 9 6 : 3 3 4 - 3 4 2 ; H e r l y n ら、1 9 9 6、C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 4 3 : 6 5 - 7 6 を参照のこと)。このような抗イディオタイプ抗体は、腫瘍抗原に対して指向される他の抗イディオタイプ抗体を用いて現在実施される場合に、抗イディオタイプ治療において用いられ得る。

10

【 0 1 2 8 】

遺伝的免疫化方法は、P S C A を発現する癌細胞に対して指向される、予防的または治療的体液性免疫応答および細胞性免疫応答を産生するために、利用され得る。本明細書中で記載される P S C A をコードする D N A 分子を用いて、P S C A タンパク質 / 免疫原および適切な調節配列をコードする D N A を含む構築物が、個体の筋肉または皮膚に直接的に注入され得、その結果、筋肉または皮膚の細胞が、構築物を利用して、そしてコードされた P S C A タンパク質 / 免疫抗原を発現する。P S C A タンパク質 / 免疫抗原は、細胞表面タンパク質として発現され得るかまたは分泌され得る。P S C A タンパク質 / 免疫抗原の発現は、前立腺癌に対して、予防的または治療的な体液性免疫および細胞性免疫の産生を生じる。当該分野で公知の、種々の予防的および治療的な遺伝的免疫化技術が用いられ得る ( 概説については、インターネットアドレス [www . g e n w e b . c o m](http://www.genweb.com) で公表される情報および参考文献を参照のこと)。

20

【 0 1 2 9 】

本発明は、その細胞表面上の複数の P S C A 抗原を発現する細胞の細胞活性 ( 例えば、細胞増殖、細胞活性化または細胞繁殖 ) を阻害するための方法をさらに提供する。この方法は、本発明の免疫結合体 ( 例えば、異種混合物または同種混合物 ) を細胞と反応させ、その結果、細胞表面上の P S C A 抗原が、免疫結合体との複合体を形成する工程を包含する。細胞表面上の P S C A 抗原の数が増加する程、用いられ得る P S C A 抗体複合体の数も増加する。P S C A 抗体複合体の数が増加する程、阻害される細胞活性も増加する。細胞活性の阻害が細胞死を生じる場合、新生物形成状態または前新生物形成状態を有する被験体が、この方法に従って、処置され得る。

30

【 0 1 3 0 】

異種混合物は、異なるエピトープまたは同一のエピトープを認識する P S C A 抗体 ( 各々の抗体は、同一の治療薬剤または異なる治療薬剤と結合体化されている ) を含む。同種混合物は、同一のエピトープを認識する抗体 ( 各々の抗体は、同一の治療薬剤と結合体化される ) を含む。

【 0 1 3 1 】

本発明は、P S C A がそのリガンドと結合することをブロックすることによって、P S C A の生物学的活性を阻害するための方法をさらに提供する。この方法は、P S C A 免疫結合体または P S C A 抗体複合体を可能にする条件下で、ある量の P S C A を、本発明の抗体または免疫結合体と接触させ、それによって、P S C A がそのリガンドと結合することをブロックし、そして P S C A の活性を阻害する工程を包含する。

40

【 0 1 3 2 】

別の実施形態において、本発明は、本発明の免疫結合体のいずれか 1 つまたは組み合わせを、細胞を阻害するに十分な量における細胞と反応させることによって、P S C A 抗原を発現する細胞を選択的に阻害する方法を提供する。このような量は、細胞を殺傷する量、または細胞成長または細胞増殖を阻害するに十分な量を含む。すでに議論した通り、用

50



量および投薬レジメンは、PSCA、その集団、抗体が指向されるべき部位、特定の免疫毒素の特徴および患者に関連した処置されるべき疾患または障害の性質に依存する。例えば、免疫結合体の量は、0.1 ~ 10 mg / kg 患者体重の範囲であり得る。

#### 【0133】

(PSCAタンパク質ならびにPSCA遺伝子およびRNAを同定するための方法)

本発明は、PSCAタンパク質またはPSCA遺伝子を発現する、細胞、組織または器官を同定するための方法を提供する。このような方法は、インビボまたはインビトロでPSCAタンパク質を発現する、細胞または器官の存在を診断するために用いられ得る。本発明の方法は、特に、前立腺の病理学的状態を媒介する細胞の存在の決定において有用である。特に、PSCAタンパク質の存在は、PSCAタンパク質またはPSCAタンパク質をコードする核酸が発現されるか否かを決定することによって、同定され得る。PSCAタンパク質の発現は、PSCAタンパク質またはPSCA遺伝子を発現する、細胞、組織または器官の存在を診断するための手段として、用いられ得る。

10

#### 【0134】

種々の免疫学的および分子遺伝学的技術が、PSCAタンパク質が、特定の細胞またはサンプル中で発現/産生されるか否かを決定するために、用いられ得る。一般に、核酸分子を含む抽出物またはタンパク質を含む抽出物が調製される。次いで、抽出物は、PSCAタンパク質またはPSCAをコードする核酸分子が細胞中で産生されるか否かを決定するために、アッセイされる。

#### 【0135】

当該分野で周知の種々のポリヌクレオチドを基にした検出方法が、PSCAをコードする核酸分子の検出のため、および生物学的試料中のPSCA発現細胞の検出のために、利用され得る。例えば、RT-PCR法は、PSCAのmRNAまたはそのフラグメントを選択的に増幅するために用いられ得、そしてこのような方法は、後述の実施例1において記載されるように、PSCAを発現する細胞を同定するために、利用され得る。特定の実施形態において、RT-PCRは、微小転移性前立腺癌細胞または循環化前立腺癌細胞を検出するために用いられる。種々の他の増幅型検出方法(例えば、分枝DNA方法のような)およびDNAプローブまたはRNAプローブを用いた種々の周知のハイブリダイゼーションアッセイはまた、PSCAをコードするポリヌクレオチドまたはPSCA発現細胞の検出のために用いられ得る。

20

30

#### 【0136】

タンパク質の検出のための種々の方法は、当該分野で周知であり、そしてPSCAタンパク質およびPSCA発現細胞の検出のために利用され得る。タンパク質に基づいた診断試験を行うために、適切なタンパク質サンプルが得られ、そして従来技術を用いて調製される。タンパク質サンプルは、例えば、単にSDSとともにサンプルをボイルすることによって調製され得る。次いで、抽出されたタンパク質は、公知の方法を用いて、PSCAタンパク質の存在を決定するために分析され得る。例えば、特異的なサイズのタンパク質の改変体または特異的に荷電したタンパク質の改変体の存在は、電場における移動度を使用して同定され得る。あるいは、抗体は、検出の目的のために用いられ得る。当業者は、公知のタンパク質分析方法を容易に適応し、サンプルがPSCAタンパク質を含むか否かを決定し得る。

40

#### 【0137】

あるいは、PSCA発現はまた、PSCA遺伝子の発現のレベルを減少させる薬剤を同定するための方法において、用いられ得る。例えば、PSCAタンパク質を発現する、細胞または組織が、試験薬剤と接触され、PSCA発現における薬剤の効果を決定し得る。PSCA発現を活性化する薬剤は、PSCA活性のアゴニストとして用いられ得、一方、PSCA発現を減少させる薬剤は、PSCA活性のアンタゴニストとして用いられ得る。

#### 【0138】

(PSCAプロモーターおよび他の発現調節エレメント)

本発明は、発現ベクターおよびトランスジェニック動物を産生するために用いられ得る

50

形態において、新規に同定された P S C A 遺伝子の 5' を見出された、発現制御配列をさらに提供する。特に、P S C A プロモーター (P S C A 遺伝子における A T G 開始コドンから 5' であるとして容易に同定され得、そして D N A 配列をコードする作動可能に連結されたタンパク質の発現を指向するために用いられ得る) のような P S C A 発現制御エレメント。P S C A 発現が、前立腺細胞において主に発現されるため、発現制御エレメントは、組織特異的様式において誘導された導入遺伝子の発現の指向において、特に有用である。当業者は、当該分野で公知の方法を用いて、発現ベクターにおける、P S C A 遺伝子プロモーターおよび他の調節エレメントを容易に使用し得る。

#### 【0139】

真核生物細胞において、調節配列は、遺伝子のコード領域の上流、下流および内部で見出され得る。真核生物調節配列は、プロモーター配列、そして時折、少なくとも 1 つのエンハンサー配列を含む。代表的な真核生物遺伝子において、プロモーター配列は、遺伝子のコード領域に対して上流および近接して存在し、そして 1 方向に方向付けられて、遺伝子の発現を制御するはずである。代表的な真核生物遺伝子において、エンハンサー配列は、遺伝子のコード領域の上流、下流および内部にさえも存在し得、そして遺伝子の発現を増強するような方向または抑制するような方向のいずれかに向き得る。

#### 【0140】

本発明は P S C A コード領域の上流の 9 k b の配列を含む D N A フラグメントを提供する。この P S C A フラグメントが作動可能に連結された導入遺伝子の発現を駆動する能力は、細胞にトランスフェクトされた一連のキメラレポーター構築物を用いて試験された。そのキメラレポーター構築物は、ネイティブな内因性 P S C A と同様の発現パターンを示し、そしてその P S C A フラグメントは順配向で連結した場合に、導入遺伝子の発現を駆動する。従って、この P S C A フラグメントは、プロモーター様の活性を示す P S C A 上流の調節領域を含む。

#### 【0141】

P S C A 転写物はまた、前立腺腫瘍細胞中に有意に高いレベルで存在するが、良性の前立腺過形成中には存在しない。従って、P S C A 転写物は、前立腺優勢の様式において検出可能であり、そして前立腺腫瘍サンプルにおいてより高いレベルで検出可能である。有意により高いレベルの P S C A 転写物、または当該分野で公知のような過剰発現は、正常な前立腺における検出可能な P S C A 転写物の量の測定および、前立腺腫瘍サンプルとの比較によって決定され得る。この比較は、ノーザン分析および R T - P C R アッセイを含む、当該分野で周知の方法によって行われ得、そして転写物レベルにおける相異が定量され得る。従って、サンプルにおける測定可能な程に異なる量の P S C A 転写物 (すなわち、正常なサンプルからの P S C A 転写物の数を超える、試験サンプルにおける P S C A 転写物の数) の存在は、前立腺癌の存在を示すのに使用され得る。

#### 【0142】

P S C A の転写物およびタンパク質の蓄積のパターンは公知であり、そして P S C A 上流調節領域が単離され、そして特徴付けられた。導入遺伝子に作動可能に連結した P S C A 上流調節領域を含む一連のキメラ構築物が、試験された。その P S C A 上流調節領域は、種々の前立腺細胞および細胞株、ならびに膀胱において、導入遺伝子の発現を駆動し、そして腎臓においてより低い程度に駆動する。従って、P S C A 上流領域は、前立腺優勢な様式において導入遺伝子の発現を駆動する。

#### 【0143】

好ましい実施形態において、図 4 2 に示される様な、P S C A 遺伝子の 5' 上流領域由来の 9 k b、6 k b、3 k b、および 1 k b の D N A フラグメントが、本明細書で記載される技術によって産生された。9 k b の P S C A 上流領域 (p E G F P - P S C A) は、遺伝子調節活性に関係し、そして 1999 年 5 月 17 日に American Type Culture Collection (ATCC)、12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 に寄託され、そしてそこで、以下の ATCC 番号 P T A - 80 として同定される。この 9 k b のフラグメントは T7 プライ

10

20

30

40

50

マーおよび R I h P S C A 3 ' - 5 ( 5 ' - g g g a a t t c g c a c a g c c t t c a g g g t c - 3 ' ) ( 配列番号 : 1 6 ) を用いた増幅によって得られた。

【 0 1 4 4 】

( 遺伝子調節活性を有するフラグメントの使用 )

本発明は、罹患した前立腺癌の細胞 / 部位に対して、目的の遺伝子を標的化し、その結果、その遺伝子によりコードされたタンパク質が発現され得、それにより、疾患状態を直接または間接的に回復させるための方法 ( 例えば、遺伝子治療法 ) を提供する。

【 0 1 4 5 】

感受性の細胞が、前立腺腫瘍細胞において有意に増大した遺伝子発現活性を有する P S C A 上流領域の制御下で導入遺伝子 ( 例えば、治療遺伝子 ) を発現する発現ベクターと共に導入される。前立腺腫瘍細胞において優勢に治療遺伝子が発現する発現ベクターの使用は、前立腺腫瘍細胞のような標的細胞において治療遺伝子が発現させる。

10

【 0 1 4 6 】

感受性細胞を感染した後、導入遺伝子 ( 例えば、治療遺伝子 ) が、その導入遺伝子によってコードされたタンパク質を発現するベクターにおいて、増大した遺伝子発現活性を有する P S C A 上流領域によって駆動される。かなり特異的な前立腺特異的遺伝子ベクターの使用は、標的細胞 ( 例えば、前立腺癌細胞 ) における特定の遺伝子の選択的な発現を可能にする。

【 0 1 4 7 】

増大した遺伝子発現活性を有する P S C A 領域は、誘導体分子を産生するために、例えば配列の変異、欠失、および挿入によって改変され得る。改変は、前立腺細胞に特異的な調節タンパク質に結合し得る配列の数の増加、および遺伝子発現活性を有する P S C A 領域において機能しない配列の欠失を含む。他の改変は、エンハンサーの付加を含み、それによって、プロモーター活性を有する P S C A 領域の効率が改善される。エンハンサーは、位置独立的な様式において機能し得、そして、転写される領域の上流、内部または下流に位置し得る。

20

【 0 1 4 8 】

誘導体分子は、増大した遺伝子発現活性を有する P S C A 上流領域の機能特性を保持する。すなわち、このような置換を有する分子は、フラグメントの 3 ' に位置する目的の遺伝子の前立腺組織特異的な発現を、実質的に、なお可能にする。改変は、誘導体分子が、プロモーター活性のみを有する P S C A フラグメントと比較して、実質的に前立腺特異的な様式でその遺伝子発現を駆動する能力を保持している限り、許容される。

30

【 0 1 4 9 】

好ましい実施形態において、ベクターは、プロモーター活性を有する P S C A 上流領域の下流に異種配列 ( 治療遺伝子 ) を挿入することによって、構築された。

【 0 1 5 0 】

治療遺伝子の例には、自殺遺伝子 ( s u i c i d e g e n e ) が挙げられる。これらは、その発現によって、前立腺腫瘍細胞の増殖または前立腺腫瘍細胞の死を阻害するタンパク質または因子が産生される遺伝子配列である。自殺遺伝子には、酵素 ( 例えば、プロドラッグ酵素 ) をコードする遺伝子、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、毒素をコードする遺伝子、サイトカインをコードする遺伝子、またはオンコスタチンをコードする遺伝子が挙げられる。治療遺伝子の目的は、前立腺癌細胞の増殖を阻害するか、または前立腺癌細胞を殺傷すること、あるいはサイトカインまたは直接もしくは間接的に前立腺癌細胞の増殖を阻害するか、もしくは前立腺癌細胞を殺傷する他の細胞傷害性因子を産生することである。

40

【 0 1 5 1 】

適切なプロドラッグ酵素には、チミジンキナーゼ ( T K ) 、 E . C o l i 由来のキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ ( G P T ) 遺伝子、または E . C o l i のシトシンデアミナーゼ ( C D ) 、もしくはヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ ( H P R T ) が挙げられる。

【 0 1 5 2 】

50

適切な癌遺伝子および癌抑制遺伝子には、neu、EGF、ras (H ras、K ras、およびN rasを含む)、p53、網膜芽癌抑制遺伝子 (Rb)、ウィルムス腫瘍遺伝子産物、ホスホチロシンホスファターゼ (PTPase)、およびnm23が挙げられる。適切な毒素には、Pseudomonas 体外毒素AおよびS；ジフテリア毒素 (DT)；E. coli

LT毒素、Shiga毒素、Shiga様毒素 (SLT-1、-2)、リシン、アブリン、スポリン、およびゲロニン (gelonin) が挙げられる。

#### 【0153】

適切なサイトカインには、インターフェロン、GM-CSFインターロイキン、腫瘍壊死因子 (TNF) (Wong Gら、Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. Science

1985; 228: 810); WO9323034 (1993); Horisberger MAら、Cloning and sequence analyses of cDNAs

for interferon- and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: functional study of the corresponding gene promoter. Journal

of Virology, 1990年3月, 64(3): 1171-81; Li YPら、Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and IL-6, but not IL-1, down-regulate the osteocalcin gene promoter. Journal

of Immunology, 1992年2月1日, 148(3): 788-94; Pizarro TTら、Induction of TNF  $\alpha$  and TNF  $\beta$  gene expression in rat cardiac transplants during allograft rejection. Transplantation, 1993年8月, 56(2): 399-404) が挙げられる。(Breviario

Fら、Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. Journal of Biological Chemistry, 1992年11月5日, 267(31): 22190-7; Espinoza-Delgado

Iら、Regulation of IL-2 receptor subunit genes in human monocytes. Differential effects of IL-2 and IFN- $\gamma$ . Journal of Immunology, 1992年11月1日, 149(9): 2961-8; Algate PAら、Regulation

of the interleukin-3 (IL-3) receptor by IL-3 in the fetal liver-derived FL5.12 cell line. Blood, 1994年5月1日, 83(9): 2459-68; Cluitmans FHら、IL-4 down-regulates IL-2-, IL-3-, and

GM-CSF-induced cytokine gene expression in peripheral blood monocytes. Annals of

10

20

30

40

50

- Hematology, 1994年6月, 68(6):293-8; Lago, AS、IL-2, IL-4, and IFN-gamma gene expression versus secretion in superantigen-activated T cells. Distinct requirement for costimulatory signals through adhesion molecules. Journal of Immunology, 1994年2月15日, 152(4):1641-52; Martinez OM、IL-2 and IL-5 gene expression in response to alloantigen in liver allograft recipients and in vitro. Transplantation, 1993年5月, 55(5):1159-66; Pang G、GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. Clinical and Experimental Immunology, 1994年6月, 96(3):437-43; Ulich TR、Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. III. IL-6 mRNA and serum protein expression and the in vivo hematologic effects of IL-6. Journal of Immunology, 1991年4月1日, 146(7):2316-23; Mauviel A、Leukoregulin, a T cell-derived cytokine, induces IL-8 gene expression and secretion in human skin fibroblasts. Demonstration and secretion in human skin fibroblasts. Demonstration of enhanced NF-kappa B binding and NF-kappa B-driven promoter activity. Journal of Immunology, 1992年11月1日, 149(9):2969-76)。
- 【0154】  
 成長因子には、トランスフォーミング成長因子 - (TGF) および (TGF)、サイトカインコロニー刺激因子 (Shimane M、Molecular cloning and characterization of G-CSF induced gene cDNA. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994年2月28日, 199(1):26-32; Kay AB、Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. Journal of Experimental Medicine, 1991年3月1日, 173(3):775-8; de Wit H、Differential regulation of M-CSF and IL-6 gene expressio

n in monocytic cells. British Journal of Haematology, 1994年2月, 86(2): 259-64; Sprecher Eら、Detection of IL-1beta, TNF-alpha, and IL-6 gene transcription by the polymerase chain reaction in keratinocytes, Langerhans cells and peritoneal exudate cells during infection with herpes simplex virus-1. Archives of Virology, 1992, 126(1-4): 253-69)。

10

## 【0155】

本発明の方法における使用に適切なベクターは、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)のベクターを含むウイルス性ベクターである。

## 【0156】

好ましくは、選択されたウイルス性ベクターは、以下の基準を満たすべきである：1) そのベクターは、腫瘍細胞に感染し得なければならない；従って、適切な宿主範囲を有するウイルス性ベクターが選択されなければならない；2) 転移される遺伝子は、長期間細胞中で持続し得、そして発現され得るべきである；そして3) そのベクターは、宿主に対して安全であるべきであり、そして最少の細胞の形質転換を引き起こすべきである。レトロウイルスベクターおよびアデノウイルスは、哺乳動物細胞に、外来の遺伝子を効率的に導入し、そして発現する、効率的で有用な、そして現在では最もよく特徴付けられた手段を提供する。非常に広い宿主および細胞型の範囲を有するこれらのベクターは、遺伝子を安定に、かつ効率的に発現する。これらのベクターの安全性は、多くの研究グループによって証明された。実際、その多くが臨床試験にある。

20

## 【0157】

障害の補正のために細胞に遺伝子を転移するために使用され得る他のウイルスベクターには、モロニーマウス白血病ウイルス(MoMuLV)のようなレトロウイルス；JC、SV40、ポリオーマのようなパポバウイルス；エプスタイン-バーウイルス(EBV)；パピローマウイルス(例えば、ウシパピローマウイルスI型(BPV))；ワクシニアおよびポリオウイルスならびに他のヒトおよび動物のウイルスが挙げられる。

30

## 【0158】

アデノウイルスは、それ自身をクローニングビヒクルとして魅力的にするいくつかの特性を有する(Bachettiら、Transfer of gene for thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. PNAS USA, 1977 74: 1590; Berkner, K.L.: Development of adenovirus vectors for expression of heterologous genes. Biotechniques, 1988 6: 616; Ghosh-Choudhury Gら、Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. Gene 1986; 50: 161; Hag-Ahmand Yら、Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. J Virol 1986; 57: 257; Rosenfeld

40

Mら、Adenovirus-mediated transfer of a recombinant  $\alpha_1$ -antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. Science

50

1991; 252: 431)。

【0159】

例えば、アデノウイルスは、細胞核において複製する中間のサイズのゲノムを有し：多くの血清型が臨床的に無害であり；アデノウイルスゲノムは、外来の遺伝子を挿入するが、安定なようであり：外来の遺伝子は、欠失または再配列することなく維持されるようであり；そしてアデノウイルスは、4週間から数ヶ月までの発現期間を有する高いレベルの一過性発現ベクターとして使用され得る。広範な生化学および遺伝的研究は、ネイティブのアデノウイルス配列への7~7.5 kbまでの異種配列の置換によって、生存可能で、条件的な、ヘルパー独立性ベクターを作製可能であることを示唆する (Kaufman R. J. : identification of the component necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. PNAS USA, 1985 82: 689)。

10

【0160】

AAVは、約5 kbの一本鎖DNAゲノムを有する小さなヒトパルボウイルスである。このウイルスは、いくつかのヒト細胞型において、組込み型プロウイルスとして増殖され得る。AAVベクターは、ヒトの遺伝子治療にとっていくつかの利点を有する。例えば、AAVベクターはヒト細胞に対して栄養性であるが、他の哺乳動物細胞にもまた感染し得る；(2) ヒトまたは他の動物において、AAVに関連する疾患はない；(3) 組込まれたAAVゲノムは、その宿主細胞内で安定であるようである；(4) AAVの組込みが、宿主の遺伝子もしくはプロモーターの発現を変化させるか、またはその再配列を促進するという証拠がない；(5) 導入された遺伝子は、アデノウイルスのようなヘルパーウイルスの感染によって、宿主細胞から奪還され得る。

20

【0161】

HSV-1ベクター系は、非有糸細胞への実質的にいかなる遺伝子の導入をも容易にする (Gellerら、an efficient deletion mutant packaging system for a defective herpes simplex virus vectors: Potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. PNAS USA, 1990 87: 8950)。

30

【0162】

哺乳動物遺伝子の転移のための別のベクターは、ウシパピローマウイルスに基づくベクターである (Sarver 他、Bovine papillomavirus DNA: A novel eukaryotic cloning vector. Mol Cell Biol 1981; 1: 486)。

【0163】

ワクシニアおよび他のポックスウイルスに基づくベクターは、哺乳動物遺伝子転移系を提供する。ワクシニアウイルスは、120キロダルトン(kd)のゲノムサイズの巨大な二本鎖DNAウイルスである (Panicali 他、Construction of poxvirus as cloning vectors: Insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 4927; Smith 他、infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigens. Nature, 1983 302: 490)。

40

【0164】

レトロウイルスは、ウイルス遺伝子の宿主細胞への挿入のために設計されたパッケージである (Guild 他、Development of retrovirus

50

vectors useful for expressing genes in cultured murine embryonic cells and hematopoietic cells in vivo. J Virol 1988; 62: 795; Hock RAら、Retrovirus mediated transfer and expression of drug resistance genes in human hemopoietic progenitor cells. Nature 1986; 320: 275)。

#### 【0165】

基本的なレトロウイルスは、プロウイルスのタンパク質中にパッケージングされたRNAの2つの同一鎖からなる。そのコアはエンベロープと呼ばれる保護被膜によって囲まれ、そのエンベロープは、ウイルスによって寄与される糖タンパク質で改変される以外は、前の宿主の膜に由来する。

#### 【0166】

好ましくは、前立腺における細胞の欠損、疾患または損傷の処置にのために、本発明のベクターは、治療遺伝子または導入遺伝子（例えば、TKをコードする遺伝子）を含む。その遺伝的に改変ベクターは、欠損、疾患（例えば、前立腺癌をインビボで改善効果を有する内因性分子の産生を増大する治療遺伝子産物（単数または複数）の前立腺への導入によって）を処置するために前立腺に投与される。

#### 【0167】

本発明の方法のこの実施形態における基本的な課題は、目的の遺伝子の単離、遺伝子調節活性を有するフラグメントへの目的遺伝子の結合、目的の遺伝子を身体に送達するための適切なベクタービヒクルの選択、目的の遺伝子を有するベクターの身体への投与、および標的細胞への目的遺伝子の適切な発現の達成である。本発明は、クローン化された遺伝子（すなわち、目的の遺伝子）を、この遺伝子を必要とする患者の血流または関連する器官に直接注射され得るような様式でのパッケージングを提供する。そのパッケージングは、外来のDNAを、免疫系による排除から保護し、そしてそれを適切な組織または細胞へ指向させる。

#### 【0168】

ヒトまたは動物の目的の遺伝子と共に、別の遺伝子（例えば、選択可能マーカー）が挿入され得、改変されたレトロウイルスを取り込んだ細胞の同定が容易となる。遺伝子治療のプロセス上の重大な焦点は、新しい遺伝子が、標的細胞において、発現の十分な持続期間を有し、適切なレベルで発現されなければならないことである。

#### 【0169】

ベクターを改変するための、および前立腺にこのような改変されたベクターを投与するための以下に記載の方法は、単に例証の目的であり、そして使用され得る方法の典型である。しかし、他の手順もまた、当該分野で理解されるように使用され得る。

#### 【0170】

ベクターなどを構築するために使用される大部分の技術は、当該分野で広く実施されており、そして大部分の専門家は、特定の条件および手順を記載する標準的な供給源の試料に精通する。しかし、簡便のために、以下の段落が、ガイドラインとして役立ち得る。

#### 【0171】

（ベクター構築のための一般的方法）

所望の治療的遺伝子コード配列および制御配列を含む適切なベクターの構築は、当該分野で十分に理解されている、標準的連結および制限技術（Maniatisら、Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)を参照のこと）を使用する。単離されたプラスミド、DNA配列、または合成されたオリゴヌクレオチドを、所望の形態に切断し、改変し、そして再連結する。

10

20

30

40

50



## 【0172】

部位特異的なDNA切断を、当該分野で一般的に理解されている条件下で、適切な制限酵素を用いて処理すること、およびこれらの市販されている制限酵素の製造業者によって特定化される詳細により、実行する（例えば、New England Biolabs Product Catalogを参照のこと）。概して、約1  $\mu$ gのプラスミドまたはDNA配列を、約20  $\mu$ lの緩衝溶液中で1単位の酵素により切断する。代表的に、過剰の制限酵素は、DNA基質の完全な消化を保証するために使用される。

## 【0173】

約37°Cでの約1時間～2時間のインキュベーション時間は、実行可能であるが、変更を行い得る。各々のインキュベーションの後、タンパク質をフェノール/クロロホルムを用いた抽出により除去し、そして続いてエーテル抽出し得、そして核酸を、エタノールを用いた沈殿により水相から回収する。所望の場合、切断したフラグメントのサイズ分離を、標準的な技術を使用するポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル電気泳動によって実行し得る。サイズ分離の一般的記述は、Methods in Enzymology 65: 499 - 560 (1980) 中に見出される。

## 【0174】

制限切断されたフラグメントを、4種類のデオキシヌクレオチドトリホスフェート (dNTP) の存在下、50 mM Tris (pH 7.6)、50 mM NaCl、6 mM MgCl<sub>2</sub>、6 mM DTTおよび5～10  $\mu$ M dNTP中で20～25分、約15～25分のインキュベーション時間を用いて、E. coli DNAポリメラーゼI (Klenow)の大きなフラグメントを用いて処理することにより、平滑断端にし得る。このKlenowフラグメントは、4種類のdNTPが存在しても、5'粘着末端で充填するが、突出した3'一本鎖を消化する。所望される場合、選択的な修復を、粘着末端の性質により指示される制限内で、dNTPの一種類のみを提供することにより、または選択されたdNTPを用いて実行し得る。Klenowを用いた処置の後、この混合物をフェノール/クロロホルムを用いて抽出し、そしてエタノールを用いて沈殿する。S1ヌクレアーゼまたはBal-31を用いた適切な条件下での処理により、任意の一本鎖部分の加水分解が生じる。

## 【0175】

連結を、T4 DNAリガーゼを用いて、次の標準条件および温度の下で、10～15  $\mu$ lの容量において実行する。連結プロトコルは、標準である (D. Goeddel (編) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology (1991))。

## 【0176】

「ベクターフラグメント」を使用するベクター構築において、ベクターフラグメントを、5'ホスフェートを除去し、そしてベクターの再連結を妨害するために、一般的に、細菌アルカリホスファターゼ (BAP) または子ウシ腸アルカリホスファターゼ (CIP) を用いて処理する。あるいは、再連結を、好ましくないフラグメントのさらなる制限酵素消化により二重に消化されるベクターにおいて、妨害し得る。

## 【0177】

適切なベクターは、ウイルスベクター系 (例えば、ADV、RV、およびAAV (R. J. Kaufman 「Vectors used for expression in mammalian cells」 in Gene Expression Technology、D. V. Goeddel 編 (1991)) を含む。

## 【0178】

機能的DNA導入遺伝子を細胞へ挿入するための多くの方法は、当該分野で公知である。例えば、非ベクター的方法としては、細胞へのDNAの非ウイルス性物理的トランスフ

10

20

30

40

50

エクシジョンが挙げられ；例えば、マイクロインジェクション（DePamphilisら、BioTechnique 6:662-680(1988)）；リボソーム媒介トランスフェクション（Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417(1987), FelgnerおよびHolm、Focus 11:21-25(1989)およびFlegnerら、Proc. West. Pharmacol. Soc. 32:115-121(1989)）および当該分野で公知の他の方法。

#### 【0179】

（改変されたベクターの被験体への投与）

標的細胞へDNAを入れるための1つの方法は、膜結合された、サックまたはベジクル（例えば、スフェロプラストまたはリボソーム）の中へDNAを加えることであるか、またはリン酸カルシウム沈殿（CaPO<sub>4</sub>）による（Graham F. およびVan der Eb, A., Virology 52:4561973; Schaefer-Ridder

M. ら、Liposomes as gene carriers: Efficient transduction of mouse L cells by thymidine kinase gene. Science 1982; 215:166; Stavridis J C ら、Construction of transferrin-coated liposomes for in vivo transport of exogenous DNA to bone marrow erythroblasts in rabbits. Exp Cell Res 1986; 164:568-572)。

#### 【0180】

ベジクルを、その膜が標的細胞の外膜と融合するような方法において構築し得る。ベジクル中の本発明のベクターは、前立腺細胞の中へ向かわせ得る。

#### 【0181】

スフェロプラストは、ポリエチレングリコールのような融合剤（fusogen）を用いて哺乳動物標的細胞を通して融合され得るまで、高いイオン強度緩衝液中で保持される。

#### 【0182】

リボソームは、人工の脂質ベジクルである。ベジクルは、0.2～4.0 μmの範囲の大きさであり、そして高分子を含む緩衝水溶液の10%～40%を包括し得る。このリボソームは、ヌクレアーゼからDNAを保護し、そして標的細胞へのその導入を容易にする。トランスフェクションはまた、エレクトロポレーションを介して生じ得る。

#### 【0183】

投与の前に、改変されたベクターを、注入のために選択された濃度で完全なPBS中に懸濁する。PBSに加えて、任意の浸透圧的に均衡の取れた溶液（この溶液は、被験体に対して生理学的に適合する）を使用し、改変されたベクターを宿主へ懸濁そして注入し得る。

#### 【0184】

注入のために、細胞の懸濁液をシリンジの中へ引き上げ、麻酔したレシピエントへ投与する。多重注入をこの手順を用いて行い得る。ウイルス懸濁手順は、従って、遺伝子改変されたベクターを、前立腺における任意の予定された部位へ投与することを可能にし、比較的軽微な外傷性であり、同じウイルス懸濁液を用いる、いくつかの異なる部位または同じ部位における同時の多重投与を可能にする。多重注入は、治療的遺伝子の混合物からなり得る。

#### 【0185】

（改変されたベクターの使用）

本発明は、発現活性を有するフラグメントを用いる治療的遺伝子の発現を保持および増加するための方法を提供する。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 6 】

本発明の方法は、治療的遺伝子を保有する改変されたベクターが、被験体へ注入される実施形態によって例証される。

## 【 0 1 8 7 】

第1の実施形態において、宿主におけるタンパク質を産生するように本発明の宿主ベクター系を増殖させる工程、およびそのようにして産生されたタンパク質を回収する工程を包含するタンパク質生成物が、示される。この方法は、単細胞生物および多細胞生物の両方において目的の遺伝子の発現を可能にする。例えば、インビボのアッセイにおいて、目的の遺伝子（例えば、*r a s* 遺伝子）を含む本発明のベクターを有する前立腺細胞を、*r a s* 遺伝子産生に対して無制限のようにマイクロタイターウェルにおいて使用し得る。被験体由来のサンプルを、*r a s* 遺伝子に対して指向された抗体の存在を検出するようにこのウェルへ加える。このアッセイは、被験体の免疫系が、上昇したレベルの *r a s* に関する疾患と闘っているか否かの臨床的評価に対して、サンプル中の *r a s* 抗体の存在の定量的決定および定性的決定において、補助し得る。

10

## 【 0 1 8 8 】

第2の実施形態において、転移性の前立腺癌を、遺伝子治療、すなわち本発明の核酸分子の使用を通してインビボでの疾患表現型の補正を介して処置する。

## 【 0 1 8 9 】

本発明の実施に従って、遺伝子治療の被験体は、ヒト被験体、ウマ被験体、ブタ被験体、ウシ被験体、マウス被験体、イヌ被験体、ネコ被験体、またはトリ被験体であり得る。他の哺乳動物をまた、本発明において含む。

20

## 【 0 1 9 0 】

本発明の分子について投与および投与計画の最も有効な形態は、処置される前立腺腫瘍の正確な位置、癌の重症度および経過、処置に対する被験体の健康および応答、ならびに処置する内科医の判断による。従って、この分子の投与量を、個々の被験体に対して滴定すべきである。

## 【 0 1 9 1 】

この分子を、別の細胞（自系細胞が好ましいが、異種細胞は本発明の範囲内に包含される）を介して直接または間接的に送達し得る。

## 【 0 1 9 2 】

表面積の  $\text{mg} / \text{m}^2$  に基づく、種々の大きさおよび種の動物ならびにヒトに対する投与量の相互関係は、Freireich, E. J. & Cancer Chemother., Rep. 50 (4) : 219 - 244 (1966) によって記載される。投与計画における調節は、腫瘍細胞増殖を阻害または殺傷する応答を最適化するように作製され得、例えば、用量を毎日の基準に対して分割または投与し得るか、または用量を状況に依存して比例的に減少し得る（例えば、いくつかの分割された用量を、特異的な治療的状况に従って毎日投与するか、または比例的に減少し得る）。

30

## 【 0 1 9 3 】

処置を達成するために必要とされる本発明の分子の用量は、計画の最適化をとともしてさらに改変され得ることは明かである。

40

## 【 0 1 9 4 】

（トランスジェニック動物の産生）

本発明の別の局面は、PSCA 核酸を含むトランスジェニック非ヒト哺乳動物を提供する。例えば、1つの適用において、PSCA 欠失非ヒト動物を、PSCA ホモログを不活性化するように標準ノックアウト（knock-out）手順を用いて産生し得るか、またはこのような動物が生存不可能な場合、誘導性のPSCA ホモログアンチセンス分子を使用して、PSCA ホモログ活性/発現を調節し得る。あるいは、動物を、ヒトPSCA コード核酸分子またはPSCA タンパク質の発現もしくは組織特異的様式におけるアンチセンス分子を指向するアンチセンスPSCA の発現単位を含むように変え得る。このような使用において、PSCA ホモログ遺伝子の発現が、不活性化もしくは活性化によって変

50

化し、そして／またはヒト P S C A 遺伝子によって置換される、非ヒト哺乳動物（例えば、マウスまたはラット）を、產生する。このことを、標的化された組換えのような当該分野で公知の種々の手順を用いて達成し得る。一旦、產生されると、P S C A ホモログ欠失動物、組織特異的様式で P S C A を発現する動物（ヒトもしくはホモログ）、またはアンチセンス分子を発現する動物、を使用して（１）P S C A タンパク質によって媒介される生物学的プロセスおよび病理学的プロセスを同定し得、（２）P S C A タンパク質と相互作用するタンパク質および他の遺伝子を同定し得、（３）P S C A タンパク質の欠失を克服するように外因的に提供され得る薬剤を同定し得、そして（４）活性を増加または減少する P S C A 遺伝子の中の突然変異を同定するための適切なスクリーンとして役立ち得る。

10

#### 【 0 1 9 5 】

例えば、組織特異的様式で P S C A をコードするヒトミニ遺伝子（mini gene）を発現するトランスジェニックマウスを產生し得、そして通常は P S C A タンパク質を含まない、組織および細胞においてタンパク質の過剰発現の効果を試験し得る。このストラテジーは、他の遺伝子、すなわち b c l - 2（V e i s ら、C e l l 1 9 9 3 7 5 : 2 2 9）に対して首尾良く使用されてきた。このようなアプローチは、P S C A タンパク質／遺伝子へ容易に適用され得、そして特異的組織における P S C A タンパク質の潜在的に有益なまたは有害な効果の問題に取り組むために使用され得る。

#### 【 0 1 9 6 】

さらに、他の実施形態において、本発明は、癌遺伝子を含む、生殖細胞および体細胞を有するトランスジェニック動物を提供し、この癌遺伝子は、癌遺伝子に関する癌のプロモーションに対して上記マウスの組織における上記遺伝子の発現に対して有効な P S C A 上流領域へ連結され、それによってその癌のマウスモデルを產生する。

20

#### 【 0 1 9 7 】

（組成物）

本発明は、本発明の P S C A 核酸分子または P S C A タンパク質をコードするかもしくはそのフラグメントをコードする発現ベクター、および必要に応じて、適切なキャリアを含む薬学的組成物を提供する。本発明は、さらに、P S C A タンパク質を認識および結合する、抗体またはそのフラグメントを含む薬学的組成物を提供する。１つの実施形態において、抗体またはそのフラグメントは治療薬剤または細胞毒性薬剤へ結合または連結される。

30

#### 【 0 1 9 8 】

薬学的組成物についての適切なキャリアは、任意の物質を含み、本発明の核酸または他の分子と合わされる場合、この物質は、この分子の活性を保持し、そして被験体の免疫系に関して反応性でない。例は、リン酸緩衝化生理食塩水溶液、水、油／水エマルジョンのような乳濁液、および種々の型の湿潤剤のような任意の標準の薬学的キャリアを含むが、これらに限定されない。他のキャリアとしてはまた、無菌溶液、コーティングされた錠剤およびカプセル剤を含む錠剤が挙げられる。代表的に、このようなキャリアは、デンプン、牛乳、砂糖、ある型の粘土、ゼラチン、ステアリン酸またはその塩、ステアリン酸マグネシウムまたはステアリン酸カルシウム、滑石、植物性脂肪または植物性油、ゴム、グリコールあるいは他の公知の賦形剤を含む。このようなキャリアとしてはまた、香味添加剤および彩色添加剤または他の材料が挙げられ得る。このようなキャリアを含む組成物は、周知の慣習的な方法によって処方される。このような組成物はまた、例えばリボソームのような種々の脂質組成物およびポリマーミクロスフェアのような種々のポリマー組成物中に処方され得る。

40

#### 【 0 1 9 9 】

本発明はまた、P S C A 核酸分子を含む診断用組成物、本発明の核酸分子もしくはその任意の部分へ特異的にハイブリダイズするプローブ、または P S C A 抗体もしくはそのフラグメントを提供する。核酸分子、プローブまたは抗体もしくはそのフラグメントは、検出可能なマーカーで標識され得る。検出可能なマーカーの例としては、放射性同位体、蛍

50

光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、本発明は、RT-PCRのようなポリメラーゼ連鎖反応方法論を用いてPSCAコード配列を増幅し得るPSCA特異的プライマー対を含む診断用組成物を提供する。

#### 【0200】

(実施例)

(実施例1：新規前立腺細胞表面抗原(PSCA)の同定および分子的特性付け)

(材料および方法)

(LAPC-4異種移植片) LAPC-4異種移植片を、Kleinら、1997, Nature Med. 3: 402-408に記載のように産生した。

10

#### 【0201】

(RDA、ノーザン分析およびRT-PCR) アンドロゲン依存性LAPC-4腫瘍およびアンドロゲン非依存性LAPC-4腫瘍の代表的差的分析を、以前に記載(Braunら、1995, Mol. Cell. Biol. 15: 4623-4630)のように実行した。全RNAを、製造業者の説明書に従ってUltraspec(登録商標)RNA単離システム(Biotecx, Houston, TX)を用いて単離した。ノーザンフィルターを、コード配列およびPSCAの3'非翻訳配列の部分に相当する660bp RDAフラグメントまたはPSAの約400bpフラグメントを用いてプローブした。ヒト多重組織プロットを、Clontechから得、詳述されるようにプローブした。逆転写酵素(RT)-PCR分析について、第1鎖cDNAを、GeneAmp RNA PCRコアキット(Perkin Elmer-Roche, New Jersey)を用いて全RNAから合成した。ヒトPSCA転写物のRT-PCRについて、プライマー5'-tgcttgccctgttgatggcag-(配列番号:12)および3'プライマー-ccagagcagcaggccgagtgca-(配列番号:13)を、約320bpフラグメントを増幅するために使用した。熱サイクルを、95度で30秒間、60度で30秒間および72度で1分間の25~25サイクル、続いて72度で10分間の伸長によって実行した。GAPDH(Clontech)についてのプライマーを、コントロールとして使用した。マウスPSCAについて、使用したプライマーは、5'プライマー-ttcttcctgctggccaccctac-(配列番号:7)および3'プライマー-gcagctcatcccttcacaaat-(配列番号:8)であった。

20

30

#### 【0202】

(PSCA mRNAについてのインサイチュハイブリゼーションアッセイ) mRNAインサイチュハイブリゼーションのために、全長のPSCA遺伝子を含む組換えプラスミドpCRII(1μg, Invitrogen, San Diego, CA)を線状にし、センスジゴキシゲニンおよびアンチセンスジゴキシゲニン標識したリボプローブを産生した。インサイチュハイブリゼーションを、以前に記載(Magi-Galluzziら、1997, Lab. Invest. 76: 37-43)のように自動化した機器(Ventana Gen II, Ventana Medical Systems)上で実行した。前立腺標本を、約130標本にまで拡大された以前に記載されたデータベース(Magi-Galluzziら、前出)から得た。スライドを、盲目的な様式において、二人の病理学者によって読み取り、そして点数化した。0~3の点数を、陽性な細胞のパーセンテージ(0=0%; 1=<25%; 2=25~50%; 3=>50%)および染色の強度(0=0; 1=1+; 2=2+; 3=3+)に従って割り当てた。2つの点数を掛けて、0~9の全体の点数を所与した。

40

#### 【0203】

(結果)

(ヒトPSCA cDNA) 表象差異分析(RDA)(PCRに基づく差し引きハイブリダイゼーション技術)を、ヒト前立腺癌異種移植片(LAPC-4)のホルモン依存性改変体とホルモン非依存性改変体との間で、遺伝子発現を比較するため、およびアンドロゲ

50

ン - 非依存性 L A P C - 4 亜系統においてアップレギュレートされた c D N A を単離するために、使用した。複数の遺伝子を、クローニングし、配列決定し、そして示差的発現について調べた。一つの 6 6 0 b p フラグメント ( クローン番号 1 5 ) を同定し、このフラグメントは、正常の前立腺と比較した場合、異種移植片腫瘍において高度に過剰発現されることが見出された。正常な前立腺および異種移植片腫瘍における、このクローンの発現と P S A の発現との比較は、クローン番号 1 5 が、比較的癌特異的であることを示唆した ( 図 9 )。

#### 【 0 2 0 4 】

配列分析は、クローン番号 1 5 がデータベースで正確に適合するものを有さないが、幹細胞抗原 2 ( グリコシルホスファチジルイノシトール ( G P I ) - アンカー型細胞表面抗原の T h y - 1 / L y - 6 スーパーファミリーのメンバー ) と 3 0 % のヌクレオチド同一性を共有するということを明らかにした。クローン番号 1 5 は、1 2 3 アミノ酸のタンパク質をコードし、このタンパク質は、S C A - 2 ( R I G - E と呼ばれる ) と 3 0 % 同一であり、そして L y - 6 / T h y - 1 遺伝子ファミリーに特徴的な、多数の高度に保存されたシステイン残基を含む ( 図 3 )。G P I - アンカー型タンパク質のファミリーとのその同一性と一致して、クローン番号 1 5 は、アミノ末端疎水性シグナル配列、および小さなアミノ酸の群 ( G P I 結合についての切断 / 結合部位を規定する ) に続く疎水性アミノ酸のカルボキシ末端ストレッチの両方を含む ( U d e n f r i e n d および K o d u k u l a、1 9 9 5、A n n . R e v . B i o c h e m . 6 4 : 5 6 3 - 5 9 1 )。これはまた、四つの推定 N - グリコシル化部位も含む。幹細胞抗原 - 2 に対するその強い同一性のために、クローン番号 1 5 は、前立腺幹細胞抗原 ( P S C A ) と改名された。次いで、5 ' および 3 ' P C R R A C E 分析を、L A P C - 4 アンドロゲン非依存性異種移植片から得られた c D N A を使用して行い、そして全長 c D N A ヌクレオチド配列 ( コード領域および非翻訳領域を含む ) を得た。ヒト P S C A をコードする全長 c D N A のヌクレオチド配列は、図 1 A に示され、翻訳されたアミノ酸配列は図 1 B および図 3 に示される。

#### 【 0 2 0 5 】

( P S C A は前立腺細胞において発現される ) 正常ヒト組織中の P S C A m R N A の分布を、ノーザンブロット分析により調べた。その結果 ( 図 9 B に示される ) は、P S C A が前立腺において優性に発現され、胎盤においてはより低レベルの発現が存在することを実証する。少量の m R N A を、長い露光の後、前立腺組織で見られたレベルの約 1 0 0 分の 1 のレベルで、腎臓および小腸において検出し得る。正常ヒト組織における P S C A 発現の R T - P C R 分析はまた、P S C A 発現が制限されることを実証する。正常な組織のパネルにおいて、高レベルの P S C A

m R N A 発現を前立腺で検出し、有意の発現を、胎盤および扁桃で検出した ( 図 7 A )。種々の前立腺癌異種移植片の前立腺癌細胞株およびその他の細胞株、ならびに正常な前立腺における P S C A

m R N A 発現の R T P C R 分析は、正常な前立腺、L A P C - 4 および L A P C - 9 前立腺癌異種移植片、ならびに卵巣癌細胞株 A 4 3 1 に限定される高レベルの発現を示した ( 図 7 B )。

#### 【 0 2 0 6 】

正常な前立腺における主要な P S C A 転写物は、約 1 k b である ( 図 9 B )。マウスの P S C A 発現を、マウスの脾臓、肝臓、肺、前立腺、腎臓、および精巣における R T - P C R により分析した。ヒト P S C A と同様に、マウスの P S C A は、前立腺で優性に発現される。発現はまた、ヒト組織のうち胎盤で見られたレベルと同様のレベルで、腎臓において検出され得る。

#### 【 0 2 0 7 】

前立腺癌細胞株および異種移植片における P S C A、P S M A および P S A の発現を、ノーザンブロット分析により比較した。図 1 0 に示されるその結果は、P S C A および P S M A の両方の高レベルの前立腺癌に特異的な発現を実証する一方、P S A 発現は前立腺癌特異的ではない。

## 【0208】

(PSCAは正常な前立腺における基底細胞のサブセットにより発現される) 正常な前立腺は、二つの主要な上皮細胞集団(分泌性管腔細胞および下の基底細胞)を含む。インサイチュハイブリダイゼーションを、その発現を局在化するために、PSCAに特異的なアンチセンスリボプローブを使用して、正常な前立腺の複数の部分で行った。図11に示されるように、PSCAは、正常基底細胞のサブセットにおいて排他的に発現される。支質、分泌性細胞または浸潤リンパ球において、染色はほとんど見られない。センスPSCAリボプローブを用いるハイブリダイゼーションは、バックグランド染色を示さなかった。GAPDHについてのアンチセンスプローブを用いるハイブリダイゼーションは、全ての細胞の型におけるRNAがインタクトであるということを確認した。基底細胞は、最終分化分泌性細胞の推定前駆細胞を表すため、これらの結果は、PSCAが前立腺特異的な幹細胞/前駆細胞のマーカーであり得る(Bonkhoffら、1994、Prostate 24:114-118)ということを示唆する。さらに、基底細胞はアンドロゲン非依存性であるため、PSCAの基底細胞との関連は、PSCAが、アンドロゲン非依存性前立腺癌の進行において役割を果たし得るという可能性を生じる。

10

## 【0209】

(PSCAは、前立腺癌細胞において過剰発現される) 正常前立腺およびLAPC-4異種移植片腫瘍におけるPSCAの発現を比較する初期の分析は、PSCAが前立腺癌において過剰発現されることを示唆した。図9に示されるような、ノーザンブロット分析により明らかにされたように、LAPC-4前立腺癌腫瘍は、PSCAを強く発現するが、BPHのサンプルにおいて検出可能な発現はほとんど無い。対照的に、PSA発現は、正常前立腺において明確に検出可能であり、LAPC-4腫瘍において見られたレベルの2~3倍のレベルである。従って、前立腺癌におけるPSCAの発現は、PSAで見られた発現の逆であるようである。PSAは、悪性の前立腺組織よりも正常前立腺組織において、より強く発現されるが、PSCAは、前立腺癌においてより高度に発現される。

20

## 【0210】

前立腺癌の診断におけるPSCAの発現とその値を確かめるために、126個のパラフィンに包埋された前立腺癌の標本を、PSCA発現についてmRNAインサイチュハイブリダイゼーションにより分析した。標本を、一つを除く全ての場合において、根治的な前立腺切除または経尿道切除により除去された初期の腫瘍から得た。全ての標本は、バックグランド染色を制御するためにセンス構築物およびアンチセンス構築物の両方でプローブ検出された。材料および方法に記載するように、スライドには複合スコアが与えられ、6から9のスコアは強い発現を示し、4のスコアは穏やかな発現を意味する。126個のうち102個(81%)の癌がPSCAについて強く染色されたが、126個のうち別の9個(7%)は穏やかな染色を示した(図11Bおよび図11C)。高段階の前立腺上皮内新形成(浸潤前立腺癌の推定前駆病変)は、標本の82%(118個のうち97個)においてPSCAについて強く陽性に染色された(図11B)(Yangら、1997、Am. J. Path. 150:693-703)。正常な腺は、一貫して悪性腺より弱く染色された(図11B)。9個の標本を、手術の前にホルモン除去治療で処置された患者から得た。これらの残りの推定アンドロゲン非依存性の癌の9個のうち7個(78%)は、PSCAを過剰発現し、パーセントは未処置の癌で見られたものに類似であった。このような高いパーセントの標本が、PSCA mRNAを発現したため、PSCA発現と腫瘍病期および悪性度分類のような病理学的特徴との間に、統計学的相関はあり得ない。これらの結果は、PSCA mRNAの過剰発現が、アンドロゲン依存性および非依存性の前立腺癌に共通の特徴であるということを示唆する。

30

40

## 【0211】

(PSCAは、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株において発現される) PSCAを差し引きハイブリダイゼーションを使用して初めにクローニングしたが、ノーザンブロッ

50

ト分析は、アンドロゲン依存性 L A P C - 4 異種移植片腫瘍およびアンドロゲン非依存性 L A P C - 4 異種移植片腫瘍の両方における強い P S C A 発現を実証した ( 図 9 ) 。さらに、P S C A 発現を、全ての前立腺癌異種移植片 ( L A P C - 4 異種移植片および L A P C - 9 異種移植片を含む ) において検出した。

【 0 2 1 2 】

アンドロゲン非依存性の、アンドロゲンレセプター陰性前立腺癌細胞株 P C 3 および D U 1 4 5 における P S C A の発現をまた、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応分析により検出した。これらのデータは、P S C A が、機能的アンドロゲンレセプターの非存在下で発現され得るということを示唆する。

【 0 2 1 3 】

( 実施例 2 : P S C A の生化学的特徴付け )

この実験は、P S C A が、グリコシル化された、G P I アンカー型細胞表面タンパク質であることを示す。

【 0 2 1 4 】

( 材料および方法 )

( ポリクローナル抗体および免疫沈降 ) ウサギポリクローナル抗血清を、合成ペプチド - T A R I R A V G L L T V I S K - ( 配列番号 : 9 ) に対して生成し、そして P S C A グルタチオン S トランスフェラーゼ融合タンパク質を使用してアフィニティー精製した。293T細胞を、P S C A、C D 5 9、E 2 5 またはベクターのみを含む p C D N A I I ( I n v i t r o g e n、S a n D i e g o、C A ) 発現ベクターを用いてリン酸カルシウム沈殿により一過的にトランスフェクトした。免疫沈降を以前に記載されたように行った ( H a r l o w および L a n e、1988、Antibodies : 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 r e s s ) ) 。簡単にいうと、細胞を、500  $\mu$  C i のトランス 35 S 標識 ( I C N、I r v i n e、C A ) を用いて6時間標識化した。細胞溶解物および馴化培地を、1  $\mu$  g の精製されたウサギ抗 P S C A 抗体および20  $\mu$  l のプロテイン A セファロース C L - 4 B ( P h a r m a c i a B i o t e c h、S w e d e n ) とともに2時間インキュベートした。脱グリコシル化のために、免疫沈降物を1  $\mu$  の N - グリコシダーゼ F ( B o e h r i n g e r M a n n h e i m ) を用いて37 で一晩処理するか、または0.1  $\mu$  のノイラミニダーゼ ( S i g m a、S t L o u i s、M O ) で1時間処理した後2.5 m U の O - グリコシダーゼ ( B o e h r i n g e r M a n n h e i m ) 中で一晩処理した。

【 0 2 1 5 】

( フローサイトメトリー ) P S C A 細胞表面発現のフローサイトメトリー分析のために、単一細胞懸濁液を、2  $\mu$  g / m l の精製された抗 P S C A 抗体および1 : 500 希釈のフルオレセインイソチオシアネート ( F I T C ) 標識化抗ウサギ I g G ( J a c k s o n L a b o r a t o r i e s、W e s t G r o v e、P A ) を用いて染色した。データを F A C S c a n ( B e c t o n D i c k i n s o n ) で取得し、L Y S I S I I ソフトウェアを使用して分析した。コントロールサンプルを、二次抗体のみを用いて染色した。グリコシルホスファチジルイノシトール結合を、 $2 \times 10^6$  の細胞を0.5 ユニットのホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C ( P I - P L C、B o e h r i n g e r M a n n h e i m ) を用いて37 で90分間消化することにより、分析した。細胞を、F A C S スキャニングまたはイムノプロット法のいずれかによって、消化の前および後で分析した。

【 0 2 1 6 】

( 結果 )

( P S C A は、細胞表面に発現された G P I アンカー型糖タンパク質である )

推定 P S C A アミノ酸配列は、P S C A が高度にグリコシル化され、G P I 機構により細胞表面上に固定されているということを示唆する。これらの予測を試験するために、本発明者らは、固有の P S C A ペプチドに対して惹起された、アフィニティー精製されたポ

10

20

30

40

50



リクローナル抗体を産生した（材料および方法を参照のこと）。このペプチドは、グリコシル化部位を含まず、CD59（別のGPIアンカー型PSCAホモログ）の三次元構造との比較に基づいて、成熟タンパク質の露出された部分にあると推測された（Kiefferら、1994、Biochem. 33: 4471-4482）。アフィニティー精製された抗体によるPSCAの認識を、PSCAおよびGST-PSCA融合タンパク質でトランスフェクトされた293T細胞の抽出物のイムノブロット分析および免疫沈降分析により、実証した。このポリクローナル抗体は、PSCAトランスフェクト細胞からの24kdのバンドを優性に免疫沈降したが、偽トランスフェクト細胞からは免疫沈降しなかった（図12A）。3つの小さなバンドも存在し、最小のものは、約10kdであった。この免疫沈降物を、これらのバンドがPSCAのグリコシル化形態を表すか否かを決定するために、NおよびO特異的グリコシダーゼを用いて処理した。N-グリコシダーゼFはPSCAを脱グリコシル化したが、O-グリコシダーゼは、全く効果がなかった（図12A）。いくつかのGPIアンカー型タンパク質は、膜結合形態および分泌形態の両方を有することが公知である（FritzおよびLowe、1996、Am. J. Physiol. 270: G176-G183）。図12Bは、いくつかのPSCAが、293T過剰発現系において分泌されるということを示す。PSCAの分泌形態は、細胞表面結合形態よりも低い分子量で移動し、これはおそらく共有結合性GPI結合の非存在を反映する。この結果は、高レベルの293T細胞株における発現を反映し得、前立腺癌細胞株およびインビボにおいて確認される必要がある。

10

20

30

40

50

#### 【0217】

蛍光活性化細胞分類（FACS）分析を、PSCA発現を、細胞表面に局在化するために使用した。非透過化処理した偽トランスフェクト293T細胞、PSCA発現293T細胞およびLAPC-4細胞を、アフィニティー精製された抗体または二次抗体のみで染色した。図12Cは、PSCAをトランスフェクトした293T細胞およびLAPC-4細胞におけるPSCAの細胞表面発現（偽トランスフェクト細胞では生じない）を示す。この細胞表面発現が、共有結合性GPI結合によって媒介されていることを確認するために、細胞を、GPI特異的ホスホリパーゼC（PLC）で処理した。PLCによる細胞表面からのPSCAの放出が、蛍光強度における1log換算（one log reduction）より大きいことによって示された。消化後の馴化培地におけるPSCAの回収をまた、イムノブロット法により確認した。GPIアンカー型タンパク質に対するホスホリパーゼC消化の特異性を、GPI結合抗原CD59またはGPI非結合膜貫通タンパク質E25aでトランスフェクトされた293T細胞に同じ実験を行うことで確認した（Deleernijderら、1996、J. Biol. Chem. 271: 19475-19482）。PLC消化は、CD59の細胞表面発現をPSCAと同じ程度まで減少させるが、E25には影響しなかった。これらの結果は、PSCAが、グリコシル化された、GPIアンカー型細胞表面タンパク質であるという予測を支持する。

#### 【0218】

（実施例3：cDNAをコードするマウスPSCAホモログの単離）

ヒトPSCA cDNAを、潜在的トランスジェニック実験およびノックアウト実験のためのホモログを同定するために、マウスESTデータベースを検索するために使用した。マウス胎児から得られた一つのESTおよび新生児腎臓から得られたもう一つのESTは、ヌクレオチドレベルおよびアミノ酸レベルの両方で、ヒトcDNAと70%同一であった。マウスクローンとヒトPSCAとの間の相同性は、ヒトPSCAとそのGPIアンカー型ホモログとの間の相違の領域を含み、このことは、これらのクローンがPSCAのマウスホモログをおそらく表すということを示す。これらのESTの整列化およびRACE-PCRを使用する5'伸長は、そのコード配列全体を提供した（図2）。

#### 【0219】

（実施例4：ヒトおよびマウスPSCA遺伝子の単離）

この実験は、PSCAが、第8染色体、バンドq24.2に位置することを示す。

## 【0220】

(材料および方法)

(ゲルクローニング) ヒトPSCA遺伝子を含むファージクローンを、ヒトPSCA cDNAプローブを用いてヒトゲノムライブラリー(Stratagene)をスクリーニングすることにより得た(Sambrookら、1989、Molecular Cloning(Cold Spring Harbor))。マウスPSCA遺伝子を含むBAC(細菌性人工染色体)クローンを、マウスPSCA cDNAプローブを用いてマウスBACライブラリー(Genome Systems, Inc., St. Louis, MO)をスクリーニングすることにより得た。14 kbのヒトNotIフラグメントおよび10 kbマウスEcoRIフラグメントを、pBluescript(Stratagene)にサブクローニングし、配列決定し、そして制限酵素地図を作成した。

10

## 【0221】

(蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによる染色体マッピング) 蛍光インサイチュ染色体分析(FISH)を、以前記載されたように、オーバーラップヒトファージクローンを使用して行った(Rowleyら、1990、PNAS USA 87:9358-9362、H. Shizuya、PNAS USA、89:8794)。

## 【0222】

(結果)

20

(PSCA遺伝子の構造) それぞれ約14 kbおよび10 kbのヒトおよびマウスゲノムクローンを得て、制限酵素地図を作成した。ヒトおよびマウスのPSCAおよびLy-6/Thy-1の遺伝子構造の概略図を、図8に示す。ヒトゲノムクローンおよびマウスゲノムクローンの両方は、PSCA遺伝子の翻訳領域および3'非翻訳領域をコードする3つのエキソンを含む。Ly-6およびThy-1遺伝子ファミリーの他のメンバーに対するPSCAの相同性に基づいて、5'非翻訳領域をコードする第4のエキソンの存在が推測される(図8)。

## 【0223】

(染色体8q24.2に対するヒトPSCA遺伝子地図) LAPC-4ゲノムDNAのサザンブロット分析は、PSCAが、単一コピーの遺伝子によりコードされるということを明らかにした。他のLy-6遺伝子ファミリーのメンバーは4つのエキソンを含み、この4つのエキソンは、5'非翻訳領域をコードする第一のエキソン、ならびに翻訳領域および3'非翻訳領域をコードするさらに3つのエキソンを含む。その推定の5'第一エキソン以外の全てを含むヒトおよびマウスPSCAのゲノムクローンを、ファージライブラリーのスクリーニングにより得た。マウスおよびヒトPSCAクローンは、類似のゲノム構成を有していた。このヒトクローンを、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション分析によりPSCAを局在化するために使用した。オーバーラップヒトPSCAファージクローンの同時ハイブリダイゼーションは、第8染色体のみの特異的標識を生じた(図13)。検出されたシグナルの97%は、染色体8q24に局在化し、そのうちの87%は、染色体8q24.2に特異的であった。これらの結果は、PSCAが第8染色体のバンドq24.2に位置していることを示す。

30

40

## 【0224】

(実施例5: PSCAの異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体の生成)

(材料および方法)

(モノクローナル抗体の生成および産生) BALB/cマウスを、PSCAアミノ酸22~99(図1B)を含む、精製されたPSCA-グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質を用いて3回免疫化した。簡単にいうと、ヒトPSCAアミノ酸配列のアミノ酸18~98に対応するPSCAコード配列を、以下のプライマー対

## 【0225】

## 【化 1】

5'プライマー - GGAGAATTCATGGCACTGCCCTGCTGTGCTAC (配列番号:14)

3'プライマー - GGAGAATTCCTAATGGGCCCCGCTGGCGTT (配列番号:15)

を使用して、PCR増幅した。

## 【0226】

増幅されたPSCA配列を、pGEX-2T (Pharmacia) にクローニングし、E. coli を形質転換するために使用しそして融合タンパク質を単離した。

10

## 【0227】

脾臓細胞を、標準ハイブリドーマ技術を使用して、HL-1 骨髄腫細胞と融合した。ELISA およびFACS分析によりPSCAに陽性であったハイブリドーマ (結果を参照のこと) を、サブクローニングした。腹水をC. B. 17 scid/scid マウスにおいて産生し、モノクローナル抗体 (mAb) をプロテインGアフィニティークラム (Pharmacia

Biotech、Piscataway、N. J.) を使用して精製した。PSCA mAb 1G8をまた、Cell-Pharm System 100で、製造業者 (Unisyn Technologies、Hopkinton、MA) により推奨されるように、生産した。

20

## 【0228】

(ハイブリドーマスクリーニングのためのELISA) GSTまたはPSCA-GSTを、Beacti-Bind無水マレイン酸活性化ポリスチレンプレート (Pierce、Rockford、IL) に固定化した。50  $\mu$ lのハイブリドーマ培地をそれぞれのウェルに添加し、そして、1時間、室温でインキュベートした。ウェルを、0.1% BSAおよび0.05% Tween 20を含む200  $\mu$ lのPBSで3回洗浄し、そして、アルカリホスファターゼ (Promega、Madison、WI) で標識した100  $\mu$ lの抗マウスIgG (1:4000) と共に1時間インキュベートした。プレートをアルカリホスファターゼ基質 (Bio-Rad、Hercules、CA) を用いて発色させた。

30

## 【0229】

(細胞培養) LNCaPをATCCより入手し、PSCAを含むpCDNAII (Invitrogen) 発現ベクター、または単独のベクターで安定にトランスフェクトした (Reiter, Rら、1998)。一過性にPSCAまたは単独のベクターでトランスフェクトした293T細胞を、以前に記載されたように調製した (Reiter, Rら、1998)。1%プロナーゼ中で室温で18分間消化した後、LAPC-9異種移植片の外殖片を、PREGM培地 (Clonetics、San Diego、CA) 中で増殖した。FACS分析の前に、LAPC-9細胞を40  $\mu$ mのセルストレーナーに通し、単一の細胞懸濁物を得た。

## 【0230】

(免疫蛍光) 細胞を、ポリ-L-リジンでコートしたカバーガラス上で増殖させた。免疫蛍光アッセイを、透過化処理した、および透過化処理していない固定細胞について行った。固定のため、細胞を、2%のパラホルムアルデヒドのPBS-CM (PBS、100  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$ 、1mM  $\text{MgCl}_2$ ) 溶液で30分間、暗所で処理し、50  $\mu$ Mの $\text{NH}_4\text{Cl}$ のPBS-CM-BSA (PBS、100  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$ 、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.2% BSA) 溶液で10分間クエンチし、そしてPBS-CM-BSAで2回洗浄した。透過化処理のため、細胞をさらにPBS-CM-BSA-Saponin (0.075%のサポニン (Sigma) のPBS-CM-BSA溶液) で15分間、室温で処理した。一次mAbをPBS-CM-BSA (透過化処理のためには、サポニンを追加) 中、2~5 mg/mlで60分間添加し、そしてPBS-CM-BSAで2回洗浄した。FI

40

50

TCと結合したヤギ抗マウスIgG抗体(PBS-CM-BSA+/-サポニンに1:500で希釈; Southern Biotechnology、Birmingham、AL)を30分間添加し、そしてPBS-CMで3回洗浄した。スライドをベクターシールド(Vector Laboratory、Inc.、Burlingame、CA)で、マウントした。

#### 【0231】

(フローサイトメトリー) 細胞( $1 \times 10^6$ )を、ウシ胎児血清またはハイブリドーマ馴化培地を含むPBS中、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、 $100 \mu\text{l}$ のmAbと共に30分間、4℃で、インキュベートした。洗浄後、細胞をFITCと結合したヤギ抗マウスIgG(Southern Biotechnology、Birmingham、AL)の1:500

10

希釈液で染色した。FACScan(Becton Dickinson)でデータを得、そしてLYSISS IIソフトウェアを用いることにより分析した。

#### 【0232】

(イムノプロットおよび免疫沈降) 免疫沈降を、記載のように行った(Harlow、E.およびLane、D.、1988)。簡単には、細胞を500μCiのトランス35標識(ICN)で6時間、標識した。細胞溶解物を、3μgのmAbおよび20μlのプロテインA-Sepharose CL-4B(Pharmacia Biotech)と共に、2時間インキュベートした。イムノプロットのため、細胞を1X SDS Laemmliサンプル緩衝液中に溶解し、5分間、煮沸することによりタンパク質抽出物を調製した。タンパク質を12.5%SDSポリアクリルアミド上で分離し、そしてニトロセルロース膜に転写し、洗浄し、そして10mlのブロッキング緩衝液(TBST中5%無脂肪乳)中の2μg mAbと共にインキュベートした。プロットをAmersham増強化学発光検出システム(Amersham、Arlington Heights、IL)を用いて発光させた。

20

#### 【0233】

(免疫組織化学) 正常な、ホルマリン固定したパラフィン包埋組織サンプルを、Departments of Pathology at Beth-Israel Deaconess Medical Center-Harvard Medical SchoolおよびUCLAから入手した。最初の根治的前立腺切除術の標本を、以前に記載されたデータベースから選択した(Magi-Galluzzi、Cら、1997)。骨転位およびそれに一致する生検標本を、UCLA

30

Department of Pathologyから入手した。再現性を保証するため、2つの研究所で独立に、正常組織を染色し、そしてスコア付けした。UCLAから入手した標本を、以前に記載された免疫ペルオキシダーゼ技術(Said、J.W.ら、1998)の改変法で染色した。抗原の検索を、業務用蒸し器および0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いて、パラフィン切片で行った。PSCA mAbsとの50分間のインキュベーションの後(以下を参照のこと)、スライドガラスを、ウサギ抗マウスIgG、ブタ抗ウサギIgGおよびウサギ抗ブタIgG(全てビオチン結合している)で続けて処理した。次いで、スライドガラスをストレプトアビジン-ペルオキシダーゼと共にインキュベートし、そしてジアミノベンジジン反応を用いて抗体位置決めを行った。Beth-Israel-Deaconess-Harvard Medical

40

Schoolから入手した標本を、以前に記載した自動化Ventana NexES機器(Ventana Medical Systems、Tucson、AZ)を用いて染色した(Magi-Galluzzi、Cら、1997)。750Wのマイクロ波により、15分間、EDTA(pH8.05)において、抗原の検索を行った。SCID腹水から約 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で精製したmAbsを、以下の濃度で用いた: 1G8 = 1:20; 3E6 = 1:30; 2H9 = 1:50; 4A10 = 1:100; 3C5 = 1:100。mAb 1G8をCell Pharm

50

S y s t e m 1 0 0 中に産生し、1 : 1 0 の濃度で使用した。陽性コントロールは L A P C - 9 および L N C a P - P S C A を含み、そして陰性コントロールは L N C a P、およびアイソタイプが一致した無関係な抗体であった。最初の生検標本は、骨転位を有する3人の患者について入手可能であった。脱石灰の状態に近づけるため、P S C A m A b s で染色する前に、これらの標本からのスライドガラスを20分間、D e c a l - S t a t ( L e n g e r s、N Y ) 中で処理した。

#### 【0234】

モノクローナル抗体 ( m A b s ) を、P S C A のアミノ末端およびカルボキシル末端のシグナル配列の両方を欠く P S C A - G S T 融合タンパク質に対して惹起した。P S C A - G S T 融合タンパク質および G S T のみを用いる E L I S A によって、陽性の融合物を選別した。スクリーニングされた400のハイブリドーマの内、28は P S C A - G S T を認識したが、G S T のみは認識しなかった。これらの融合物を、P S C A にトランスフェクトした透過化処理していない293T細胞および偽トランスフェクトした293T細胞のフローサイトメトリーにより二次スクリーニングした。F A C S による二次スクリーニングは、細胞表面上の P S C A を認識可能なクローンが、後にインビボ標的化適用に有用であることを仮定して、それらを選別するために行った。7つの陽性融合物をこのように同定し ( m A b

10

2 A 2、3 G 3、4 A 1 0、1 G 8、3 E 6、3 C 5 および 2 H 9 )、そのうちの5つ ( m A b 4 A 1 0、1 G 8、3 E 6、3 C 5 および 2 H 9 ) をサブクローン化し、そして精製した。

20

#### 【0235】

m A b を、P S C A を免疫沈降する能力、および / またはイムノブロット上の P S C A を認識する能力について試験した。全ての m A b は、293T - P S C A 細胞に由来する、ならびに、高レベルの内因性 P S C A を発現する L A P C - 9 前立腺癌異種移植片腫瘍に由来する、P S C A を免疫沈降した ( 図37 )。同様に、全ての m A b は、イムノブロットにより P S C A を検出した。しかし、m A b s 2 H 9 および 3 E 6 は、約12k d の脱グリコシド化形態の P S C A しか認識しなかった ( 図34 )。

#### 【0236】

5つの m A b により認識されるエピトープの P S C A 上の位置を、3つの短縮型 P S C A - G S T 融合タンパク質を用いるイムノブロット分析により決定した。m A b 4 A 1 0、2 H 9 および 3 C 5 は、P S C A のアミノ末端部分に存在するエピトープ ( すなわち、アミノ酸21 ~ 50 ) を認識し ; m A b 1 G 8 は P S C A の中間部分に存在するエピトープ ( すなわち、アミノ酸48 ~ 85 ) を認識し ; そして、m A b 3 E 6 は P S C A のカルボキシル末端 ( アミノ酸85 ~ 99 ) において反応する ( 図15 )。5つ全ての m A b は、図15に記載するように I g G である。これらの結果は、5つの m A b が、複合アッセイにおいて P S C A を検出することができ、少なくとも3つの異なる P S C A 上のエピトープを認識し得ることを示す。

30

#### 【0237】

( P S C A m A b は前立腺癌細胞の細胞表面上を染色する )

40

P S C A 生物学を研究するための、およびインビボ標的化適用のような潜在的臨床適用のための m A b の有用性は、形質膜上で目的の抗原を認識するそれらの能力に依存する ( L i u、H. ら、1997 ; M c L a u g h l i n、P. ら、1998 ; W u、Y. ら、1995 ; T o k u d a、Y. ら、1996 )。m A b 2 H 9、3 E 6、1 G 8、4 A 1 0 および C 5 が、特に前立腺癌細胞の細胞表面上の P S C A を認識する能力を決定するため、P S C A でトランスフェクトした L N C a P 細胞 ( L N C a P - P S C A ) および L A P C - 9 細胞をフローサイトメトリーおよび間接的免疫蛍光により調べた。293T - P S C A 細胞についてと同様、5つ全ての m A b s は、透過化処理していない L N C a P - P S C A および / または L A P C - 9 細胞の細胞表面上の P S C A を、フローサイトメトリーにより検出し得た ( 図33 )。偽トランスフェク

50

トした L N C a P、およびネオマイシン単独を含むベクター ( L N C a P - n e o ) でトランスフェクトした L N C a P ( いずれも検出可能な P S C A m R N A を発現しない ) は、共に陰性であった。

#### 【 0 2 3 8 】

免疫蛍光分析を、 P S C A タンパク質が細胞表面に位置するかどうかを確認するために、透過化処理したおよび透過化処理していない細胞の両方で行った ( L i u , H . ら、 1 9 9 7 ) 。透過化処理していない L N C a P - P S C A は、 m A b 1 G 8、 3 E 6、 4 A 1 0 および 3 C 5 に対して明らかな細胞表面反応性を示したが、 m A b 2 H 9 に対しては染色されなかった ( m A b 2 H 9 はまた、 F A C S により L N C a P - P S C A 細胞上の P S C A を検出しなかった ) 。 L A P C - 9 細胞は、 5 つ全ての m A b に対して細胞表面反応性を示した ( 図 3 5 ) 。 L N C a P - n e o は、予想されたように、透過化処理の有無に関わらず陰性であった。 L N C a P - P S C A および L A P C - 9 の透過化処理は、膜染色および細胞質染色の両方を生じた。全ての m A b は、細胞表面上に斑点の染色パターンを生じたが、それは m A b 3 E 6、 3 C 5 および 4 A 1 0 に関して最も顕著であった ( 図 3 5 ) 。このパターンは、 P S C A の細胞表面の両駅への凝集またはクラスター化を反映し得る。これらの結果は、 5 つ全ての m A b がインタクトな前立腺癌細胞の細胞表面上 P S C A と反応することを示す。

10

#### 【 0 2 3 9 】

( 正常前立腺中の P S C A の免疫組織化学的染色 )

20

P S C A m R N A は、正常前立腺中の基底細胞のサブセットに位置し、このことは P S C A が前立腺の幹細胞 / 前駆細胞に対する細胞表面標識であり得ることを示唆する ( R e i t e r , R . ら、 1 9 9 8 ) 。 P S C A タンパク質が基底細胞のマーカーであり得る可能性を試験するため、正常前立腺のパラフィン包埋切片において、 P S C A 発現を免疫組織化学的に調べた。 m A b

1 G 8 および 2 H 9 は基底細胞および分泌細胞の両方の細胞質を染色し、一方で m A b 3 E 6 は基底細胞と主に反応した ( 図 3 8 ) 。基底細胞サイトケラチンを発現する萎縮性腺は、全ての 3 つの m A b で強く染色された ( 図 3 8 ) ( O ' M a l l e y , F . P . ら、 1 9 9 0 ) 。 m A b 3 C 5 および 4 A 1 0 は、パラフィン切片において強いバックグラウンド染色および / または非特異的な核染色を生じ、さらには使用されなかった。これらの結果は、 P S C A

30

m R N A が基底細胞において特異的に検出されるが、 P S C A タンパク質は前立腺の上皮細胞層の両方 ( すなわち、基底および分泌 ) において検出され得ることを示唆するが、それぞれの抗体の染色パターンにいくらかの違いはある。

#### 【 0 2 4 0 】

( 正常組織の免疫組織化学的分析 )

本発明者らの初期の研究は、男性における P S C A 発現が、腎臓および小腸において検出可能な R N A が低レベルであり、主に前立腺特異的であることを示した。 P S C A m R N A を、胎盤においてもまた検出した。 P S C A タンパク質発現の前立腺特異性を、 m A b 1 G 8 を用いて、 2 0 の組織の免疫組織化学染色により試験した ( 表 1 を参照のこと ) 。 m A b

40

1 G 8 での陽性の組織染色は、異なるエピトープに対して向けられる m A b との再現性を保証するため、 m A b 2 H 9 および / または 3 E 6 で確認された。染色はまた、結果を確認するため、 2 つの研究所で独立に行い、そしてスコア付けした。 R N A 分析から予想されたように、胎盤は試験した全ての m A b について陽性であり、細胞質染色が栄養膜において見られた ( 図 3 9 A ) 。腎臓において、染色は集合尿細管および遠位曲尿細管において検出されたが、糸球体においては検出されなかった ( 図 3 9 A ) 。膀胱および尿管の移行上皮 ( 以前は、 m R N A レベルで調べていなかった ) は、試験した全ての m A b について陽性であった ( 図 3 9 A ) 。有意な免疫反応性を有する他の唯一の組織は結腸であり、陰窩の奥深くで単一の細胞が強く陽性に染色された ( 図 3 9 A ) 。クロモグラニンを用

50

いた二重染色は、これらの細胞が神経内分泌由来であることを示した。

#### 【0241】

膀胱におけるmAbの反応性がPSCAを表すことを確認するため、根治的膀胱切除で得られた3つの正常な膀胱サンプル上でノーザンブロット分析を行い、前立腺、腎臓およびLAPC-9異種移植片におけるPSCA発現と比較した(図39B)。PSCAmRNAは、膀胱において、前立腺において見られたより低いレベルで検出され、免疫組織学的結果を確証した。3つの腎臓標本において、シグナルは検出されず、腎臓におけるPSCA発現は前立腺よりも有意に低いという本発明者らの以前の結果と首尾一貫していた(Reiter, R.ら、1998)。骨転位から樹立された前立腺癌異種移植片LAPC-9は、正常な膀胱および前立腺と比較して非常に高いレベルのPSCAmRNAを発現する(Whang, Y. E.ら、1998)。これらの結果は、男性におけるPSCA発現が主に前立腺優勢であることを確証するが、尿路上皮、腎臓の集合尿管および結腸の神経内分泌細胞における検出可能なPSCAタンパク質発現もまた存在する。

10

(PSCAタンパク質は、局在化した前立腺癌の大部分によって発現される)

本発明者らの以前の研究において、mRNAは約80%の腫瘍において発現し、そして悪性腺よりも正常腺においてより高度に発現するようである(Reiter, R.ら、1998)。PSCAタンパク質が前立腺癌において検出され得るかどうか、およびPSCAタンパク質レベルが良性腺と比較して悪性腺において増加するかどうかを決定するため、初期転位性前立腺癌のパラフィン包埋の病理標本をmAb 1G8で免疫染色した(図21および28)。単離された場合もまた、染色の特異性を確認するために、mAb 3E6または2H9で染色した。15の初期癌の内、12は陽性に染色された(図21)(高い段階の前立腺の上皮内新形成の病巣を含む2つの症例のうち2つを含む)。染色強度は異なり、7つの症例は癌および隣接する正常な腺において同等な染色を示し、そして5つは癌において有意に強い染色を示した。いくつかの場合においては、悪性腺において強い発現が存在し、そして隣接した正常組織において検出可能な発現は存在しなかった(図21; 患者1)。また、染色が不均一であり、いくつかの悪性腺について、他と比べてより強く染色されるいくつかの症例も存在した(図21; 患者2)。全体的に、あまり分化していない腫瘍は、十分に分化した腫瘍より強く染色され、このことはPSCA過剰発現が腫瘍段階の増進と相関し得ることを示唆した(図21; 患者3)。これらの結果はPSCAタンパク質が前立腺癌において発現することを示す。本発明者らのインサイチュ研究における以前のmRNAと一致して、有意な割合の癌において、おそらく増進する腫瘍の段階と一致して、PSCAは過剰に発現すると思われる。

20

30

#### 【0242】

本研究は、PSCAに対する5つの単クローン抗体を用いたPSCAタンパク質発現の最初の特徴付けを記載する。これらのmAbは細胞表面の外側のエピトープを認識するので、それらは前立腺癌診断および治療のための有用性を有し得る(Liu, H.ら、1997)。1つの可能性は、PSMAに対する抗体を使用するProstascintスキャンと同様に、これらのmAbが転位性疾患の部位を位置決めするために用いられ得ることである(Sodee, D. B.ら、1996)。別の可能性は、それらが、単独でか、または放射性同位体または他の毒素と結合されるかのいずれかで、前立腺癌細胞を治療的に標的化するために用いられ得ることである。同様のアプローチは、現在、PSMA上の細胞外エピトープに対する抗体を用いて評価されている(Murphy, G. P.ら、1998; Liu, H.ら、1997; Liu, H.ら、1998)。

40

#### 【0243】

PSCAmAbは、細胞表面を斑点状に染色し、PSCAが細胞表面の特定の領域に局所化し得ることを示唆する。GPI-アンカー型タンパク質は、細胞表面の界面活性剤の不溶性糖脂質富化ミクロドメイン(DIGS)においてクラスター化することが公知である(Varma, RおよびMayor, S., 1998)。小胞およびスフィンゴリピド-コレステロールラフト(raft)を含むこれらのミクロドメインは、シグナル伝達

50

および分子輸送において重要な役割を果たすと考えられている (Anderson, R. Caveola, 1993; Friedrichson, T. および Kurzchalia, T. V., 1998; Hoessli, D. C. および Robinson, P. J., 1998)。Thy-1 (PSCA の相同体) は以前、脂質-ミクロドメインにおける相互作用を介して src キナーゼにシグナルを送ることが示された (Thomas, P. M. および Samuelson, L. E., 1992; Stefanova, I. ら、1991)。本発明者らの実験室における予備的な亜細胞分画実験は、DIGS 中の PSCA の存在を確認する (Xavier, R. ら、1998)。

#### 【0244】

GPI-アンカー型タンパク質はまた、プロスタソーム (prostasome) (前立腺上皮細胞より放出された、膜に閉ざされた保存ビヒクル) に局在化すると報告された (Ronquist, G. および Brody, I., 1985)。CD59 (補体媒介性細胞溶解の GPI アンカー型インヒビター) は、正常の前立腺上皮細胞のプロスタソームおよび前立腺分泌物中に高濃度で見出される (Rooney, I. ら、1993)。PSCA タンパク質は、前立腺分泌細胞中に検出される。

#### 【0245】

PSCA mRNA が独占的に基底細胞に局在化するという本発明者らの以前の発見に反して、本結果は、PSCA タンパク質が基底細胞および分泌細胞の両方に存在し得ることを示唆する。前立腺における mRNA とタンパク質局在性との間の同様の違いは、PSMA およびアンドロゲンレセプターについて記載されている (Magi-Galuzzi, C. ら、1997; Kawakami, M. および Nakayama, J., 1997)。分泌細胞中の PSCA タンパク質の存在についての 1 つの可能な説明は、PSCA mRNA が基底前駆細胞において転写されるが、その PSCA タンパク質発現は、基底細胞が分泌細胞へ分化するように存続することである。別の可能性は、PSCA タンパク質が基底細胞から分泌細胞へ翻訳後に転写されることであり得る。

#### 【0246】

mAb 3E6、1G8 および 2H9 による基底細胞および分泌細胞の染色強度における違いは、基底および分泌細胞における抗体および / または PSCA の翻訳後修飾における違いにより認識される異なるエピトープを反映し得る。この可能性を支持することは、5 つの mAb が、全てのアッセイまたは細胞株において PSCA と同様に反応しないという意見である。mAb

2H9 は、LAPC-9 の細胞表面上の PSCA を認識し、LNCaP - PSCA は認識しない。このことは、この抗体により認識されるエピトープが、後者の細胞型において改変され得るか、または覆い隠され得ることを示唆する。本発明者らはまた、mAb 3E6 が、時として mAb

1G8 および 2H9 と同じように強く癌を染色しないことを観測した。このことは、mAb 3E6 が PSCA の特定の型と優先的に反応し得ることを示唆する。

#### 【0247】

男性においては大部分は前立腺特異的であるが、PSCA はまた、尿路上皮、直腸の神経内分泌細胞、ならびに腎尿細管および集合管において低レベルで発現される。腎尿細管および集合管において見られる染色は、これらの構造が発生的に中腎管の尿管芽に由来することにおいて興味深く、腎臓において見られる染色パターンに対する考えられ得る理由を示唆する。検出可能な PSCA

mRNA の腎臓試料における非存在は、低レベルの発現、または集合管が腎髄質中に位置するが故に、このサンプルが腎皮質から主に得られたサンプルである可能性のいずれかを反映し得る。

#### 【0248】

前立腺特異的な細胞表面遺伝子を同定するための主な起動力は、選択的な、無毒性の治療を開発する要求である。PSMA (別の「前立腺制限」タンパク質) はまた、十二指腸、結腸の神経内分泌細胞、および近位尿細管において発現されることが示されている (S

10

20

30

40

50



ilver, D. A. ら、1997)。PSMAワクチン治療の先の報告は、有意な毒性を生じていない(Tjoa, B. A. ら、1998)。

【0249】

尿路上皮および腎臓におけるPSCAの発現は、正常な前立腺における発現より低く、そして評価された多くの前立腺癌において見られる発現よりも顕著に低いようである。PSCAに対して指示される治療は、それ故、Her-2/neuを過剰発現する乳癌を主に標的にするHer-2/neu抗体と同程度に、癌に対して相対的に選択的であり得る(Disis, M. L. およびCheever, M. A. , 1997)。

【0250】

尿路上皮および腎臓におけるPSCAの発現は、それが移行細胞癌および腎臓細胞癌において発現され得る可能性を生じる。検査された2つの膀胱癌はPSCAを発現し、1つはLAPC-9と同様のレベルであり、これはPSCAが移行細胞癌のいくつかの場合において過剰発現され得ることを示唆する。膀胱癌試料のより完全な調査が、この可能性を試験するために必要とされる。

【0251】

本明細書中のデータは、PSCAが前立腺癌の大多数において発現されるという本発明者らの初期の観察を支持する。同様に、PSCAタンパク質は、隣接する正常な腺と比較した場合に、いくつかの前立腺腫瘍において過剰発現され、前立腺癌治療のための標的としてのその使用を支持している。mRNAのインサイチュ研究と対照的に、現在の結果はPSCAタンパク質発現が、癌の段階および/または程度と相関し得ることを示唆する。RNAとタンパク質発現との間の同様の差異は、サイモシンBeta-15について記載されている(Bao, L. ら、1996)。

【0252】

(表1. 正常な組織におけるPSCA発現)

(染色) (組織)

陽性 前立腺(上皮)

膀胱(移行上皮)

胎盤(栄養膜)

結腸(神経内分泌細胞)

腎臓(尿細管および集合管)\*

陰性 腎臓(糸球体)

前立腺(間質)

膀胱(平滑筋)

精巣

子宮内膜

小腸

肝臓

脾臓

乳房

胆嚢

骨格筋

脳

末梢神経

骨髄

胸腺

脾臓

肺

気管支

心臓

\* mAb 3E6は遠位尿細管と反応し、一方mAb 1G8は遠位尿細管と

10

20

30

40

50

反応し、そしていくつかの場合には、近位尿細管と反応する。

【0253】

(実施例6)

本実験は、PSCA発現が前立腺癌の骨転移において増幅されることを示す。

【0254】

(材料および方法)

ウマ血清(NHS)(GIBCO #26050-070)を1%カゼイン、PBST中に希釈した(1/20希釈)。PSCAを認識する本発明の抗体を、1/100NHS、PBST中に希釈した。

【0255】

検出システムは、HRP-ウサギ抗マウスIg(DAKO P260)、HRP-ブタ抗ウサギIg(DAKO P217)、HRP-ウサギ抗ブタIg(DAKO P164)を含んだ。それぞれを、1/100NHS、PBST中1/100に希釈した。

10

【0256】

3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド(DAB)(Fluka)ストックを、135mlの0.05Mトリス(pH7.4)中に5g溶解することにより作製した。DABを、1ml/バイアル中に等分し、そして-20℃で冷凍した。DABの検量線用溶液を、1mlのDABを40mlのDAB緩衝液および40マイクロリットルの50% $H_2O_2$ に加えることにより作製した。

20

【0257】

DAB緩衝液を、1.36gのイミダゾール(Sigma #I-0125)と100mlの $D^2-H_2O$ を混合し、次いで5N HClでpHを7.5に調整することにより調製した。pH調整後、20mlの0.5MトリスpH7.4および80mlの $D^2-H_2O$ を加えた。

【0258】

抗体に対して陽性であることが既知であり、そして先に示された、組織/細胞の切片は、患者のスライドと共にを行った。このスライドは、その抗体に対する「陽性のコントロール」として役立つ。患者の試験試料の切片を、一次抗体の代わりに陰性のコントロール抗体とインキュベートした。このスライドは、試験のための「陰性のコントロール」として役立つ。

30

【0259】

染色手順は以下のとおりである。骨サンプルをスライドに適用した。次いで、このスライドを、60℃で一晩ベーキングした。スライドを、5分間ずつ4交換のキシレン中で脱パラフィン化し、そして段階的な一連のエチルアルコール(100%×4、95%×2)から水道水を通させ、次いでNBFに移し、そして30分間固定した。固定されたスライドを、流水道水中に15分間置き、3% $H_2O_2$ -MeOHに移し、10分間インキュベートし、そして流水道水で5分間洗浄し、次いで脱イオン水でリンスした。

【0260】

次いで、スライドを0.01Mクエン酸塩緩衝液pH6.0に供し、45℃で25分間加熱し、15分間冷却し、次いでPBSで洗浄した。次いで、このスライドをPBSでリンスし、そして以下の4工程のプログラムを用いるプログラムされたDAKO自動染色機に配置した。この4工程のプログラムは以下の通りである。スライドをPBSでリンスし、そしてPBST中1%カゼイン中の1/20NHSを用いて10分間ブロックする。次いで、一次抗体を適用し、そして30分間インキュベートし、続いて緩衝液でリンスする。次いで、HRP-ウサギ抗マウスIgを適用し、そして15分間インキュベートし、続いて別の緩衝液でリンスする。HRP-ブタ抗ウサギIgを適用し、そして15分間インキュベートし、続いて緩衝液でリンスする。HRP-ウサギ抗ブタIgを適用し、そして15分間インキュベートし、続いて緩衝液でリンスする。

40

【0261】

50

次いで、D A Bをこのスライドに適用し、そして5分間インキュベートし、続いて緩衝液でリンスする。第二のD A Bを適用し、そして5分間インキュベートし、続いて緩衝液でリンスする。

#### 【0262】

このスライドを、自動染色機から取り出して、そしてスライドホルダー中に置き、水道水でリンスし、そしてH a r r i sヘマトキシリンでカウンター染色する(15秒)。次いで、このスライドを水道水で洗浄し、酸アルコールに浸漬し、水道水で洗浄し、炭酸水素ナトリウム溶液に浸漬し、そして水道水で洗浄する。次いで、このスライドを、段階的なエチルアルコール(95%×2、100%×3)およびP r o p a r x 3で脱水し、そしてP e r m o u n tでカバーガラスをする。

10

#### 【0263】

(前立腺癌の骨への転移において強力に発現されるP S C Aタンパク質)

前立腺癌は、優先的に骨に転移し、そして骨芽細胞の応答を誘導するその傾向において、ヒトの腫瘍の中でも独特である。前立腺癌の骨転移の9個の切片が、免疫組織化学的に検査された(図28)。全てが、m A b

1 G 8(および/または3 E 6)と強烈にそして均一に反応した。2つの例において、微小転移はヘマトキシリンで容易に検出可能ではなく、そしてm A b 1 G 8を用いる染色後に、エオシン切片が見られ得る(図28;患者5)。全体的に、骨転移における染色は、原発性腫瘍における染色よりも強力で、そしてより均一であった。3つの場合において、原発性腫瘍由来の生検試料は、比較のために利用可能である。対応する骨転移と比較した場合、全てはP S C Aに対して弱く陽性であり、P S C A発現が骨で増加することを示唆した。1つの生検試料においては、悪性の腺の小さな病巣のみににおいて弱い染色が現れ、一方で残りの腫瘍は陰性であった(図21および28;患者4)。2つの場合においては、生検試料は骨転移の10年前および15年前に得られ、原発性病変と転移病変との発生の間の長い潜伏期間を示した。骨における強力な染色が骨切片を調製するために用いられる脱灰プロセスにより引き起こされたという可能性を除外するため、3つの原発性生検試料をまた脱灰緩衝液で処理する。この処理はバックグラウンド染色を増加させたが、それは上皮の反応性を顕著には変化させず、骨における強力なシグナルは脱灰プロセスにより引き起こされたのではなさそうだとすることを示す。これらの結果は、P S C Aが骨への前立腺癌の転移において選択され得るかまたは上方制御され得ることを示唆する。

20

30

#### 【0264】

図21~23は、前立腺癌の骨転移の骨サンプルがP S C Aに対して陽性であったことを示す。前立腺癌の骨転移の9つの切片が検査された。一貫して、強烈な染色が9つの前立腺癌の骨転移において見られ、全てはm A b

1 G 8(および/または3 E 6)と強烈にそして均一に反応した。2つの例において、病理学者は、1 G 8を用いる染色が病変を強調するまで転移を容易に同定し得ない。全体的に、骨転移における染色は、原発性腫瘍における染色よりも強力にそしてより均一に現れた。

#### 【0265】

これらの結果は、P S C Aが骨への前立腺癌の転移において非常に過剰発現され得ることを示唆する。S c a - 2(P S C Aの近いホモログ)が骨髄において破骨細胞活性を抑制することが最近報告されたので、これは特に興味深い。P S C Aが同様の活性を有する場合、破骨細胞活性の阻害は骨における骨形成の活性のバランスを傾けるので、それは、前立腺癌転移が破骨細胞応答を生じる傾向についての、1つの説明を提供し得る。別の可能性は、他のL y - 6 / T h y - 1ファミリーのメンバーが同様のプロセスにおいて関与するので、P S C Aが骨への接着に関与し得ることである。多数の原発性前立腺癌におけるP S C Aの異質な発現が存在した。これらの結果は、進行した疾患に対する新規の標的としてのP S C Aの使用をさらに支持する。

40

#### 【0266】

本研究の最も興味深い結果の1つは、一貫して、強烈な染色が9つの前立腺癌の骨転移

50

において見られたことである。LAPC-9（骨の転移より定着された異種移植片）はまた、PSCAのために強烈に染色される。3人の患者において、対応する原発性生検試料は骨の転移と比較して低レベルのPSCA発現を示した。検査された3人の患者の原発性腫瘍における強力なPSCA発現の領域は、生検のみが分析のために利用可能であるので、避けられ得た。PSCAの異質な発現は、少なくとも1つの対応する原発性腫瘍、および対応する転移病変が利用可能ではなかったいくつかの原発性腫瘍において検出された。また、2つの場合において、原発性腫瘍は、骨転移の少なくとも10年前にサンプリングされ、それは、原発性腫瘍内に高レベルのPSCAを発現するクローンが、初期の生検に続いて発生し得る可能性を生じた。これらの結果は、明らかに骨転移におけるPSCA発現を示し、さらに、進行した疾患についての新規な標的としてそれを支持する。

10

#### 【0267】

（実施例7）

本実験は、PSCA発現が、膀胱癌において通常の膀胱よりも高いことを示す。

#### 【0268】

前立腺、膀胱、腎臓、精巣、および小腸由来の組織（前立腺癌ならびに膀胱癌および腎臓癌を含む）を患者から得た。次いで、これらの組織を、以下の通りにノーザンブロット分析およびウエスタンブロット分析を用いて、PSCAへの結合について検査した。

#### 【0269】

ノーザンブロット分析については、組織サンプルを切除し、そして0.5×0.5cmより小さい組織サンプルを、液体窒素で急速冷凍した。これらのサンプルを、Biotecxにより提供されたプロトコルを用いるpolytronホモジナイザー（Ultra spec<sup>TM</sup> RNA単離システム、Biotecx Bulletin No: 27, 1992）を用いて、7mlのUltra spec（Biotecx, Houston, Texas）中でホモジナイズした。

20

#### 【0270】

定量した後、各サンプル由来の20μgの精製RNAを、1%アガロースホルムアルデヒドゲル上にロードした。運転条件およびブロッティング条件は、実施例1において用いられた条件と同じであった。フィルターを、標識化PSCAおよび内部標準（アクチン）で、別々に検査した。フィルターを洗浄し、そして数時間終夜で曝した。

#### 【0271】

ウエスタンブロット分析については、組織サンプルを切除し、そして0.5×0.5cmより小さい組織サンプルを取り出して、そして素早くミンスし、そして同容積の熱い2X

30

Sample Buffer（5% SDS、20%グリセロール）中でボルテックスした。サンプルを100で5分間インキュベートし、30分間ボルテックスし、そして透明にした。タンパク質濃度を、Biorad's DC Protein Assayキット（Richmond, CA）により決定した。40μg/サンプルを、12%ポリアクリルアミドタンパク質ゲル上でロードした。ニトロセルロースフィルターへの転写を標準的な方法（Towbinら、PNAS

76:4350（1979）により行った。ウエスタンブロットを、フィルターをIG8一次抗体、続いてIG8二次抗体（すなわち、ヤギマウスIgG HRP）とともにインキュベートすることにより行った。検出は、Amersham ECL Detectionキット（Arlington Heights, IL）によった。

40

#### 【0272】

IG8は、ウエスタンブロット分析において、LAPC9および膀胱癌（指定された膀胱（Rob））の細胞表面上のPSCAを認識し、結合した（図6）。図6において、LAPC9を除く全ての組織は正常であった。ノーザンブロット分析は、膀胱癌組織（指定された膀胱（Rob）（Rob's Kid CAともいう）およびLAPC9）における増強したPSCAを確認した（図25）。

50

## 【0273】

## (実施例8)

本実験は、PSCA遺伝子コピー数がc-mycのコピー数の増加と同様に増加することを示す(図7)。c-myc増幅は乏しい結果と相関するので、これは重要である。従って、このデータは、PSCA増幅はまた、乏しい結果に対する前兆となり得ることを示唆する。

## 【0274】

## (染色体列挙プローブおよびc-Mycに対するプローブを用いるFISH)

FISHの方法は周知である(Qian, J.ら、「Chromosomal Anomalies in Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Carcinoma Detected by Fluorescence in vivo Hybridization」、Cancer Research, 1995, 55: 5408-5414)。手短には、組織切片(サンプル34および75は2人の患者由来であった)を脱パラフィン化し、脱水し、2X SSC中75で15分間インキュベートし、37で15分間ペプシン溶液中(0.9% NaCl (pH 1.5)中4mg/ml)で消化し、室温で5分間2X SSCでリンスし、そして空気乾燥した。

## 【0275】

PSCAに対しておよび8q24(c-myc)領域に対して直接的に標識された蛍光DNAプローブを選択した。PSCA cDNA(図1)を、製造者のプロトコル(Genome Systems Inc.)に従ったFISH分析において次に用いられる、130kbの細菌性人工染色体(bac)クローン(PSCAプローブ)を同定するために用いた。このように同定され、FISH分析において用いられたbacクローンは、BACH-265B12(Genome Systems, Inc.コントロール番号17424)であった。

## 【0276】

SG標識PSCAプローブと共に、8q24(c-myc)に対するSO標識プローブを用い、連続的な5μm切片上でデュアルプローブハイブリダイゼーションを行った。プローブおよび標的DNAを、80のオープンで5分間、同時に変性させ、そしてそれぞれのスライドを37で一晩インキュベートした。

## 【0277】

1.5M尿素/0.1X SSC中、45で30分間、および2X SSC中、室温で2分間、ハイブリダイゼーション後の洗浄を行った。核を、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドールおよびanilfade化合物p-フェニレンジアミンでカウンター染色した。

## 【0278】

FISHシグナルの数を、トリプルパスフィルター(I02-104-1010; VYSIS)を装着したZeiss Axioplan顕微鏡を用いて数えた。c-mycシグナルおよびPSCAシグナルの数を、各々の核について数え、そしてc-myc:PSCA比の全体的な平均値を計算した。結果を図17に示す。

## 【0279】

この結果は、PSCA遺伝子コピー数が、前立腺癌サンプルにおいて増加したことを示す(図7)。PSCA遺伝子は、8q24.2に位置する。遺伝子コピー数の増加は、第8染色体の増加、およびPSCA遺伝子の増幅の両方による(図17)。興味深いことには、PSCA遺伝子コピー数の増加は、これもまた8q24に位置するc-mycの遺伝子コピー数の増加と類似する(図17)。先の研究は、第8染色体の増加およびc-mycの増幅は、前立腺癌の進行の潜在的なマーカーであることを示した(R. B. Jenkinsら 1997 Cancer Research 57: 524-531)。

10

20

30

40

50

## 【0280】

## (実施例9)

(ルシフェラーゼ発現を駆動するためのhPSCA 9kb上流領域を使用したレポーター遺伝子構築物)

実施例4に記載されるように、ヒトPSCAをコードする14kb NotIゲノムフラグメントを、全長ヒトPSCA cDNAプロンプでライブラリーをスクリーニングすることにより、ヒトゲノムDNA(Stratagene)をコードするF[XI]ライブラリーから単離した(Sambrookら、1989、Molecular Cloning(Cold Spring Harbor))。14kb ヒトPSCAゲノムフラグメントはレポーター遺伝子の発現を駆動するために使用された9kbのPSCA上流配列を含む。

10

## 【0281】

レポーター遺伝子ベクターは図42に示され、そして以下のように構築した。14kb NotIフラグメントをベクターからBluescript KSベクター(Stratagene)へサブクローン化し、pBSKS-PSCA(14kb)構築物を生じた。PSCA上流配列を、Bluescriptベクターの中に含まれるT7配列に対応するプライマーおよびPSCAエクソン1の中に含まれる配列に対応するプライマー(プライマーH3hPSCA3'-5、このプライマーの配列は以下の通りである：H3hPSCA3'-5の配列は5'-gggaagccttgacacagcccttcagggtc-3'(配列番号：17)である)を使用して、PCR増幅によりpBSKS-PSCA(14kb)からサブクローン化した。PSCAエクソン1に対応するプライマーは、PCR増幅後のさらなるサブクローン化を可能にするために導入されたHindIII配列を含んだ。生じた増幅されたフラグメントを、HindIIIで消化し、そして、pGL3-基本ベクター(Promega)の中にサブクローン化し、ルシフェラーゼ遺伝子と作動可能に連結された種々の長さのPSCA上流配列を含む一連の欠失レポーター遺伝子構築物を生成するのに使用されたpGL3-PSCA(7kb)を生成した(図42)。PSCA上流領域の欠失された部分をpGL3-PSCA(7kb)から制限フラグメントをサブクローン化することにより得た。-9kbと-7kbの間のPSCA上流領域をpBSKS-PSCA(14kb)構築物からサブクローンし、NotI部位をKlenowによって平滑末端へ変換し、そして、そのフラグメントをpGL3-PSCA(9kb)構築物を得るためにpGL-PSCA(7kb)のSacI/HindIII部位にクローンした。PSCAコード領域の上流配列に対する表示は(例えば-9kbおよび-6kb(など))ATG翻訳開始コドンと関連する。レポーター遺伝子構築物pGL3-PSCA(9kb)、pGL3-PSCA(6kb)、pGL3-PSCA(3kb)およびpGL3-PSCA(1kb)をルシフェラーゼ遺伝子と作動可能に連結した(図42)。プラスミド、pGL3-CMVは、ルシフェラーゼ遺伝子に連結されたサイトメガロウイルスプロモーター(Boshart, M.ら、1985 Cell 41:521-530)を含み、そして陽性コントロールとして使用した。また、プラスミドpGL3はプロモーター配列を含まず、ネガティブコントロールプラスミドとして使用した。

20

30

## 【0282】

40

## (実施例10)

(hPSCA上流領域を含むレポーター遺伝子構築物を使用したトランスフェクションアッセイ)

前立腺細胞株および非前立腺細胞株の3通りの皿を、Tfx50(Boehringer Mannheim)により、PSCA構築物pGL3-PSCA(9kb)または陽性コントロール構築物であるpGL3-CMV(両方とも上記実施例9に記載される)を用いてトランスフェクトし、そしてルシフェラーゼ活性についてアッセイした(図43)。トランスフェクトされた細胞および細胞株には、PrEC(アンドロゲン非依存性前立腺基底細胞)、LNCaP(アンドロゲン依存性前立腺分泌細胞株)、LAPC4(アンドロゲン依存性前立腺細胞株)、HT1376(膀胱細胞株)および293T(腎臓細胞株)

50

が挙げられる。その構築物の発現活性はCMVプロモーターの活性の割合として表される。標準誤差がバーの上に示される。

【0283】

結果は、9 kbのヒトPSCA上流配列が、図10に示された天然hPSCAに見られるmRNA発現パターンと類似する組織特異的様式においてルシフェラーゼ遺伝子の発現を駆動することを示す(実施例1)。ルシフェラーゼは、アンドロゲン依存性前立腺細胞株およびアンドロゲン非依存性前立腺細胞株ならびに膀胱の両方に容易に検出可能であった。ルシフェラーゼもまた、低レベルではあるが、腎臓細胞で検出可能であった。

【0284】

(実施例11)

(PSCA上流領域内の調節エレメントの同定)

PrEC(Clonetech)またはLNCaP細胞の3通りの皿を、上記実施例9に記載されたレポーター遺伝子構築物または陽性コントロール構築物でトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした。レポーター遺伝子構築物は、ルシフェラーゼ遺伝子に作動可能に連結された種々の長さのhPSCA上流領域を含む。陽性コントロール構築物であるpGL3-CMVは、ルシフェラーゼに作動可能に連結されたCMVプロモーターを含む。その細胞をTfx50トランスフェクション系(Promega)を使用して、トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞におけるルシフェラーゼの発現をDual

Luciferase Reporter Assay System(Promega)を使用して、アッセイし、ルシフェラーゼ発現のレベルを相対的単位(RLU)で測定した。

【0285】

ルシフェラーゼ発現を駆動する種々の長さのhPSCA上流領域の能力は、CMVプロモーターを含む陽性コントロール構築物の活性の割合として表される。標準誤差を示す。

【0286】

図44に示される結果は、PrEC細胞およびLNCaP細胞の両方において3 kbのhPSCA上流配列はルシフェラーゼの発現を駆動することを実証するが、PrEC細胞と比較して、LNCaP細胞における検出可能なルシフェラーゼのレベルは6倍高い。この比較は検出可能なルシフェラーゼのレベルに基づいた。対照的に、1 kbのhPSCA上流配列は、いずれの細胞株のルシフェラーゼの発現をも駆動しなかった。

【0287】

(実施例12)

(標的ベクター)

標的ベクターを相同組換えによって、内因性PSCAコード領域を欠失するように設計した。図40は、マウスPSCA遺伝子の標的ベクター、およびマウス細胞に含まれる内因性PSCA遺伝子を欠失させるためにこの標的ベクターを使用するためのストラテジーを示す。標的ベクターは、マウスPSCA上流配列を含む12 kb

SpeIフラグメント、pGT-N29ベクター(New England Biolabs)由来のneo<sup>r</sup>遺伝子に作動可能に連結されたPGKプロモーターを含むNotI/EcoRIフラグメントおよびマウスPSCA下流配列を含む3.5 kb BstXI/XhoIフラグメントを含む。ネオマイシン耐性遺伝子の構成的発現はPGKプロモーターにより制御され、標的ベクターを含む標的細胞の抗生物質選択を可能にする。

【0288】

当業者に理解されているように、本明細書に記載される標的ベクターとしては、標的ベクターを含むか、または選択レポーター遺伝子を含み得ない細胞の選択のためのneo<sup>r</sup>遺伝子が挙げられるが限定されない。標的ベクターはまた、トランスジェニックマウス(当該分野で公知の、それぞれ標的ベクターがレポーター遺伝子を含むか否かに依存する、ノックインマウスまたはノックアウトマウス)の生成に使用され得る。トランスジェニックマウスは、マウスの前立腺発達におけるPSCA遺伝子の機能を研究するための動物モ

10

20

30

40

50

デルとして使用され得る。

【0289】

限定することが意図されない1つの例として、標的ベクターを使用して、欠失されたPSCA遺伝子を含む、ヘテロ接合性の細胞を生成するために、胚性幹細胞(ES)細胞中の野生型内因性ゲノムマウスPSCAコード配列を欠失させた。例えば、標的ベクターを使用して生成したヘテロ接合性細胞は、図40に結果として示されるようなPSCA+/neoである。ヘテロ接合性細胞またはトランスジェニックマウスの表現型は野生型PSCA細胞または動物と比較され得る。

【0290】

標的ベクターは以下のように構築される。PSCA上流およびエキソン1配列の一部を含む12kb SpeIフラグメントの末端を、平滑末端化し、そしてネオマイシン耐性遺伝子を含むpGT-N29(Bio Labs)由来の平滑末端化されたNotI/EcoRIフラグメントに連結した。ネオマイシン耐性遺伝子の3'末端を、PSCAエキソン3の一部および下流配列を含む平滑末端化された3.5kb BstXI/XhoIフラグメントに連結した。生じたフラグメントを、標的ベクターpGT-N29-mPSCA5'/3'を生成するためにpGT-N29へクローン化した。

【0291】

標的ベクターを、以下に記載される方法を使用して、エレクトロポレーションによりES細胞へトランスフェクトした: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells; A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1987)。ネオマイシン耐性細胞を、選択し、そしてゲノムDNAを選択された細胞から単離した。ゲノムサザン分析を実施して、相同組換え反応の結果を決定した。相同組換え反応および非標的ES細胞由来の10μgのDNAをEcoRIで消化し、そしてサザンプロット法によって分析した(Southern, EM 1975 J. Molec. Biol. 98:503)。プロットをPSCAコード領域に対する配列3'を含むXhoI/EcoRIフラグメントを用いて厳密に調べた。その結果はプローブは、PSCA+/PSCA+であるコントロール非標的細胞に対応する10kbフラグメントおよびヘテロ接合性であり、そしてPSCA+/neoを含む標的細胞に対応する4kbフラグメントを検出することを示す。

【0292】

(実施例13)

(前立腺癌のためのトランスジェニックマウスモデル)

本発明は、前立腺基底細胞中に腫瘍形成を誘導するために、癌遺伝子の発現を駆動するPSCA遺伝子の上流領域を使用して、前立腺癌のためのトランスジェニックマウスモデルを生成するストラテジーを意図する。図41に示されるように、ストラテジーは腫瘍の形成を誘導する遺伝子産物をコードする導入遺伝子に作動可能に連結されるPSCA遺伝子の上流領域を含むキメラ癌遺伝子ベクターの投与(例えばマイクロインジェクション)を含む。他の研究者らは、癌遺伝子に作動可能に連結された異なる前立腺調節配列および非前立腺調節配列を用いて、本技術を使用する。例えば、C3(1)は前立腺優性調節配列(Moroulakouら

1994 Proc. Nat. Acad. Sci. 91:11236-11240)であり、そしてプロバシン(probasin)は前立腺特異的調節配列(Greenbergら

1995 Proc. Nat. Acad. Sci. 92:3439-3443)であり、そしてこれら両方の調節配列は前立腺分泌細胞中の導入遺伝子の発現を駆動する。Cryptdin2は前立腺内分泌細胞中の癌遺伝子の発現を引き起こす小腸優性調節配列(Garagenianら

Proc. Nat. Acad. Sci. 95:15382-15387)である。対照的に、本発明は、前立腺癌のためのトランスジェニックマウスモデルを生成するために



、前立腺基底細胞中に癌遺伝子の発現を駆動するため P S C A 上流領域を使用することを意図する。

#### 【 0 2 9 3 】

誘導された前立腺腫瘍の臨床的特徴は、分析され得、そしてキメラ癌遺伝子ベクターを構築する際に使用される特定の癌遺伝子により引き起こされる腫瘍の公知の特性と比較され得る。さらに、トランスジェニックマウスの種々の組織および器官は、キメラ癌遺伝子ベクターの存在および発現パターンを確かめるために、D N A、R N A およびタンパク質分析により分析され得る。

#### 【 0 2 9 4 】

( 実施例 1 4 )

( h P S C A 上流配列および導入遺伝子を含むキメラベクターを保有するトランスジェニックマウス )

h P S C A 上流領域の制御下における導入遺伝子の発現パターンが試験される。この終わりの方で、h P S C A 上流配列および導入遺伝子を含むキメラベクターを保有するキメラマウスが生成される。導入遺伝子に作動可能に連結された 9 k b または 6 k b の h P S C A 上流配列を含むキメラベクターを構築し、そして図 4 5 に概要的に表される。その導入遺伝子は S V 4 0 ポリアデニル化配列 ( P S C A ( 9 k b ) - G F P および P S C A ( 6 k b ) - G F P ) に連結された緑色蛍光タンパク質 c D N A ( G F P , C l o n t e c h )、m R N A ( P S C A ( 9 k b ) - G F P - 3 ' h G H および P S C A ( 6 k b ) - G F P - 3 ' h G H ) ( B r i n s t e r ら 1 9 8 8

P N A S 8 5 : 8 3 6 - 8 4 0 ) に対して安定性を与えるイントロンカセットを含むヒト成長ホルモンの 3 ' 領域に連結される緑色蛍光タンパク質 c D N A およびイントロン ( P S C A ( 9 k b ) - S V 4 0 T A G および P S C A ( 6 k b ) - S V 4 0 T A G ) ( B r i n s t e r ら 1 9 8 4

C e l l 3 7 : 3 6 7 - 3 7 9 ) を含む S V 4 0 スモールおよびラージ T 抗原体をコードするゲノムフラグメントを含んだ。

#### 【 0 2 9 5 】

キメラベクターを使い、ファウンダートランスジェニックマウスの系統を生成した。直線化されたキメラベクターを C 5 7 B L / 6 X C 3 H ハイブリッドマウスの異種交配に由来するマウス受精卵の中へ微量注入した。キメラベクター保有のファウンダーマウスを、プローブとして G F P c D N A または S V 4 0 ゲノム D N A を使用して、テール D N A のサザン分析により同定した。各々のトランスジェニックマウス系統のファウンダーの数は図 4 5 の右パネルに示される。

#### 【 0 2 9 6 】

( 実施例 1 5 )

( トランスジェニックマウス中の導入遺伝子の h P S C A 上流配列駆動発現 )

P S C A ( 9 k b ) - G F P 導入遺伝子を保有する 2 つの独立したファウンダーマウスを、その子孫を得るために B a l b / c マウスと交配させた。8 週齢および 1 2 週齢で、雄および雌のトランスジェニック同腹子または非トランスジェニック同腹子を屠殺した。屠殺後、泌尿生殖器全体および他の組織を蛍光照明下で固定組織を観測することにより G F P 発現について試験した。図 4 6 に示される結果は、非トランスジェニックマウスおよびトランスジェニックマウス由来の前立腺、膀胱および皮膚組織の緑色蛍光画像を示す。2 つのファウンダー系統のうちの 1 つが前立腺、膀胱および皮膚中に G F P タンパク質を発現した ( 図 4 6 )。G F P を発現しなかった組織としては：精囊、肝臓、胃、腎臓、肺、脳、精巣、脾臓、心臓、骨格筋、小腸、結腸、胎盤が挙げられる。

#### 【 0 2 9 7 】

( 実施例 1 6 )

( ヒトおよびマウス組織中の P S C A の転写発現パターン )

図 4 7 の上部パネルは、全長ヒト P S C A c D N A プローブを用いて厳密に調べられたヒト多重組織ノーザンブロット ( C l o n e t e c h から得られる ) を示す。その結果は、

ヒトPSCA転写物は、前立腺には豊富であり、および容易に検出可能であるが、胎盤には豊富でなく、しかし脾臓、胸腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、末梢血液白血球(PBL)、心臓、脳、肺、肝臓、筋肉、腎臓および膵臓には検出可能ではないことを実証する。

#### 【0298】

図47の下部パネルは、種々のマウス組織中のマウスのPSCA転写発現パターンの臭化エチジウム染色アガロースゲルのRT-PCR分析を示す。RT-PCRをUltraSpec.RNA(Biotex)およびcDNAサイクルキット(Invitrogen)を用いて調製した。PSCAのエキソン1およびエキソン3内の領域に対応するプライマーを使用して320bpフラグメントを増幅した。エキソン1プライマー配列は以下の通りである：

5'プライマー：5'-TTCTCCTGCTGGCCACCTAC-3'(配列番号：7)。エキソン3プライマー配列は以下の通りである：3'プライマー：5'-GCAGCTCATCCCTTCAACAAT-3'(配列番号：8)。種々のマウス組織から単離されたRNAサンプルの整合性を実証するために、コントロールとして、300bpG3PDフラグメントを増幅した。

#### 【0299】

図47の下部パネルに示された結果は、マウスPSCA転写物は、背側/外側前立腺、腹側前立腺、膀胱、胃(噴門、胃体および幽門)および皮膚中において検出され得ることを実証する。対照的に、マウスPSCA転写物は前方前立腺、腹側前立腺、精嚢、尿道、精巣、腎臓、十二指腸、小腸、結腸、唾液腺、脾臓、胸腺、骨髄、骨格筋、心臓、脳、眼、肺および肝臓中に検出されない。G3PDH結果は種々のマウス組織から単離された転写物はインタクトであったことを実証する。

#### 【0300】

本発明は、本明細書に開示された実施形態による範囲内に限定されず、これは、本発明の個々の局面の単一の例示と意図され、そして機能的に等価であるものはいずれも本発明の範囲内にある。本明細書に記載されたものに加えて、本発明のモデルおよび方法に対する種々の改変は、前述の記載および教示から当業者に対して明らかになり、そして本発明の範囲内に入ると同様に解釈される。このような改変または他の実施形態は本発明の真の範囲および精神から離れることなく実行され得る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0301】

【図1】ヒトPSCAをコードするcDNA(ATCC指定209612)のヌクレオチド配列(A)(配列番号：1)および翻訳されたアミノ酸(配列B)(配列番号：2)。

【図2】マウスPSCAホモログ(配列番号：4)をコードするcDNAのヌクレオチド配列(配列番号：3)。

【図3】ヒトPSCA(配列番号：2)、マウスPSCA(配列番号：6)およびヒト幹細胞抗原-2(hSCA-2)(配列番号：5)のアミノ酸配列のアラインメント。影の領域は、保存されたアミノ酸を強調する。保存されたシステインを太字で示す。PSCAにおける4つの予測されたN-グリコシル化部位を星印で示す。タンパク質の最初および最後の下線のアミノ酸は、それぞれ、N末端の疎水性シグナル配列およびC末端GPI係留配列を示す。

【図4】ヒトPSCAの疎水性プロット。

【図5】ヒトPSCAのチョウ-ファスマン(Chou-Fassman)分析。

【図6】モノクローナル抗体1G8が、LAPC9(PSCA陽性コントロール)および膀胱(Rob)と称される移行上皮癌(膀胱癌)に結合することを示すウェスタンブロット。

【図7】正常組織および癌組織におけるPSCA mRNAの制限された発現。A：前立腺、胎盤、および扁桃で高度な発現を示す正常ヒト組織におけるPSCA発現のRT-PCR分析。示された組織由来の1ngの逆転写された第1鎖cDNA(Clontech、PaloAlto、CA)を、PSCA遺伝子特異的プライマーを用いて増幅した。示

10

20

30

40

50

されたデータは、30サイクルの増殖からである。B：前立腺癌異種移植片および正常組織における高いレベルを実証する、PSCA発現のRT-PCR分析。示された組織由来の逆転写されたcDNAの5 ngがPSCA遺伝子特異的プライマーを用いて増幅された。- アクチン遺伝子特異的プライマーを用いた増幅は、種々のサンプルの第1鎖cDNAの規準化を示す。示されたデータは、25サイクルの増幅からである。AD、アンドロゲン依存性；AI、アンドロゲン非依存性；IT、脛骨内異種移植片；C.L.、細胞株。

【図8】ヒトPSCA、マウスPSCA、およびヒトThy-1/Ly-6遺伝子構造の模式図。

【図9A】PSCA RNAの発現のノーザンブロット分析。A：正常の前立腺およびLAPC-4アンドロゲン依存性（AD）前立腺癌異種移植片およびLAPC-4アンドロゲン非依存性（AI）前立腺癌異種移植片由来の総RNAを、PSCA特異的プローブまたはPSA特異的プローブを使用して分析した。等しいRNAローディングおよびRNA統合性を、18S RNAおよび28S RNAのエチジウム染色により別々に示した。

【図9B】PSCA RNAの発現のノーザンブロット分析。B：PSCA RNAのヒトの複数の組織のノーザンブロット分析。Clontech（Palo Alto, CA）よりフィルターを得た。そしてこのフィルターは、それぞれのレーンに2 µgのポリA RNAを含む。

【図10】前立腺癌異種移植片および腫瘍細胞株におけるPSCA、PSMAおよびPSAのRNAの発現のノーザンブロット比較。PSCAおよびPSMAは、高いレベルの前立腺癌特異的な遺伝子発現を示す。示された組織由来の10 µgの総RNAが、アガロース/ホルムアルデヒドゲルにおいてサイズ分画され、ニトロセルロースに移され、そして続いてPSCA、PSMAおよびPSAのcDNAフラグメントを表す<sup>32</sup>Pで標識されたプローブと順次ハイブリダイズされた。膜の4時間および72時間のオートラジオグラフィーの露出、およびサンプルの等しいローディングを示す臭化エチジウムゲルを示す。BPH、良性前立腺過形成；AD、アンドロゲン依存性；AI、アンドロゲン非依存性；IT、脛骨内異種移植片；C.L.、細胞株。

【図11】正常前立腺標本および悪性前立腺標本におけるヒトPSCA RNAに対するアンチセンスリボプローブとのインサイチュハイブリダイゼーション。A：PSCA RNAは、基底細胞上皮内の基底細胞の部分集合により発現される（黒矢印）が、前立腺管の内側を覆う最後まで分化した分泌細胞により発現されない（拡大率400×）。B：PSCA RNAは、高い程度の前立腺上皮内腫瘍（PIN）により強く発現され（黒矢印）、侵襲性前立腺癌腺により強く発現される（黄矢印）が、正常の上皮においては、拡大率40倍で検出可能でない（緑矢印）。C：高い程度の癌の場合におけるPSCA RNAの強い発現（拡大率200×）。

【図12A】PSCAタンパク質の生化学的分析。A：PSCAタンパク質を、材料および方法に記載されたように、PSCA構築物を用いて一時的にトランスフェクトされ、次いで、N-グリコシダーゼFまたはO-グリコシダーゼのどちらかを用いて消化した293T細胞から免疫沈降した。

【図12B】PSCAタンパク質の生化学的分析。B：PSCAタンパク質をトランスフェクトされた293T細胞、ならびこれらの細胞の訓化培地から免疫沈降した。細胞関連PSCAは、15%ポリアクリルアミドゲルにおいて、分泌されたPSCAまたは脱落したPSCAより速く移動する。

【図12C】PSCAタンパク質の生化学的分析。C：アフィニティー精製されたポリクローナル抗PSCA抗体を使用して、偽トランスフェクトされた293T細胞、PSCAをトランスフェクトされた293T細胞およびLAPC-4前立腺癌異種移植片細胞のFACS分析。細胞は、表面の発現のみを検出するために透過処理されなかった。y軸は、相対的な細胞数を示し、そしてx軸は、対数的なスケールにおける蛍光染色強度を示す。

【図13】フィトヘマグルチニンで刺激した末梢血液リンパ球由来のヒト分裂中期細胞に対するビオチン標識PSCAプローブのインサイチュハイブリダイゼーション。第8染色

10

20

30

40

50

体ホモログは、矢印で同定される；特異的標識が、8q24.2に観察された。はめ込み図は、8q24.2での特異的な標識を例示する2つの第8染色体ホモログの部分的な核型を示す（矢尻）。画像は、冷却式電荷結合デバイス（CCD）カメラを連結したZeissAxioPhot顕微鏡を使用して得た。DAPI染色した染色体およびハイブリダイゼーションシグナルの別々の画像が、画像分析ソフトウェア（NU200およびImage1.57）を使用して合わされた。

【図14】抗PSCAモノクローナル抗体1G8（緑）および3E6（赤）、マウス抗PSCAポリクローナル血清（青）、またはコントロールの2次抗体（黒）を使用した、前立腺癌異種移植片（LAPC-9）、前立腺癌細胞株（LAPC-4）および正常な前立腺上皮細胞（PreC）についての細胞表面PSCAタンパク質発現のフローサイトメトリ分析。詳細は、実施例5を参照のこと。

【図15】（a）7つの開示された抗体のそれぞれのエピトープ地図。（b）抗PSCAモノクローナル抗体のエピトープ地図作成を、GST-PSCA融合タンパク質のウエスタンブロット分析により行った。

【図16】PSCAが、GPI係留タンパク質であることを示す模式図。ヒト幹細胞抗原-2（hSCA-2）（配列番号：5）、ヒトPSCA（配列番号：2）およびマウスPSCA（配列番号：6）。

【図17】前立腺癌におけるPSCAおよびc-mycの遺伝子コピー数のFISH分析を示す写真。

【図18】TC標識された1G8抗体が、PSCAでトランスフェクトされたLNCAP細胞上のFIPSCAタンパク質に強く結合することを示す写真。

【図19】FITC標識された1G8抗体がPreC細胞に弱く結合することを示す写真。

【図20】正常な前立腺基底細胞におけるPSCAのインサイチュRNAハイブリダイゼーションを示す写真。

【図21】原発性前立腺癌におけるPSCAの免疫染色。4人の患者由来の代表的なパラフィン包埋切片は、抗PSCA mAbを用いて染色された。患者1由来の標本は、グリーングレード（Gleason grade）4の腫瘍（矢印）におけるPSCAタンパク質の過剰発現を示し、そしてPSCA mAb 1G8を使用した隣接する正常な腺（くさび形）におけるPSCAの検出不可能な発現を示す。陽性染色の癌は、正常な腺を完全に包囲する。患者2由来の標本は、グリーングレード3+3/4の癌における異質な染色を示す。グリーンスパターン3の腺（くさび形）は、より大きな癌と比較して弱く染色し、さらなる有孔形態はグリーンスパターン3/4の腺（矢印）を表す。患者3由来の標本は、mAb 1G8を用いた弱く分化したグリーンス5（矢印）の腫瘍によってPSCAの強い発現を示す。患者4は、弱く分化した腫瘍（くさび形）の大部分においてPSCAが染色していないこと、および標本中で同定された有孔形態の病巣において極度に弱く染色していることを示している生検標本である。患者4由来の一致した骨性転移は、図28に示される。

【図22】ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジンに連結したビオチン化された1G8モノクローナル抗体により決定された場合の、前立腺癌の骨性転移を示す骨サンプルの写真。

【図23】ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジンに連結したビオチン化された1G8モノクローナル抗体により決定された場合の、前立腺癌の骨性転移を示す骨サンプルの写真。

【図24】ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジンに連結したビオチン化された3E6モノクローナル抗体により決定された場合の、前立腺癌の骨性転移を示す骨サンプルの写真。

【図25】LAPC9および進行型膀胱癌の移行細胞癌におけるPSCA RNAの増加したレベルを示すノーザンブロット。

【図26】ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジンに連結した

10

20

30

40

50

ビオチン化された 3 E 6 モノクローナル抗体により決定された場合の初期段階にある前立腺癌の組織の写真。

【図 2 7】ヘマトキシリン染色された 3 E 6 モノクローナル抗体により決定された場合の前立腺癌の骨性転移を示す骨サンプルの写真。

【図 2 8】骨性転移の前立腺癌における P S C A の免疫染色。上のパネルは、患者 5 由来の骨性病巣 ( b o n y l e s i o n ) のヘマトキシリン染色およびエオシン染色 ( 左 ) ならびに P S C A ( 右 ) 染色を示す。癌の疑いがある単一の病巣 ( 矢印 ) は、H 切片および E 切片において同定され、そして抗 P S C A m A b 1 G 8 を用いて強烈に染色することによって確認された ( 矢印 ) 。下のパネルは、患者 4 由来の骨性病巣の H 染色および E 染色 ( 左 ) ならびに P S C A 染色 ( 右 ) 示す。患者 4 由来の原発性病変は、図 2 1 に示される。H 染色および E 染色ならびに P S C A 染色の両方は、前立腺癌 ( 矢印 ) による拡散性の骨性併発を示す。再び、骨性転移における P S C A 免疫染色は均一かつ強烈である。

【図 2 9】ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン連結したビオチン化された 1 G 8 モノクローナル抗体によって決定された場合の、前立腺癌の初期段階にある組織の写真。

【図 3 0】ヘマトキシリン染色により決定された場合に、1 G 8 が、L A P C 9 細胞に結合することを示す写真。

【図 3 1】1 G 8 が、P S C A でトランスフェクトされた L n C a P 細胞に結合することを示す写真。

【図 3 2】1 G 8 が、L n C a P 細胞 ( P S C A でトランスフェクトされていない ) に結合しないことを示す写真。

【図 3 3】m A b 1 G 8、2 H 9、3 H 6、3 C 5、および 4 A 1 0 を使用した非透過化処理した L A P C - 9 ヒト前立腺癌細胞の細胞表面上の P S C A のフローサイトメトリー認識。染色は、無関係のアイソタイプコントロール抗体と比較された。

【図 3 4】P S C A を用いて過渡的にトランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞および P S C A モノクローナル抗体を用いてイムノプロットされた 2 9 3 T 細胞を示す写真。モノクローナル抗体 2 H 9 および 3 E 6 は、2 9 3 T 細胞において、脱グリコシル化された P S C A に結合するが、グリコシル化された P S C A には結合しない。対照的に、モノクローナル抗体 1 G 8、3 C 5 および 4 A 1 0 はグリコシル化された P S C A を認識する。

【図 3 5】非透過化処理した前立腺癌細胞における P S C A の細胞表面発現を示す免疫蛍光分析。L N C a P 細胞は、安定して P S C A でトランスフェクトされ、そして m A b 1 G 8、3 E 6、3 C 5 および 4 A 1 0 を用いて染色された。ネガティブコントロールは、無関係のアイソタイプ抗体を含み、そして L N C a P 細胞はコントロールベクターを用いてトランスフェクトされ、その全ては、延長した曝露後でさえ、染色を示さなかった。

【図 3 6】L A P C 9 細胞に結合するモノクローナル抗体 2 H 9 を示す写真。

【図 3 7】抗 P S C A m A b の免疫学的反応性を示す写真。( A ) m A b 1 G 8、2 H 9、3 C 5、3 E 6 および 4 A 1 0 を用いて P S C A で過渡的にトランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞由来の P S C A の免疫沈降。コントロールは、無関係のマウス I g G m A b であった。( B ) 5 つの抗 P S C A m A b を使用した P S C A を用いて過渡的にトランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞のイムノプロット分析。m A b 1 G 8、3 C 5 および 4 A 1 0 は全て、P S C A の等分子形態を認識し、ここで、このアッセイにおいて m A b 2 H 9 および 3 E 6 は、2 9 3 T - P S C A 細胞における P S C A の脱グリコシル化された形態をわずかに認識するのみである。

【図 3 8】抗 P S C A m A b を用いた正常な前立腺の免疫組織化学的染色。実施例は、ネガティブコントロールとして、無関係のアイソタイプ抗体を用いて染色された正常腺 ( 矢印 )、P S C A m A b 3 E 6 および m A b 1 G 8 を含むことを示した。分泌細胞 ( くさび形 ) と比較した場合、P S C A m A b 3 E 6 は、優先的に基底細胞 ( 矢印 ) を染色し、一方、m A b 1 G 8 は、基底細胞 ( 矢印 ) および分泌細胞 ( くさび形 ) の両方を等しく染色する。P S C A m A b 2 H 9 を用いて染色された正常前立腺標本由来の萎縮性の単一層状腺の強い染色もまた示される。

10

20

30

40

50

【図 3 9】正常な組織における P S C A タンパク質の発現。( A ) パネル a は、m A b 1 G 8 を用いた膀胱の過渡的な上皮の染色を示す。パネル b は、m A b 1 G 8 を用いて染色した結腸神経内分泌細胞を示す。クロモグラニンを用いた二重染色は、陽性細胞は、神経内分泌起源であることを明らかにした(示されていない)。パネル c は、m A b 3 E 6 を用いた集合管(矢印)および細管の染色を示す。パネル d は、m A b 3 E 6 を用いた胎盤栄養膜の染色を示す。( B ) P S C A m R N A 発現のノーザンブロット分析。正常な前立腺、腎臓、膀胱および L A P C - 9 前立腺癌異種移植片に由来する総 R N A は、P S C A 特異的プローブを使用して分析された(上のパネル)。同膜は、負荷差異のコントロールに対してアクチンを用いてプローブされた(下のパネル)。

【図 4 0】マウス P S C A 遺伝子の標的化。( A ) パネル a は、P S C A 標的化ベクターを作製するためのストラテジーを示す模式図である。( B ) パネル b は、野生型( + / + ) E S 細胞および異種接合型( + / - ) E S 細胞の回復を示す 3 ' プローブを使用したゲノム D N A のサザンブロット分析の写真である。

【図 4 1】上方のパネルは、前立腺癌のトランスジェニックマウスのモデルを産生するためのストラテジーの模式図である。下方のパネルは、前立腺癌の存在するトランスジェニックマウスのモデルの一覧表である。

【図 4 2】トランスフェクションアッセイのためのレポーター遺伝子構築物を示す模式図。

【図 4 3】増加した遺伝子発現活性を有する、9 k b ヒト P S C A 上流調節領域の組織優勢発現(前立腺細胞および膀胱細胞)を示す棒グラフ。

【図 4 4】増加した遺伝子発現活性を有する、P S C A 上流領域(すなわち、9 k b、6 k b、3 k b および 1 k b の P S C A 領域)中の前立腺優勢発現エレメントを同定する棒グラフ。

【図 4 5】検出可能なマーカーに作動可能に連結した 9 k b または 6 k b のヒト P C S A 上流領域のいずれかを含むトランスジェニックベクターの設計を示す模式図。

【図 4 6】9 k b P S C A 上流領域が、インピボで前立腺、膀胱および皮膚におけるレポーター遺伝子の発現を駆動することを示す写真。

【図 4 7】ヒトおよびマウスの P S C A R N A の組織特異的発現パターンを示す多組織ノーザンブロット分析の写真。

10

20

【図 1】

FIG. 1A

```

1  agggagagggc agtgaccatg aaggctgtgc tgcctgccct gttgatggca
51  ggcttgggccc tgcagccagg cactgccctg ctgtgctact cctgcaaaag
101 ccaggtgagc aacyaggact gctgcaggt ggagaactyc acccagctgg
151 gggagcagtg ctggaccgag cgcacccgag cagttggcct cctgaccgtc
201 atcagcaaaag gctgcagctt gaactgcgtg gatgactcac aggactacta
251 cg'tgggcaag aagaacatca cgtgctgtga caccgacttg tgcacgcca
301 gcggggccca tgcctgcag cggcctgccg ccatccttgc gctgctccct
351 gcactcgccc tgcctgctg gggaccgggc cagctaagg ctcctgggggg
401 ccccgctgca gccacacatg ggtgtggtgc cccaggcctt tgtgccactc
451 ctcacagaac ctggccagtg gggagcctgt cctggttcct gaggcacate
501 ctaacgcaag tttagcattg tatgtttgca ccccttttcc cnaaccctg
551 accttcccat gggccttttc caggatteen accnggcaga tcagttttag
601 tganacanat ccgcntgcag atggcccttc caaccttttn tgttngttt
651 tccatggccc agcatttttc accttaacc ctgtgttcag gcactnttc
701 ccccgaggag ccttccctgc ccacccatt tatgaattga gccaggtttg
751 gtcctgtgtg tccccgcac ccagcagggg acaggcaatc aggagggccc
801 agtaaggctc gagatgaagt ggactgagta gaactggagg acaagagttg
851 acgtgagttc ctgggagttt ccagagatgg ggcctggagg cctggaggaa
901 gggggccagg ctcacatttg tgggntccc gaattggcag ctgagcacag
951 cgtaggccct taataaacac ctgttggata ayyccaaaaa aaaaaaaa

```

FIG. 1B

```

MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQV
ENCTQLGEGQCWTARIRAVGLLTIVISKCSLNCVDDSD
QDYVVGKKNITCDDTDLNCAHAHALQPAATLALLPAL
GLLLWGPGL

```

【図 3】

FIG. 3

```

1  MKIFLPVLLAALLGVERASS hSCA-2
1  MKAVLLALLMAGLALQPGTA hPSCA
1  MKTFLFLLLATYLLALHPGAA mPSCA

21  LMCFSCLNQKSN*LYCLKPTI
21  LLCYSCKAQVSN*EDCLQVEN*
21  LQCYSCTAQMN*NRDCLNVQN*

41  CSDQDNYCVTVSASAGIGNL
41  CTQLGEGQCWTARIRAVGLLT
41  CSLDQHSCFTSRIRAIGLVT

61  VTFGHSLSKTCSPACPIPEG
61  V - - - - ISKGC SLNCVDDSD
61  V - - - - ISKGCSSQCEDDSE

81  VNVGVASMGISCCQSFLCN*F
76  DYYVGKK - N*ITCDDTDLN*A
76  NYYLGGK - N*ITCCYSDLCN*V

101 SAADGGGLRASVTLGLGAGLLL
95  SGAHALOPAAAILALLPALG
95  NGAHT LKPPITLGLLTVLCS

121 SLLPALLLRFGP
115 LLLWGPGL - -
115 LLLWGSRL - -

```

【図 2】

FIG. 2

```

1  ATGAAGACAGTTTTTTTATCCTGCTGGCCACCTACTTAGCCCTGCATCCAGGTGCTGCT
1  TACTTCTGTCAAAAAAATAGGACGACCGGTGGATGAATCGGGACGTAGGTCCACGACGA
60  M K T V F F I L L A T Y L A L H P G A A

61  CTGCAGTGTCTATTCATGACAGCACAGATGAACAAACAGAGACTGTCTGAATGTACAGAAC
120  GACGTACAGATAAGTACGTGTCTGTCTACTTGTGTCTCTGACAGACTTACATGTCTTG
121  L Q C Y S C T A Q M N N R D C L N V Q N

121  TGCAGCCTGGACGAGACAGTGTCTTACATCGGCGATCGGGCCATTGGACTCGTGACA
180  ACGTGAGACCTGGTGTGTCAACGAATGTASCGCGTAGGCCCGTAACCTGAGCACTGT
181  C S L D Q H S C F T S R I R A I G L V T

181  GTTATCAGTAAGGGCTCAGCTCACAGTGTGAGGATGACTCGGAGAAGTACTATTGGGC
240  CAATAGTCATTCCGACGTGAGTGTACACTCTACTGAGCCTCTTGATGATAAACCCG
241  V I S K G C S S Q C E D D S E N Y Y L G

241  AAGAAGAACATCAAGTGTCTACTCTGACCTGTGCAATGTCAACGGGGCCACACCTG
300  TTCTCTGTAGTGACGACGATGAGACTGGACAGCTTACAGTTGCCCGGGTGTGGGAC
301  K K N I T C C Y S D L C N V R S A H F L

301  AAGCCACCCACACCTGCGGCTGTGACCTGTCTGACGCTGTGCTTGTGCGGGCTTC
360  TTCGTGGGTGTGGGACCCGACGACTGGACGAGAGCTGGACACGACACCCGAGG
361  K P P T T L G L L T V L C S L L L W G S

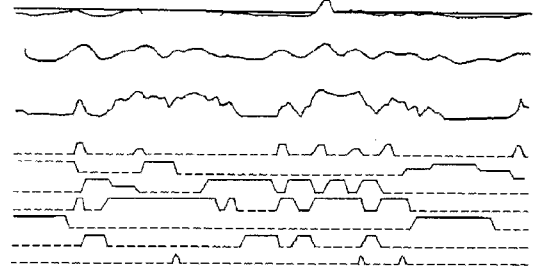
361  AGCCGTCTGAGGCTGTGGGAGAGCTACCATAGCCGATTGTGAAGGATGAGCTGCAC
420  TCGGCAGACATCCGAGACCTCTCGGATGGTATCGGGTAAGTACTTCTACTGAGCTG
421  S R L *

421  TCCACCCACCCACACAGG
441  AGGTGGGTGGGGGTGTGTCC

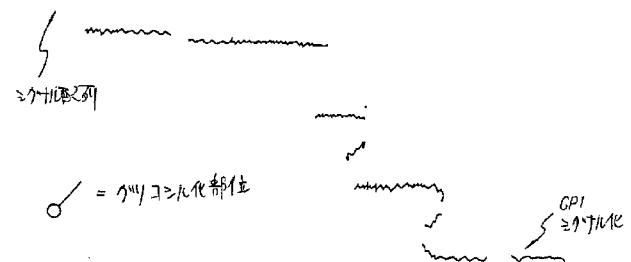
```

【図 4】

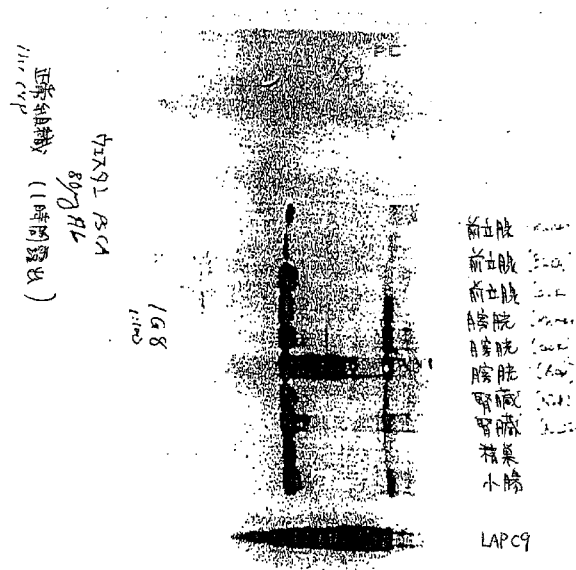
FIG. 4



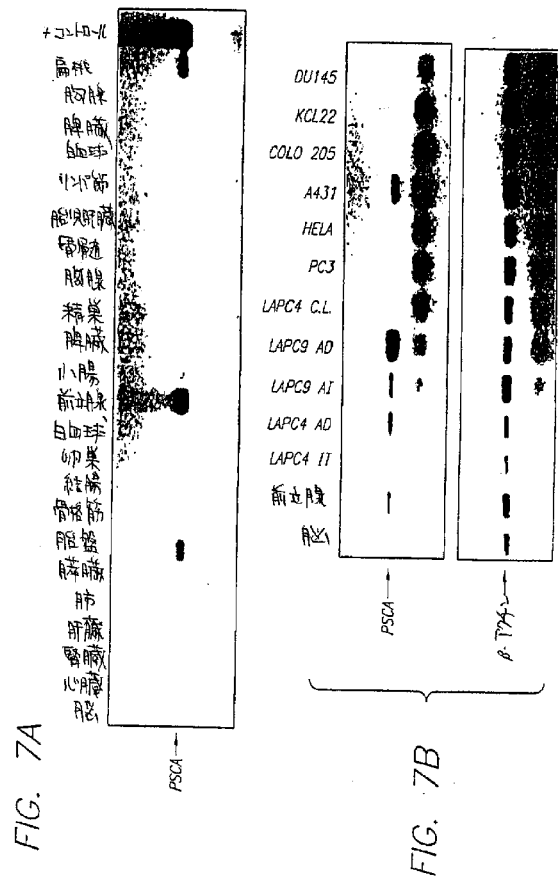
【図 5】



【 図 6 】



【 図 7 】



【圖 8】

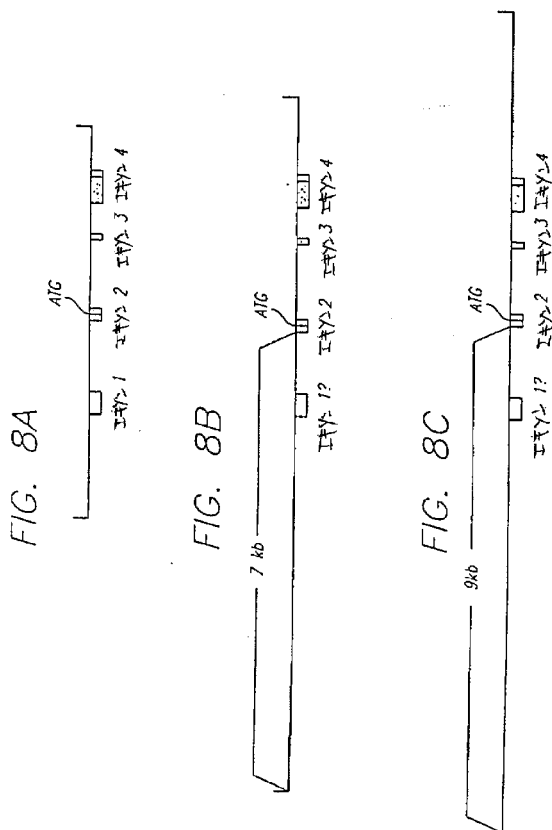


FIGURE 8

【 図 9 A 】

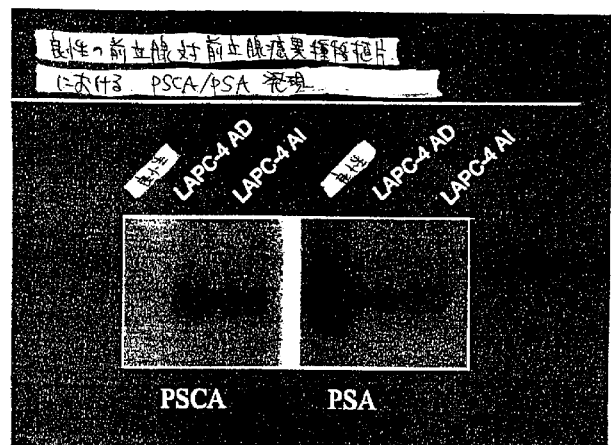


FIGURE 9A



【図 9 B】

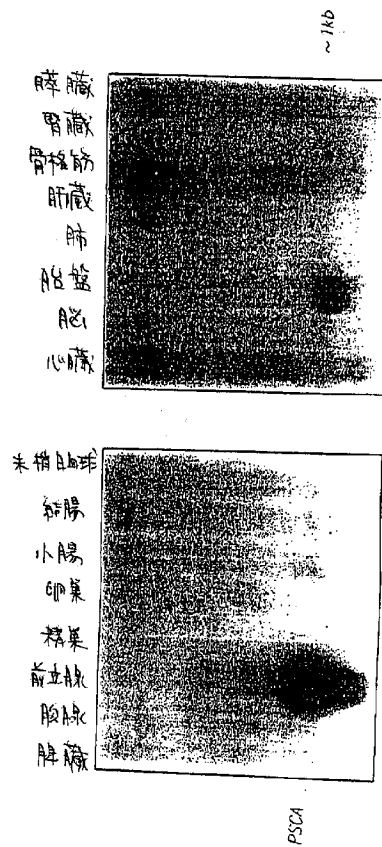


FIG. 9B

【図 10 - 1】

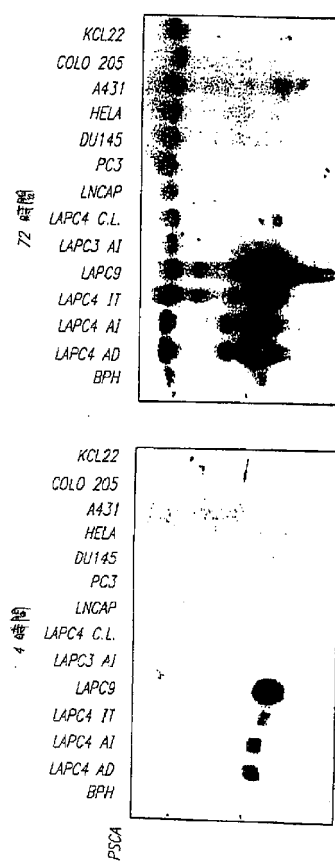


FIG. 10-1

【図 10 - 2】

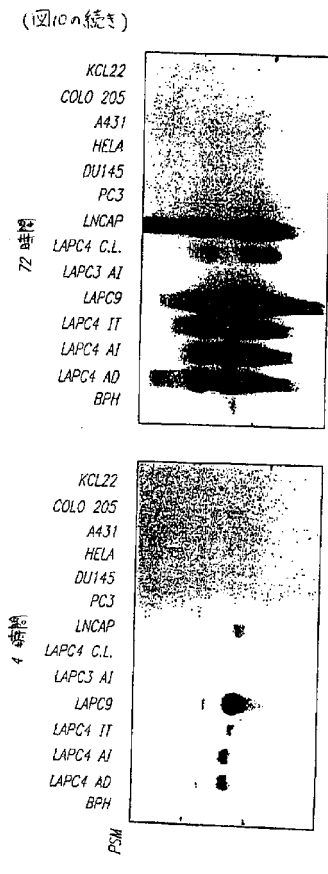


FIG. 10-2

【図 10 - 3】

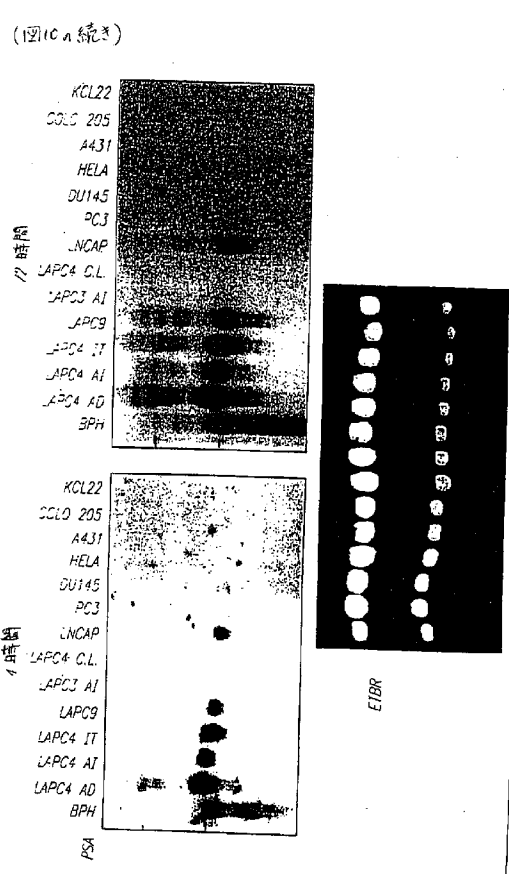


FIG. 10-3

【図 11 A B】

FIG. 11A

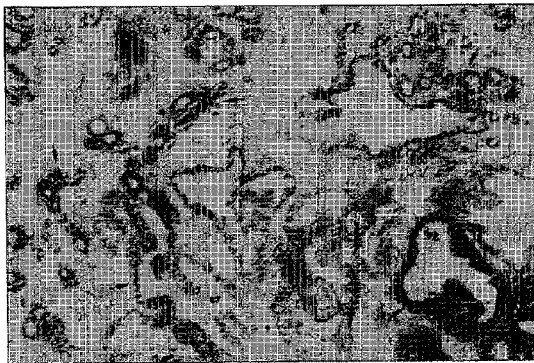
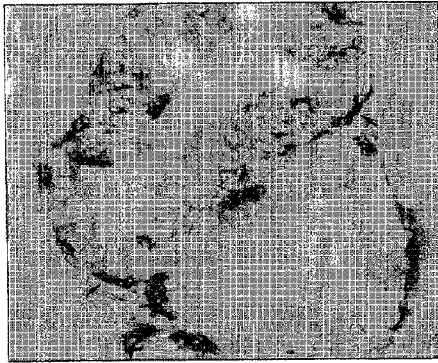


FIG. 11B

【図 11 C】

PSCA EXPRESSION IN HIGH GRADE  
PROSTATE CANCER



FIG. 11C

【図 12 A】

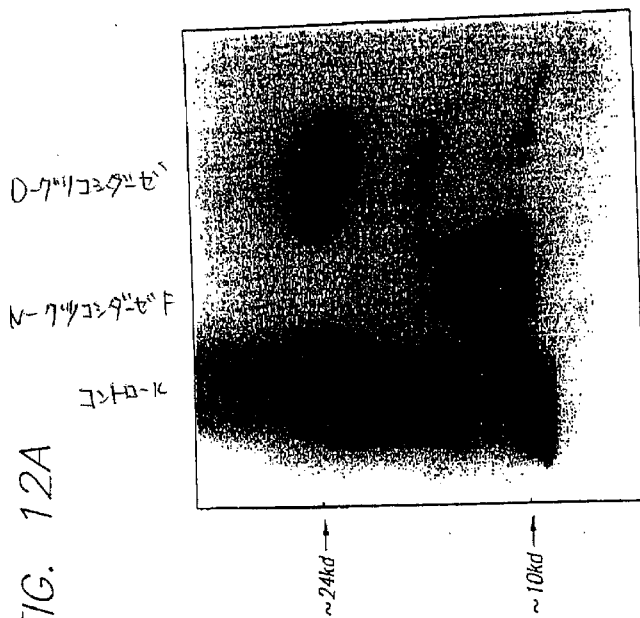


FIG. 12A

【図 12 B】

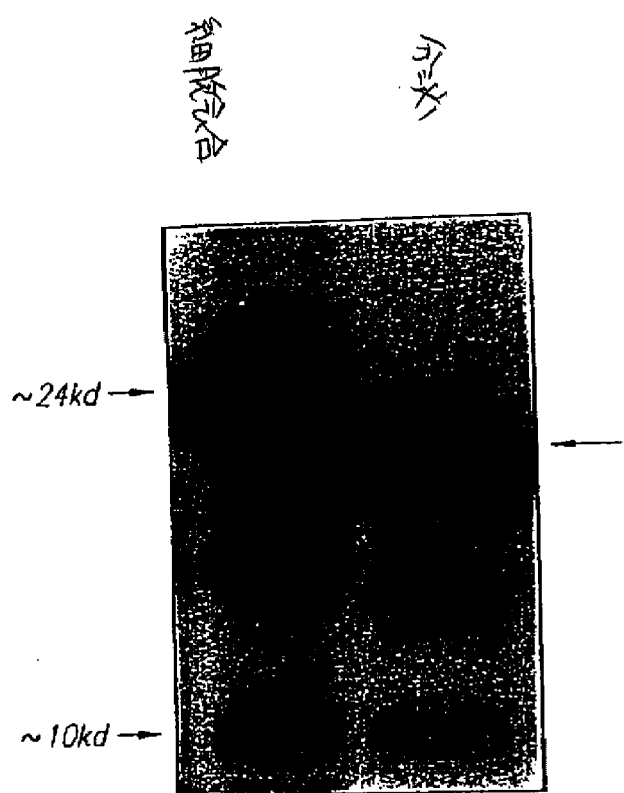


FIG. 12B

【図 12 C】

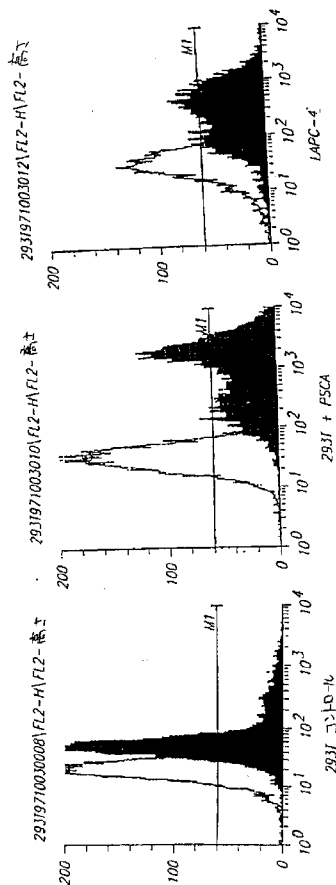


FIGURE 12C

【図 14】

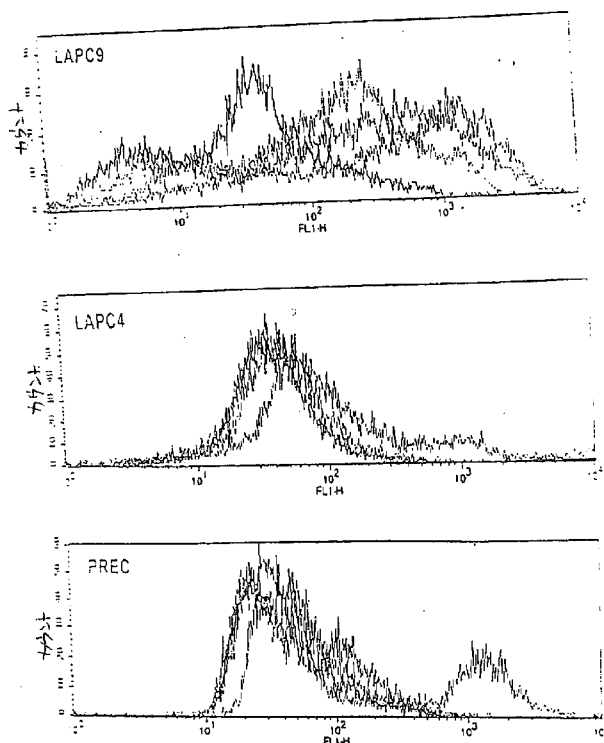


FIGURE 14

【図 13】

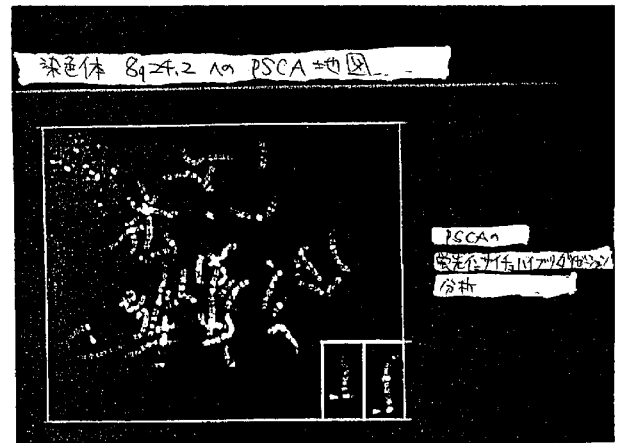
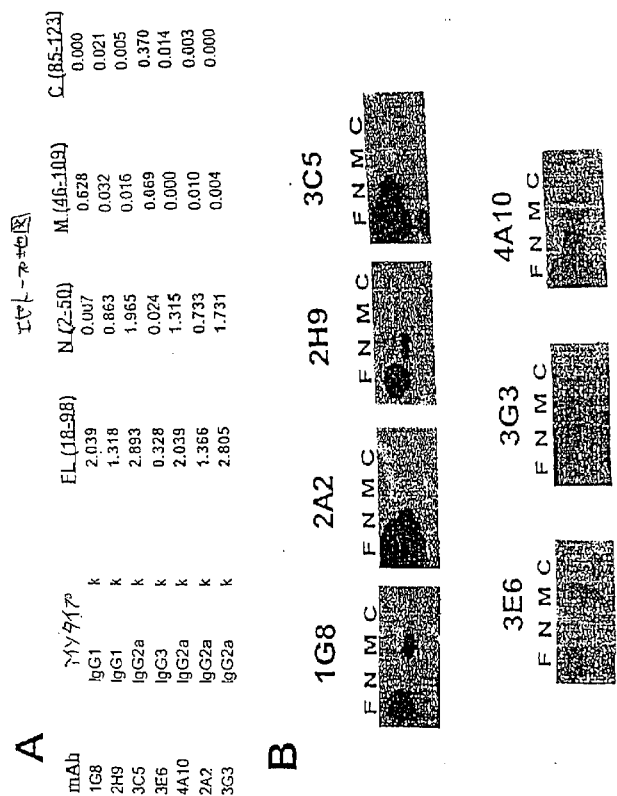


FIGURE 13

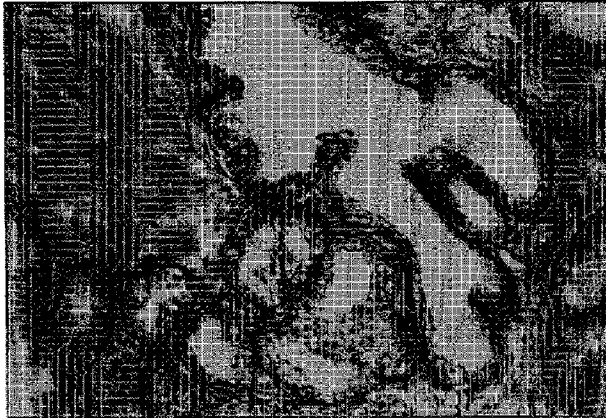
【図 15】





【図 20】

FIG. 20



【図 21】

原発性腫瘍の PSMA 免疫染色

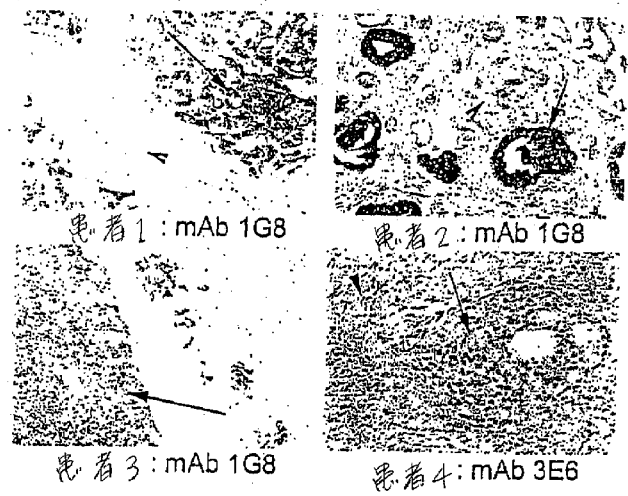
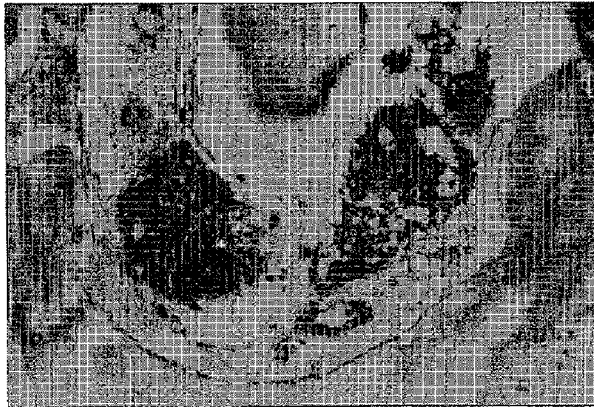


FIGURE 21

【図 22】

FIG. 22



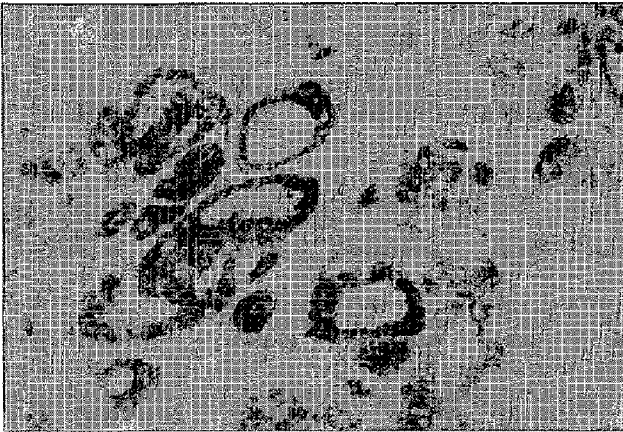
【図 23】



FIG. 23

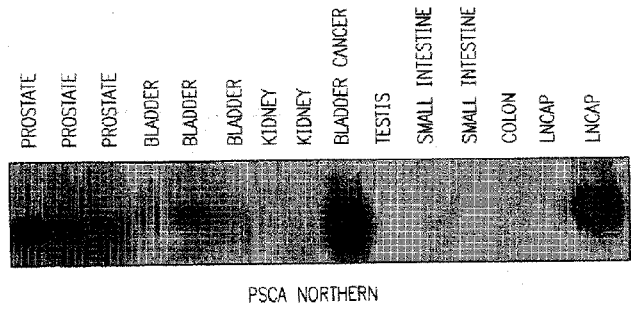
【図 24】

FIG. 24



【図 25】

FIG. 25



【図 26】

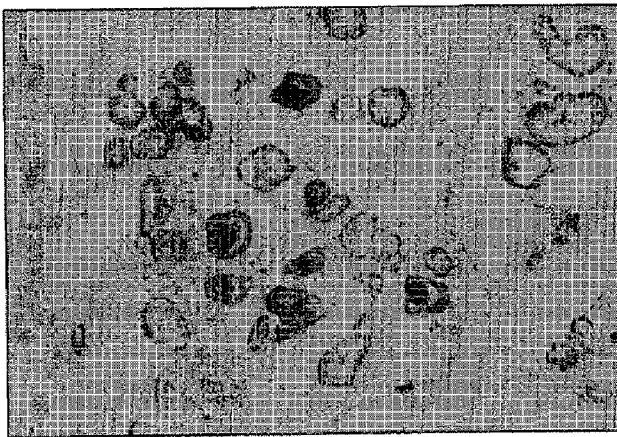


FIG. 26

【図 27】



FIG. 27

【図 28】

骨性転移の PSMA 免疫染色

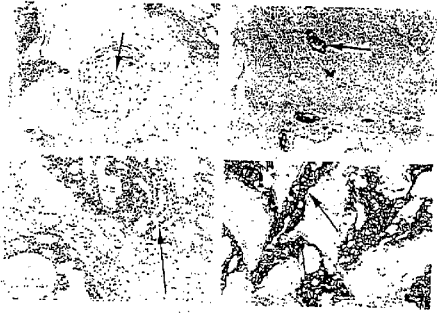
患者5: Hsp50E  
Tubulin mAb 198患者4: Hsp50E  
Tubulin mAb 3E6

FIGURE 28

【図 29】

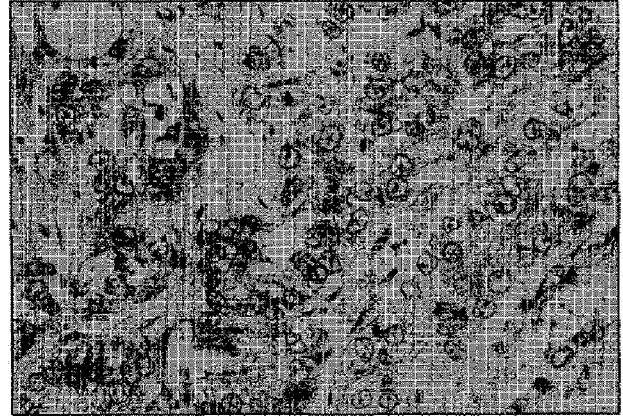
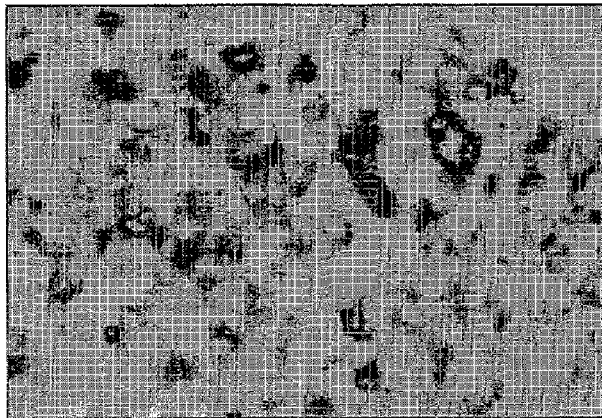


FIG. 29

【図 30】

FIG. 30



【図 31】

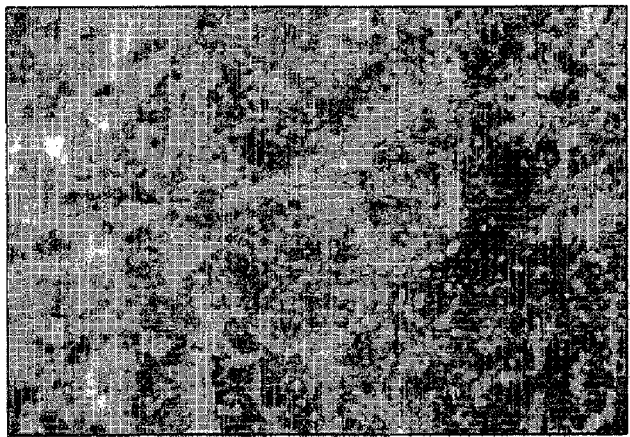
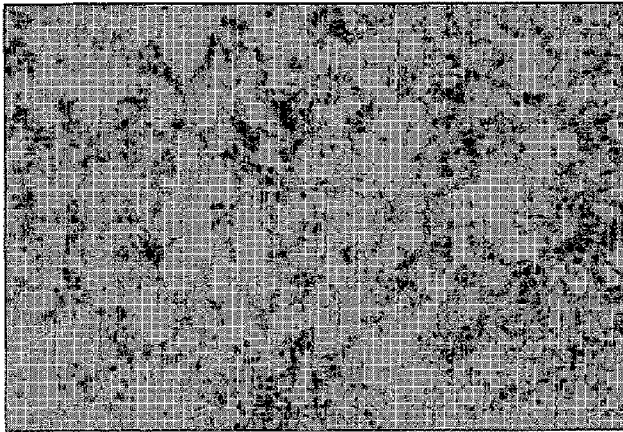


FIG. 31



【図 3 2】

FIG. 32



【図 3 3】

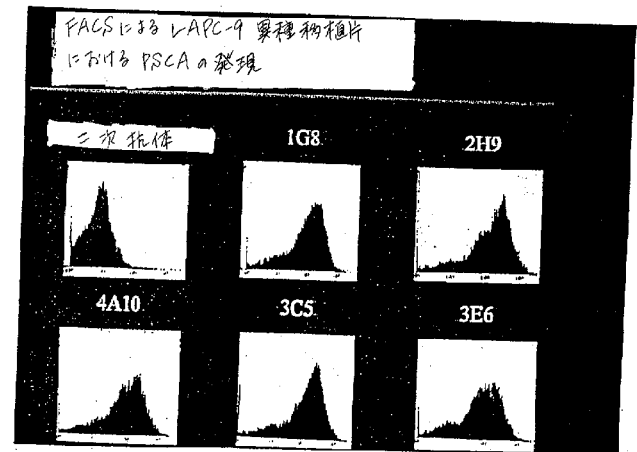


FIGURE 33

【図 3 4】

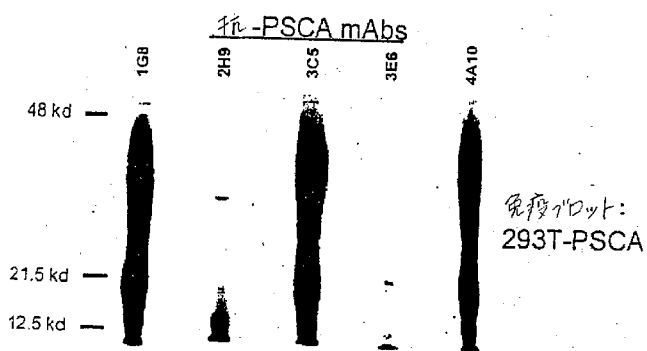


FIGURE 34

【図 3 5】

LNCaP-PSCA 細胞の免疫蛍光染色

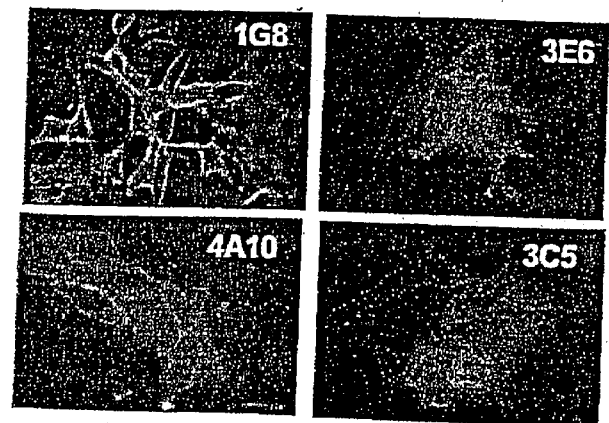


FIGURE 35



【図 36】



FIG. 36

【図 37】

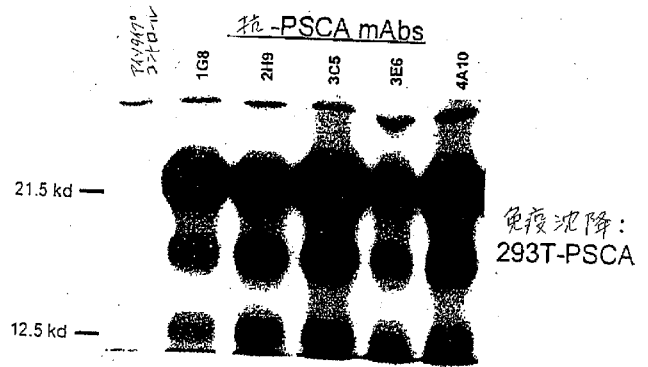
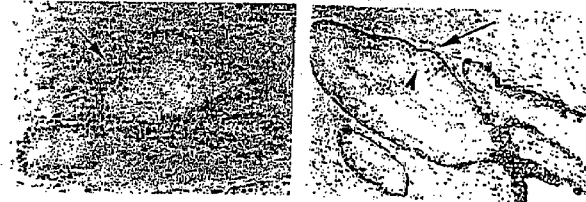


FIGURE 37

【図 38】

正常前立腺の免疫組織化学的染色

正常: 免疫組織化学的染色 正常 PSCA mAb 3E6



正常: PSCA mAb 1G8 癌性: PSCA mAb 2H9



FIGURE 38

【図 39】

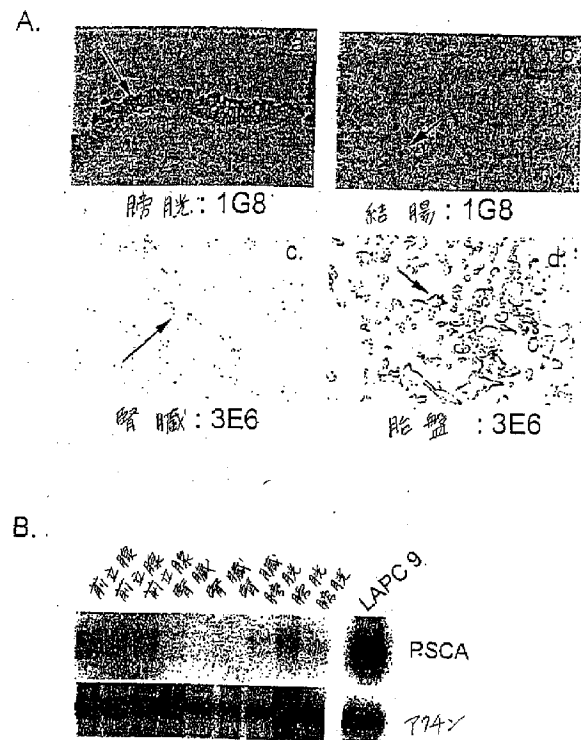


FIGURE 39





【配列表】

2009159973000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/534 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/533 (2006.01)	G 0 1 N 33/534	
G 0 1 N 33/535 (2006.01)	G 0 1 N 33/533	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/535	
	G 0 1 N 33/574	A

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 レイター, ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 2 4 - 6 0 1 7, ロサンゼルス, キナード アベニ  
ュー 1 0 5 1 1

(72)発明者 ウィット, オーウェン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 4 0 3, シャーマン オークス, サットン ストリー  
ト 1 4 7 2 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA43 CA04 CA20 DA02 GA03 GA11 HA14  
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS34  
 4B064 AG27 CA20 CC24 DA01  
 4C085 AA14 BB01 CC23 CC24  
 4H045 AA11 BA10 DA50 DA76 EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	psca：前列腺干细胞抗原及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009159973A</a>	公开(公告)日	2009-07-23
申请号	JP2009047489	申请日	2009-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	レイターロバート ウィットオーウェン		
发明人	レイター, ロバート ウィット, オーウェン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/46 C12Q1/68 C12P21/08 A01K67/027 A61K39/395 A61P43/00 G01N33/534 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/574 A01K67/02 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P15/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16 /30 C12N5/10 C12N5/20 C12N15/12 C12P21/00 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P15/00 C07K14/4748 C07K14/705 C07K16/3069 G01N33/57434		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.B C12N15/00.C C07K14/705 C07K16/28 C07K16/46 C12Q1/68.A C12P21/08 A01K67/027 A61K39/395.N A61P43/00.105 G01N33/534 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/574.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024 /GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4C085 /AA14 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085/CC24 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	09/203939 1998-12-02 US 09/251835 1999-02-17 US 09/318503 1999-05-25 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种新型的前列腺细胞表面抗原，一种针对前列腺干细胞抗原的单克隆抗体，一种检测/诊断和治疗的方法。它被称为前列腺干细胞抗原（PSCA），在前列腺癌的所有阶段都广泛表达，包括高度前列腺上皮内瘤变（PIN），雄激素依赖性和雄激素非依赖性前列腺肿瘤。一种新型的前列腺细胞表面抗原。PSCA特异性单克隆抗体和多克隆抗体，以及用于前列腺癌的免疫治疗和其他治疗方法。[选型图]图1

FIG. 1A

```

1  agggagaggg agtggccatg aaggctatgc tggthgccc ttggatggc
51  ggcttgagcc cccagccag cactgccctg ctactctact cctgaaagt
101  ccaggtaggc aacgaggact gccctggcgt ggggaactgc acccagcttg
151  ggcacacatg ctggaccgca ggcctcggcg caattggctt cctgacatc
201  atccacaaag gttggagact gacctggcgt gacgactcac agaatatcc
251  cgtgggaaag aggacatca cgtgcttga caccgactga tccaaagcca
301  ggggggccc cccctgacg cgggctcga ccatcttcg acctccct
351  ggaactgagc taccctctc ggaacccggt cagctataga ctccagagc
401  cccactaca accccacatg ggtggtcttc cccagacctt tctgaactc
451  ctccagagc ctggccagc gggacattct cctgcttcct agacacac
501  ctacccagc ctggccagc tatctctgca cccctcttc ccaaccctg
551  accttcacat aggccttct caggcttctt accgagaga ttagcttag
601  tgaacacat cagctgagc atggccctc caccacttc agttgattt
651  cccatggagc agcatttcc accctcac cttgttccg gaactattc
701  cccagggag cctcccttc cccacact tatgactga cccagcttg
751  gtcctggctg tcccccagc cccagaggg agacacac agcagggcc
801  agtccaggtt ggtatgagc ggcctgagc aaactgggg cccagcttg
851  accgagttc ctgggattt cccggttgg ggcctgggg cctgagagc
901  ggggcagcc ctacattg tgggcttcc gactgtatg cctggcagc
951  cttggctct tcatcaacc ctgttgcta gttcaaaa ccaaaacc

```

FIG. 1B

```

MRAVLLALEMRLALBPFTALLCYSDKADVSHEDCLQV
ENCTQLSBOCHTARIBANGLLTVZINQCCINPVDS
QDYFNGKKKICTCSTNLCHASGAHALQPAALILALLMAL
GLLWGPWGL

```