

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4827357号
(P4827357)

(45) 発行日 平成23年11月30日(2011.11.30)

(24) 登録日 平成23年9月22日(2011.9.22)

| | |
|---------------------------------|-----------------------|
| (51) Int.Cl. | F I |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| A O 1 K 67/027 (2006.01) | A O 1 K 67/027 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 O 1 |
| A 6 1 K 39/00 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 O 2 |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/00 H |
| 請求項の数 28 (全 112 頁) 最終頁に続く | |

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2001-541031 (P2001-541031) | (73) 特許権者 | 500553659 |
| (86) (22) 出願日 | 平成12年12月6日(2000.12.6) | | アジェンシス、インコーポレイテッド |
| (65) 公表番号 | 特表2003-517306 (P2003-517306A) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア 904 |
| (43) 公表日 | 平成15年5月27日(2003.5.27) | | 04, サンタ モニカ, コロラド ブ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2000/033040 | | ールバード 2225 |
| (87) 国際公開番号 | W02001/040276 | (74) 代理人 | 100102978 |
| (87) 国際公開日 | 平成13年6月7日(2001.6.7) | | 弁理士 清水 初志 |
| 審査請求日 | 平成19年12月3日(2007.12.3) | (74) 代理人 | 100119507 |
| (31) 優先権主張番号 | 09/455,486 | | 弁理士 刑部 俊 |
| (32) 優先日 | 平成11年12月6日(1999.12.6) | (74) 代理人 | 100128048 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 新見 浩一 |
| 微生物の受託番号 | ATCC PTA-311 | (74) 代理人 | 100129506 |
| 前置審査 | | | 弁理士 小林 智彦 |
| | | (74) 代理人 | 100130845 |
| | | | 弁理士 渡邊 伸一 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 ヒト前立腺癌において発現されるヘビ状膜貫通抗原およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図9A～Dに示される、STEAP-2のアミノ酸配列(配列番号8)を含むポリペプチド。

【請求項 2】

STEAP-2ポリペプチドであって、ここで該STEAP-2ポリペプチドが、図9A～Dに示されるアミノ酸配列(配列番号8)の断片であって、アミノ酸2～204、153～165、229～254、および278～303からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ、配列番号8に特異的に結合する抗体を生成させる、STEAP-2ポリペプチド。

【請求項 3】

図9A～Dに示されるアミノ酸配列(配列番号8)に、その全長にわたって少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、該ポリペプチドが前立腺癌細胞で過剰発現している、ポリペプチド。

【請求項 4】

(a) 図9A～Dに示される配列(配列番号7)を有するポリヌクレオチドであって、ここでTがまたUであり得る、ポリヌクレオチド；(b) 配列が、受託番号PTA-311としてアメリカン タイプ コレクションに寄託されたプラスミド98P4B6-GTD3に含まれるcDNAによってコードされるSTEAP-2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；(c) 請求項1～3のいずれか1項に記載のSTEAP-2ポリペプチ

ドをコードするポリヌクレオチド；および（d）（a）～（c）のポリヌクレオチドに十分に相補的であるポリヌクレオチドからなる群より選択される、ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、組換え発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 7】

検出可能なマーカーで標識された、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

S T E A P - 2 タンパク質を生成するプロセスであって、該プロセスは、ポリペプチドの生成に十分な条件下で請求項 6 に記載の宿主細胞を培養する工程および該培養物から該 S T E A P - 2 タンパク質を回収する工程を包含する、プロセス。

10

【請求項 9】

請求項 1 に記載の S T E A P - 2 ポリペプチドのアミノ酸 2 ～ 2 0 4、1 5 3 ～ 1 6 5、2 2 9 ～ 2 5 4、または 2 7 8 ～ 3 0 3 に特異的に結合する抗体。

【請求項 1 0】

モノクローナルである、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 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 1 2】

検出可能なマーカーで標識された、請求項 9 または 1 0 に記載の抗体、あるいは請求項 1 1 に記載の組換えタンパク質。

20

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の抗体または組換えタンパク質であって、ここで前記検出可能なマーカーが、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素または蛍光化合物、生物発光化合物もしくは化学発光化合物を含む、抗体または組換えタンパク質。

【請求項 1 4】

ヒト抗体である、請求項 9、1 0、1 2 または 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 1 5】

マウス抗原結合領域残基およびヒト抗体残基を含む、請求項 9、1 0、1 2 または 1 3 に記載の抗体。

30

【請求項 1 6】

請求項 1 0 に記載のモノクローナル抗体を産生する、非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 1 7】

請求項 1 0 に記載のモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項 1 8】

請求項 1 0 に記載のモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む、単鎖モノクローナル抗体。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の単鎖モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを含む、ベクター。

40

【請求項 2 0】

毒素、放射性同位元素または治療薬剤に結合される、請求項 1 0 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載のモノクローナル抗体であって、ここで、前記毒素が、リシン、リシン A 鎖、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、メイタンシノイド、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、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、ジフテリア毒素、P s e u d o m o n a s 外毒素（P E）A、P E 4 0、アブリン、アブリン A 鎖、モデ

50

シンＡ鎖、サルシン、ゲロニン、マイトジェリン、リストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、キュリシン、クロチン、カリーチアミシン、サバオナリアオフィシナリスインヒビター、またはグルココルチコイドを含む、モノクローナル抗体。

【請求項２２】

前記放射性同位元素が ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、または ^{186}Re である、請求項２０に記載のモノクローナル抗体。

【請求項２３】

生物学的サンプルにおいてＳＴＥＡＰ－２タンパク質の存在を検出するためのアッセイであって、該アッセイが該サンプルと請求項９～１２のいずれか１項に記載の抗体または組換えタンパク質を接触させる工程、および該サンプルにおけるＳＴＥＡＰ－２タンパク質の該抗体への結合を検出する工程を包含する、アッセイ。

10

【請求項２４】

生物学的サンプルにおいてＳＴＥＡＰ－２ポリヌクレオチドの存在を検出するためのアッセイであって、該アッセイが、以下：

(a) 該サンプルと請求項４に記載のポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを接触させる工程；および

(b) 該サンプルにおいてＳＴＥＡＰ－２ポリヌクレオチドと該プローブとのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を検出し、ここで該ハイブリダイゼーション複合体の存在が該サンプル中のＳＴＥＡＰ－２ポリヌクレオチドの存在を示す、工程、を包含する、アッセイ。

20

【請求項２５】

生物学的サンプルにおいてＳＴＥＡＰ－２ mRNAの存在を検出するアッセイであって、該アッセイが、以下：

(a) 少なくとも１つのプライマーを使用する逆転写によって該サンプル由来のcDNAを生成する工程；

(b) そのように生成される該cDNAを、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしてＳＴＥＡＰ－２ポリヌクレオチドを使用して増幅し、それによって該生物学的サンプル内でＳＴＥＡＰ－２ cDNAを増幅する工程；

(c) 該増幅されたＳＴＥＡＰ－２ cDNAの存在を検出する工程、を包含し、ここで、該センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして使用されるＳＴＥＡＰ－２ポリヌクレオチドが、図９Ａ～Ｄに示されるポリヌクレオチド（配列番号７）を増幅し得る、アッセイ。

30

【請求項２６】

請求項２に記載のＳＴＥＡＰ－２ポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む単鎖モノクローナル抗体をコードするベクターであって、該ベクターが、ガン細胞に該単鎖モノクローナル抗体コード配列を送達し、そして該コードされた単鎖抗体が、該ガン細胞の細胞内に発現される、ベクター。

【請求項２７】

ＳＴＥＡＰ－２を発現する細胞の増殖を阻害するための、請求項２６に記載のベクター。

40

【請求項２８】

ＳＴＥＡＰ－２を発現する細胞の増殖を阻害するための、請求項９、１０、１２～１５または２０～２２のいずれか１項に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本出願は、１９９９年１２月６日出願、米国特許出願第０９／４５５，４８６号の利益を請求する。

【０００２】

(発明の分野)

50

本明細書に記載の発明は、新規な遺伝子のファミリーおよびそれらのコードするタンパク質および腫瘍抗原（STEAPと名付けられた）に関し、そして種々の癌（特に、前立腺癌、結腸癌、膀胱癌、肺癌、卵巣癌および膵臓癌を含む）の管理において有用な診断および治療の方法ならびに組成物に関する。

【0003】

（発明の背景）

癌は、冠動脈疾患に次いで、ヒトの死亡の二番目に主要な原因である。世界中で、数百万の人々が毎年、癌で死んでいる。アメリカ合衆国単独でも、癌は、毎年50万人を軽く上回る死亡を引き起しており、1年あたりおよそ140万の新しい症例が診断されている。心疾患に起因する死亡は、有意に低下してきたが、癌に起因する死亡は、一般に増大している。次の世紀の初頭には、癌は死亡の主要な原因になると予想される。

10

【0004】

世界中で、いくつかの癌が主な死亡原因として突出している。詳細には、肺癌、前立腺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、および卵巣癌が、癌死の主要な原因である。これらおよび実質的に全ての他の癌は、共通の致死的特徴を共有する。ごくわずかな例外を除いて、癌腫由来の転移性疾患は、致死性である。さらに、原発性癌を最初に生きのびた癌患者にとってさえ、共通の経験として、患者らの生活が劇的に変化したことが示される。多くの癌患者は、再発または処置の失敗の可能性の認識から生じる強い不安感を経験する。多くの癌患者は、処置後の身体的衰弱を経験する。多くの癌患者は再発を経験する。

20

【0005】

世界中で、前立腺癌は、ヒトにおいて4番目に最も流行している癌である。北アメリカおよび北ヨーロッパでは、前立腺癌は、間違いなく最も通常の男性の癌であり、そしてヒトにおける癌死の第二の主要な原因である。アメリカ合衆国単独でも、唯一肺癌に次いで、毎年、この疾患で40,000人を超える男性が死んでいる。これらの数字の大きさにもかかわらず、転移性前立腺癌の有効な処置はいまだに存在しない。外科的前立腺切除、放射線療法、ホルモンアブレーション（消失）療法、および化学療法が、主要な処置の様式であり続けている。不幸にも、これらの処置は、多くの場合無効であり、そしてしばしば望ましくない結果を伴う。

【0006】

診断的分野では、初期の限局性腫瘍を正確に検出できる前立腺腫瘍マーカーがないことは、この疾患の管理における重要な限界となっている。血清PSAアッセイは非常に有用なツールであるが、その特異性および一般的有用性は、いくつかの重要な事項を欠くと、広くみなされている。

30

【0007】

前立腺癌に特異的なさらなるマーカーを同定するにおける進歩が、マウスにおいて疾患の種々の段階を再現し得る、前立腺癌異種移植片の生成によって改善されている。LAPC（Los Angeles Prostate Cancer）異種移植片は、重症複合免疫不全（SCID）マウスにおいて継代生存し、そして疾患進行（アンドロゲン依存性からアンドロゲン非依存性への遷移、および転移性病変の発生を含む）を模倣する能力を示した、前立腺癌異種移植片である（米国特許第6,107,540号；Kleinら、1997, Nat. Med. 3: 402）。さらに最近になって同定された前立腺癌マーカーとしては、以下が挙げられる：PCTA-1（Sura, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252）、前立腺幹細胞抗原（PSCA）（Reiterら、1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735）、およびSTEAP（Hubertら、1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14523）。

40

【0008】

PSA、PSM、PCTAおよびPSCAのような以前に同定されたマーカーは、前立腺癌を診断および処置するための労力を容易にしたが、診断および治療をさらに改善するため、前立腺および関連する癌についてのさらなるマーカーおよび治療標的の同定の必要性

50

が存在する。

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、細胞表面のサーパンタインな(曲がりくねった)(serpentine)膜貫通抗原の新規なファミリーに関する。このファミリーの2つのタンパク質は、前立腺および前立腺癌において排他的または優先的に発現され、従ってこのファミリーのメンバーは、「STEAP」(Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate(前立腺の6つの膜貫通上皮抗原))と名付けられている。4つの特定のヒトSTEAPが、本明細書において記載されており、そして特徴付けられている。ヒトSTEAPは、その間で高い程度の構造的保存を示すが、いずれの公知のヒトタンパク質に対しても有意な構造的相同性を示さない。

10

【0010】

STEAPファミリーのプロトタイプ(原型)のメンバーである、STEAP-1は、正常なヒト組織における前立腺細胞で優先的に発現されたIIIa型膜タンパク質であるようである。構造的に、STEAP-1は、6つの膜貫通ドメインならびに細胞内N末端およびC末端の分子トポロジーによって特徴付けられた339アミノ酸のタンパク質であり、このことは、STEAP-1が、3つの細胞外ループおよび2つの細胞内ループに「サーパンタイン(曲がりくねった)(serpentine)」様式で折り畳むことを示唆する。STEAP-1タンパク質発現は、種々の段階の前立腺癌にまたがって高レベルで維持されている。さらに、STEAP-1は、特定の他のヒト癌において非常に過剰発現されている。詳細には、STEAP-1の細胞表面発現は、種々の前立腺細胞および前立腺癌細胞、肺癌、膀胱癌細胞および結腸癌細胞において明確に決定されている。これらの特徴は、STEAP-1が、前立腺癌、膀胱癌、結腸癌および他の癌において高レベルで発現される特異的な細胞表面腫瘍抗原であることを示す。

20

【0011】

このファミリーの第二のメンバーである、STEAP-2は、454アミノ酸のタンパク質であり、STEAP-1のトポロジーと類似の推定分子トポロジーを有する。STEAP-2は、STEAP-1と同様、正常なヒト組織において前立腺特異的であり、そしてまた前立腺癌において発現される。STEAP-2およびSTEAP-1のORFのアラインメントは、237アミノ酸残基重複にわたって54.9%の同一性を示し、そしてSTEAP-2中の6つの推定膜貫通ドメインの位置は、STEAP-1における膜貫通ドメインの位置と一致する(図11A-B)。

30

【0012】

STEAP-3およびSTEAP-4がまた、本明細書に記載されている。これらはまた構造的に関連しており、そして特有の発現プロファイルを示す。詳細には、STEAP-3およびSTEAP-4は、異なる組織制限パターンを示すようである。4つのSTEAP全てのアミノ酸配列アラインメントを、図11A-Bに示す。

【0013】

本発明は、本明細書に記載されるSTEAP遺伝子、mRNA、および/またはコード配列の全てまたは一部に相当するかまたは相補的なポリヌクレオチドを、好ましくは単離した形態で提供する。これには、STEAPタンパク質およびそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド、STEAP遺伝子またはmRNA配列またはその部分に相補的なDNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、および関連分子、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、ならびにSTEAP遺伝子、mRNAに対して、もしくはSTEAPコードポリヌクレオチドに対してハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが挙げられる。また、STEAPをコードするcDNAおよび遺伝子を単離する手段も提供される。STEAPポリヌクレオチドを含有する組換えDNA分子、このような分子で形質転換されたまたは形質導入された細胞、およびSTEAP遺伝子産物の発現のための宿主ベクター系がまた提供される。

40

【0014】

50

本発明はさらに、S T E A Pタンパク質およびそのポリペプチドフラグメントを提供する。本発明はさらに、S T E A Pタンパク質およびそのポリペプチドフラグメントに結合する抗体を提供する。この抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、マウスおよび他の哺乳動物の抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および完全ヒト抗体、ならびに検出マーカーで標識した抗体、そして放射性核種/放射性同位体、毒素または他の治療組成物に結合体化された抗体が挙げられる。本発明はさらに、種々の生物学的サンプルにおいて、S T E A Pポリヌクレオチドおよびタンパク質の存在を検出するための方法を提供する。本発明はさらに、前立腺癌および他の癌を処置するための種々の治療用組成物およびストラテジー（詳細には、抗体、ワクチン、および低分子治療を含む）を提供する。

10

【0015】

本発明はさらに、種々の生物学的サンプルにおけるS T E A Pポリヌクレオチドおよびタンパク質の存在を検出するための方法、ならびにS T E A Pを発現する細胞を同定するための方法を提供する。本発明はさらに、前立腺癌を処置するための種々の治療用組成物およびストラテジー（詳細には、抗体、ワクチン、および低分子治療を含む）を提供する。このタンパク質の細胞外の性質は、S T E A Pおよびその機能を標的する分子、ならびにS T E A Pと相互作用する他のタンパク質、因子およびリガンドを標的する分子を用いる、多数の治療アプローチを提供する。これらの治療アプローチとしては、抗S T E A P抗体を用いる抗体療法、低分子療法、およびワクチン療法が挙げられる。さらに、前立腺癌におけるそのアップレギュレートされた発現を考慮して、S T E A Pは、前立腺癌の診断

20

【0016】

（発明の詳細な説明）

本発明は、細胞表面ヘビ状（*serpentine*）膜貫通抗原の新規ファミリーに関する。このファミリーにおけるこれらのタンパク質の2つは、前立腺、ならびに前立腺癌において排他的にかまたは優勢に発現され、従って、このファミリーのメンバーは、「S T E A P」（前立腺の6回膜貫通上皮抗原）と名付けられた。4つの特定のヒトS T E A Pは、本明細書中で記載されかつ特徴付けられる。ヒトS T E A Pは、これらの中で高度な

30

【0017】

他に規定しない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語、表記、および他の科学的用語は、本発明が属する分野の当業者によって共通して理解される意味を有することが意図される。いくつかの場合において、共通して理解される意味を有する用語は、明確さおよび/または迅速な参照のために本明細書中で定義され、そしてこのような定義の本明細書中への包含は、当該分野において一般に理解されることにわたる実質的な相違を表すとは必ずしも解釈されるべきではない。本明細書中に記載または参照される技術および手順は、一般に、従来の方法論（例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第2版（1989）Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N.Y.において記載されている方法論を広く利用した分子クローニングの方法論）を用いて、当業者によって十分に理解されかつ共通して用いられる。適切な場合、市販のキットおよび試薬の使用を含む手順は、他に注記されない限り、一般に、製造業者によって規定されるプロトコールおよび/またはパラメーターに従って実行される。

40

50

【0018】

本明細書中で使用される場合、用語「進行した前立腺癌」、「局所的に進行した前立腺癌」、「進行した疾患」および「局所的に進行した疾患」とは、前立腺皮膜を通して伸長した前立腺癌を意味し、そして米国泌尿器学会（AUA）システムの下でのステージC疾患、Whitmore-Jewettシステムの下でのステージC1 - C2疾患、およびTNM（腫瘍、節、転移）システムの下でのステージT3 - T4およびN+疾患を含むことが意味される。一般に、手術は、局所的に進行した疾患を有する患者のためには推奨されず、そしてこれらの患者は、臨床的に局在化している（器官に限定されている）前立腺癌を有する患者と比較して、実質的により好ましくない結果を有する。局所的に進行した疾患は、前立腺の側縁を超える硬化の明白な証拠、または前立腺基部上の非対称もしくは硬化によって臨床的に同定される。局所的に進行した前立腺癌は、腫瘍が前立腺皮膜に侵入するもしくは浸透するか、外科的な境界まで伸長するか、または精嚢に侵入する場合、現在、徹底的な前立腺切除後に生理学的に診断される。

10

【0019】

本明細書中で使用する場合、用語「転移性前立腺癌」および「転移性疾患」は、局所的なリンパ節、または異なる部位に拡がった前立腺癌を意味し、そしてAUAシステム下でステージD疾患、およびTNMシステム下でステージT×N×M+を包含することが意味される。局所的に進行した前立腺癌の場合、手術は一般的には転移性疾患を有する患者には示されず、そしてホルモン（アンドロゲン除去）治療が好ましい治療様式である。転移性前立腺癌を有する患者は、最終的に、処置の開始から12～18ヶ月以内にアンドロゲン抵抗性の状態を発症し、そしてこれらの患者のおよそ半数がその後6ヶ月以内に死亡する。前立腺癌転移の最も一般的な部位は骨である。前立腺癌の骨転移は、結局のところ、特徴として、溶骨性ではなくむしろ造血性である（すなわち、正味の骨の形成を生じる）。骨への転移は、脊椎において最も頻繁に見出され、大腿骨、骨盤、胸郭、頭蓋、および上腕骨と続く。転移のための他の一般的な部位には、リンパ節、肺、肝臓、および脳が含まれる。転移性の前立腺癌は、代表的には、直視的または腹腔鏡的な骨盤のリンパ節切除術、全身の放射性核種スキャン、骨格のラジオグラフィ、および/または骨損傷生検によって診断される。

20

【0020】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は、少なくとも10塩基または10塩基対の長さのヌクレオチドのポリマー型を意味し、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドまたはいずれかの型のヌクレオチドの改変型のいずれかであり、そして一本鎖および二本鎖の形態のDNAを含むことを意味する。

30

【0021】

本明細書中で使用する場合、用語「ポリペプチド」は、少なくとも10アミノ酸のポリマーを意味する。本明細書を通して、アミノ酸についての標準的な3文字表記または1文字表記が使用される。

【0022】

本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドの状況において使用される、用語「ハイブリダイズ」、「ハイブリダイズする」、「ハイブリダイズする」などは、従来のハイブリダイゼーション条件（好ましくは、例えば、50%ホルムアミド/6×SSC/0.1% SDS/100 μg/ml ssDNAにおけるハイブリダイゼーション）をいうことが意味される。ここで、ハイブリダイゼーションのための温度が、37より高い温度であり、そして0.1×SSC/0.1% SDS中での洗浄のための55がより高い温度であり、そして最も好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件である。

40

【0023】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般的には、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験による計算である。一般に、より長いプローブは、正しいアニーリングのためにより高い

50

温度を必要とするが、一方、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般に、融解温度より下の環境において、相補鎖が存在する場合、変性したDNAの再アニーリングする能力に依存する。プローブと、ハイブリダイズ可能な配列との間の所望される相同性の程度が高いほど、使用され得る相対的な温度が高くなる。結果として、相対的により高い温度が、反応条件をよりストリンジェントにする傾向があるが、より低い温度ではそのようなことがより少ない、ということになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley, Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

10

【0024】

本明細書中に規定されるように、「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」は、以下の条件によって同定され得る：(1)洗浄のために低いイオン強度および高い温度を使用する条件(例えば、0.015M 塩化ナトリウム/0.0015M クエン酸ナトリウム/0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、50)；(2)ハイブリダイゼーションの間に変性剤(例えば、ホルムアミド)を使用する条件(例えば、50% (v/v)ホルムアミドおよび0.1% ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll/0.1% ポリビニルピロリドン/50mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)および750mM 塩化ナトリウム、75mM クエン酸ナトリウム、42)；または(3)50% ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075M クエン酸ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1% ピロリン酸ナトリウム、5×Denhardt's溶液、超音波処理したサケ精子DNA(50μg/ml)、0.1% SDS、および10% 硫酸デキストラン、42、さらに以下の洗浄工程、42において0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)および50%ホルムアミド、55、続いて、高ストリンジェンシー洗浄(EDTAを含む0.1×SSCからなる、55)を使用する条件。

20

【0025】

「中程度にストリンジェントな条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989によって記載されたように同定され得、そして洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度、およびSDS)の使用を含む。これは、上記に記載されたものよりもよりストリンジェントではない。中程度にストリンジェントな条件の例は、以下を含む溶液中での37、一晚のインキュベーションである：20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×Denhardt's溶液、10% 硫酸デキストラン、および20mg/mL変性切断サケ精子DNA、続いて約37～50で1×SSC中でフィルターを洗浄する。当業者は、温度、イオン強度などを、因子(例えば、プローブ長など)を適応させるのに必要のように調整する方法を認識する。

30

【0026】

アミノ酸比較の状況において、用語「同一性」は、同一である同じ相対的位置のアミノ酸残基のパーセンテージを表現するために使用される。この状況においてはまた、用語「相同性」は、BLAST分析の保存性アミノ酸の判断基準を使用して、当該分野において一般的に理解されるように、同一であるかまたは類似であるかのいずれかである、同じ相対位置でのアミノ酸残基のパーセンテージを表現するために使用される。例えば、同一性の値は、WU-BLAST-2(Altschulら、Methods in Enzymology, 266:460-480(1996)；<http://blast.wustl.edu/blast/README.html>)によって生成され得る。アミノ酸置換(これは、このような判断基準の下では保存性であると見なされる)に関するさらなる詳細は以下に提供される。

40

50

【 0 0 2 7 】

さらなる定義が、引き続くサブセクションを通して提供される。

【 0 0 2 8 】

(S T E A P ポリヌクレオチド)

本発明の一つの局面は、S T E A P 遺伝子、m R N A および / またはコード配列 (好ましくは、S T E A P タンパク質およびそのフラグメント、D N A、R N A、D N A / R N A ハイブリッドならびに関連分子をコードするポリヌクレオチド、S T E A P 遺伝子もしくは m R N A 配列またはその一部分に相補的な、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、ならびに S T E A P 遺伝子、m R N A もしくは S T E A P をコードするポリヌクレオチド (集合的に、「S T E A P ポリヌクレオチド」) にハイブリダイズする、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む単離形態における) のすべてもしくは一部分に対応するか、またはそのすべてもしくは一部分に相補的なポリヌクレオチドを提供する。本明細書中で使用される場合、S T E A P 遺伝子およびタンパク質は、S T E A P - 1、S T E A P - 2 および S T E A P - 3 の遺伝子およびタンパク質、G e n B a n k アクセス番号 R 8 0 9 9 1 (S T E A P - 4) に対応する遺伝子およびタンパク質、ならびに他の S T E A P タンパク質および前述の構造的に類似の改変体に対応する、遺伝子およびタンパク質を含むことが意味される。このような他の S T E A P タンパク質および改変体は、一般的に、S T E A P コード配列に高度に相同なコード配列を有し、そして好ましくは、少なくとも約 5 0 % のアミノ酸同一性、そして (B L A S T 標準を使用して) 少なくとも約 6 0 % のアミノ酸相同性を共有し、より好ましくは、(B L A S T 標準を使用して) 7 0 % 以上の相同性を共有する。

【 0 0 2 9 】

本明細書中に記載される S T E A P ファミリーメンバー遺伝子配列は、他のタンパク質から S T E A P タンパク質を区別する、独特な高度に保存されたアミノ酸配列を共有する S T E A P タンパク質をコードする。1 以上のこれらの独特な高度に保存されたドメインを含むタンパク質は、S T E A P ファミリーメンバーに関し得るかまたは新たな S T E A P タンパク質を示し得る。全長 S T E A P - 1、S T E A P - 2、および S T E A P - 3、ならびに S T E A P - 4 のタンパク質配列のアミノ酸配列アラインメントである図 1 1 A ~ B を参照して、S T E A P が構造レベルで密接に関連することは明らかである。S T E A P - 1 および S T E A P - 2 のタンパク質配列のアミノ酸配列のアラインメントである図 1 1 C を参照して、密接な構造的保存は、特に好ましくは、膜貫通ドメインにおいて明らかである。S T E A P - 1 配列および S T E A P - 2 配列は、2 3 7 アミノ酸重複にわたって 5 4 . 9 % 同一性を共有する。S T E A P の間のさらなるアミノ酸配列アラインメントは、図 1 1 D および 1 1 E に示される。これらのアラインメントは、S T E A P - 1 および S T E A P - 3 が 2 6 4 アミノ酸領域にわたって 4 0 . 9 % 同一であるが、S T E A P - 2 および S T E A P - 3 は、4 1 6 アミノ酸領域にわたって 4 7 . 8 % 同一である。

【 0 0 3 0 】

S T E A P ポリヌクレオチドは、図 1 A ~ B に示されるようなヒト S T E A P - 1 のヌクレオチド配列、図 9 A ~ D に示されるようなヒト S T E A P - 2 のヌクレオチド配列、図 1 0 A ~ E に示されるようなヒト S T E A P - 3 のヌクレオチド配列、もしくは図 1 0 F に示されるようなヒト S T E A P - 4 のヌクレオチド配列、またはこれらに相補的な配列、あるいは、前述の任意のポリヌクレオチドフラグメントを有するポリヌクレオチドを含み得る。別の実施形態は、ヒト S T E A P - 1 タンパク質、S T E A P - 2 タンパク質、S T E A P - 3 タンパク質または S T E A P - 4 タンパク質のアミノ酸配列、これらに相補的な配列、または前述の任意のポリヌクレオチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。別の実施形態は、図 1 A ~ B に示されるヒト S T E A P - 1 c D N A、図 9 A ~ D に示されるヒト S T E A P - 2 c D N A、図 1 0 A ~ E に示されるヒト S T E A P - 3 c D N A、または図 1 0 F に示されるような S T E A P - 4、あるいは、これらのポリヌクレオチドフラグメントに、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条

件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドを含む。

【0031】

本明細書中で開示される本発明の代表的な実施形態は、STEAP mRNA配列の特定の一部分をコードするSTEAPポリヌクレオチド（例えば、タンパク質およびそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド）を含む。例えば、本明細書中で開示される本発明の代表的な実施形態は、以下を含む：図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸1～およそのアミノ酸10をコードするポリヌクレオチド、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸20～およそのアミノ酸30をコードするポリヌクレオチド、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸30～およそのアミノ酸40をコードするポリヌクレオチド、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸40～およそのアミノ酸50をコードするポリヌクレオチド、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸50～およそのアミノ酸60をコードするポリヌクレオチド、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸60～およそのアミノ酸70をコードするポリヌクレオチド、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸70～およそのアミノ酸80をコードするポリヌクレオチド、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸80～およそのアミノ酸90をコードするポリヌクレオチド、および図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸90～およそのアミノ酸100をコードするポリヌクレオチドなど。このスキームの後、STEAPタンパク質のさらなる部分をコードするポリヌクレオチド（少なくとも10アミノ酸の）は、本発明の代表的な実施形態である。STEAPタンパク質のこのような部分は、図11A～Bに示されるSTEAP-1タンパク質のアミノ酸100～339、または図11A～Bに示されるSTEAP-2タンパク質のアミノ酸100～454、または図11A～Bに示されるSTEAP-3タンパク質のアミノ酸100～459、および図11A～Bに示されるSTEAP-4のアミノ酸100～133を含む。STEAPタンパク質のより大きな部分をコードするポリヌクレオチドがまた意図される。例えば、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質のおよそのアミノ酸1（または20、または30、または40など）～およそのアミノ酸20（または30、または40、または50など）をコードするポリヌクレオチドは、当該分野で周知の種々の技術によって生成され得る。

【0032】

本明細書中で開示される本発明のさらなる例示的な実施形態は、STEAPタンパク質配列内に含まれる、1つ以上の生物学的モチーフをコードするSTEAPポリヌクレオチドフラグメントを含む。1つの実施形態において、本発明の代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、他のSTEAPファミリーメンバー（例えば、1以上の膜貫通ドメイン）との相同性を示すSTEAPの1つ以上の領域をコードし得る。本発明の別の実施形態において、代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、1つ以上のSTEAP選択的スプライシング改変体に独特である配列をコードし得る。本発明のさらに別の実施形態において、代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、STEAPタンパク質の免疫原性部分をコードし得る。STEAPタンパク質の免疫原性部分の1例は、図1A～B（WKMKPRRNLEDDYL；配列番号2）に示されるようなSTEAP-1アミノ酸配列のアミノ酸残基14～28である。

【0033】

前述の段落のポリヌクレオチドは、多くの異なる特定の使用を有する。STEAPは、前立腺癌および他の癌において差示的に発現されるので、これらのポリヌクレオチドは、正常な組織対癌性組織におけるSTEAP遺伝子産物の状態を評価する方法において使用され得る。代表的には、STEAPタンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドが使用されて、STEAP遺伝子産物の特定の領域において、混乱状態（例えば、欠失、挿入、点変異など）の存在を評価し得る。例示的なアッセイは、RT-PCRアッセイ、ならびに一本鎖高次構造多型（SSCP）分析（例えば、Marroggiら、J. Cutan. Pathol. 26（8）：369-378（1999）を参照のこと）の両

10

20

30

40

50

方を含み、これらの両方は、タンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドを利用して、タンパク質内のこれらの領域を試験する。単一ヌクレオチド多型を検出する配列を分析するためのアッセイおよび方法はまた、利用可能である (I r i z a r r y ら、2000、Nature Genetics 26(2)223-236)。

【0034】

本明細書中で開示される本発明の他の具体的に意図された実施形態は、ゲノムDNA、cDNA、リボザイムおよびアンチセンス分子(モルホリノアンチセンス分子を含む)、ならびに天然の供給源または合成由来にせよ、代替の骨格に基づくか、または代替の塩基を含む核酸分子である。例えば、アンチセンス分子は、RNA、あるいは他の分子(ペプチド核酸(PNA)または塩基対依存様式でDNAもしくはRNAに特異的に結合する非核酸分子(例えば、ホスホロチオエート誘導体)を含む)であり得る。当業者は、STEAPポリヌクレオチドおよび本明細書中で開示されるポリヌクレオチド配列を使用して、核酸分子のこれらのクラスを容易に獲得し得る。

【0035】

アンチセンス技術は、細胞内部に位置する標的ポリヌクレオチドに結合する外因性オリゴヌクレオチドの投与を必然的に伴う。用語「アンチセンス」は、このようなオリゴヌクレオチドが、その細胞内標的(例えば、STEAP)に相補的であるという事実をいう。例えば、Jack Cohen, OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; および Synthesis 1:1-5(1988)を参照のこと。本発明のSTEAPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Sオリゴヌクレオチド(ホスホロチオエート誘導体またはS-オリゴ、Jack Cohen、前出を参照のこと)のような誘導体を含み、この誘導体は、癌細胞増殖阻害作用の増大を示す。S-オリゴ(ヌクレオシドホスホロチオエート)は、オリゴヌクレオチド(O-オリゴ)の等電子アナログであり、リン酸基の非架橋酸素原子は、硫酸原子に置換される。本発明のS-オリゴは、3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン-1, 1-ジオキシド(これは、硫酸転移試薬である)での対応するO-オリゴの処理によって調製され得る。Iyer, R.P. ら、J. Org. Chem. 55:4693-4698(1990); および Iyer, R.P. ら、J. Am. Chem. Soc. 112:1253-1254(1990)(これらの開示は、本明細書中で参考として完全に援用される)を参照のこと。本発明のさらなるSTEAPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該分野で公知のモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む(例えば、Partridge ら、1996, Antisense & Nucleic Acid Drug Development 6:169-175を参照のこと)。

【0036】

本発明のSTEAPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、代表的に、STEAPゲノムもしくは対応するmRNAの、最初の100個のN末端コドンまたは最後の100個のC末端コドンに相補的であり、そしてこれらのコドンと安定にハイブリダイズするか、あるいはATG開始部位と重複する、RNAまたはDNAであり得る。完全な相補性は必要ではないが、高い程度の相補性が好ましい。この領域に相補的なオリゴヌクレオチドの使用は、STEAP mRNAへの選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、そしてタンパク質キナーゼの他の調節サブユニットを特定するmRNAへの選択的ハイブリダイゼーションを可能にしない。好ましくは、本発明のSTEAPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、STEAP mRNAにハイブリダイズする配列を有するアンチセンスDNA分子の15~30merフラグメントである。必要に応じて、STEAPアンチセンスオリゴヌクレオチドは、STEAPの最初の10個のN末端コドンおよび最後の10個のC末端コドンにおける領域に相補的な30merオリゴヌクレオチドである。あるいは、アンチセンス分子は、STEAP発現の阻害において、リボザイムを利用するように改変される。L.A. Couture および D.T. Stinchcomb; Trends Genet 12:510-515(1996)。

【 0 0 3 7 】

本発明のこの局面のさらなる特定の実施形態は、プライマーおよびプライマーペアを含み、これは、本発明のポリヌクレオチドまたはその任意の特定の部分の特異的増幅、および本発明の核酸分子またはその任意の部分に選択的もしくは特異的にハイブリダイズするプローブの特異的増幅を可能にする。プローブは、検出可能なマーカ（例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生体発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素のような）で標識され得る。このようなプローブおよびプライマーが、サンプルにおけるSTEAPポリヌクレオチドの存在を検出するために使用され得、そしてSTEAPタンパク質を発現する細胞を検出するための手段として使用され得る。このようなプローブの例としては、図1A～B（配列番号1）、図9A～D（配列番号7）または図10A～E（配列番号9）に示されるヒトSTEAP cDNA配列の、すべてまたは一部分を含むポリペプチドが挙げられる。STEAP mRNAを特異的に増幅し得るプライマーペアの例はまた、続く実施例において記載される。当業者に理解されるように、非常に多くの異なるプライマーおよびプローブが、本明細書中に提供される配列に基づいて調製され得、そしてSTEAP mRNAを有効に増幅および／または検出するために使用され得る。

10

【 0 0 3 8 】

本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドは、STEAP遺伝子ではない遺伝子に、対応するかまたは相補的である混入ポリヌクレオチド、またはSTEAP遺伝子産物もしくはそのフラグメントではないポリペプチドをコードする混入ポリヌクレオチドから実質的に分離されている場合、「単離された」と言われる。当業者は、容易に核酸単離手順を利用して、単離されたSTEAPポリヌクレオチドを獲得し得る。

20

【 0 0 3 9 】

本発明のSTEAPポリヌクレオチドは、種々の目的に有用である。この目的としては、STEAP遺伝子、mRNAまたはそのフラグメントの、増幅および／または検出のための、プローブおよびプライマーとしての使用；前立腺癌および他の癌の、診断および／または予後のための試薬としての使用；前立腺細胞へのカルシウムの侵入を特異的に阻害する分子を同定するための手段としての使用；STEAPポリペプチドの発現を指向し得るコード配列としての使用；STEAP遺伝子の発現および／またはSTEAP転写物の翻訳を、調節または阻害するための手段としての使用；ならびに治療薬としての使用が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 4 0 】

（STEAPの分子的特徴および生化学的特徴）

本発明は、STEAPと命名された新規タンパク質ファミリーに関する。4つのSTEAPが、構造特徴、分子特徴および生化学的特徴によって本明細書中に詳細に記載される。以下に続く実施例にさらに記載されるように、このSTEAPは、種々の方法で特徴付けられている。例えば、ヌクレオチドコード配列およびアミノ酸配列の分析は、STEAPファミリー内で保存された構造エレメントを同定するために実施された。STEAP mRNA発現の大量のRT-PCR分析およびノーザンブロット分析が、種々のSTEAPメッセージを発現する正常組織および癌性組織の範囲を確立するために実施された。STEAPタンパク質発現のウェスタンブロット分析、免疫組織化学分析、およびフローサイトメトリー分析は、STEAPのタンパク質発現プロファイル、細胞表面局在および総分子トポロジーを決定するために実施された。

40

【 0 0 4 1 】

STEAPファミリーの原型のメンバーであるSTEAP-1は、いずれの既知のヒトタンパク質とも識別可能な相同性を有さない、339アミノ酸の6回膜貫通細胞表面タンパク質である。ヒトSTEAP-1のcDNAヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列は、図1A～Bに示される。細胞膜内に組込まれたSTEAP-1の総トポロジーの模式図は、図1Bに示される。STEAP-1発現は、正常組織において主に前立腺特異的である。詳細には、正常ヒト組織におけるSTEAP-1 mRNA発現およびSTEAP-1タンパク質発現の大量の分析により、STEAP-1タンパク質が、前立腺に主に発現され

50

、そしてはるかに少ない程度で膀胱に発現されることが示される。STEAP-1 mRNAはまた、相対的に前立腺特異的である、非常に低いレベルの発現のみが、いくつかの他の正常組織で検出される。癌において、STEAP-1 mRNAおよびSTEAP-1タンパク質は、一貫して、前立腺癌（アンドロゲン依存性腫瘍およびアンドロゲン非依存性腫瘍を含む）そしてこの疾患の全段階の間に高レベルで発現される。STEAP-1はまた、他の癌で発現される。詳細には、STEAP-1 mRNAは、非常に高いレベルで、膀胱癌、結腸癌、膵臓癌、および卵巣癌（ならびに他の癌）で発現される。さらに、STEAP-1タンパク質の細胞表面発現が、前立腺癌、膀胱癌、肺癌および結腸癌で確立されている。従って、STEAP-1は、特定の癌（詳細には、前立腺癌腫、結腸癌腫および膀胱癌腫を含む）の処置のための、優れた診断標的および治療標的の顕著な特徴の全てを有する。

10

【0042】

このファミリーの第2のメンバーであるSTEAP-2は、異なる遺伝子によってコードされた454アミノ酸タンパク質であり、STEAP-1の推定分子トポロジーに類似した推定分子トポロジーを有する。STEAP-2のcDNAヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列は、図9A～Dに示される。STEAP-1配列とSTEAP-2配列のアミノ酸アラインメントは、高い程度の構造的な保存（237アミノ酸残基の重複にわたって54.9%の同一性）、およびSTEAP-1およびSTEAP-2の同時に生じる6つの推定膜貫通ドメインの位置を示す（図11A～B、11C）。これらのSTEAP-1とSTEAP-2との間の構造的な相同性は、第1の推定細胞外ループから第5の膜貫通ドメインに広がる領域において最も高い。しかし、STEAP-1とSTEAP-2との間のいくつかの有意な構造的な差異が、明らかである。例えば、STEAP-2は、205アミノ酸長の細胞内N末端（STEAP-1における69アミノ酸に比較される）および短い4アミノ酸の細胞内C末端（STEAP-1における26アミノ酸と比較される）を示す。さらに、STEAP-1遺伝子およびSTEAP-2遺伝子の両方は、第7番染色体に位置するが、異なるアーム上である。これらの差異は、機能および/または細胞内シグナル伝達経路との相互作用における有意な差異を意味し得る。

20

【0043】

STEAP-2は、試験されたヒト組織の間では正常な前立腺にのみ発現され（図14および15）、そしてまた、前立腺癌で発現される（図15）。従って、これは、STEAP-1に対して発現プロファイルにいくらかの類似性を示す。しかし、STEAP-2は、前立腺癌サンプル（図3および15を比較）および試験された他の非前立腺癌（図5および図16を比較）において、STEAP-1に対して異なるmRNA発現プロファイルを示す。STEAP-1およびSTEAP-2の発現プロファイルにおけるこれらの差異は、これらが特異に調節されることを示唆する。

30

【0044】

STEAP-3およびSTEAP-4は、構造レベルではSTEAP-1およびSTEAP-2の両方に密接に関連するようであり、これらの両方は、同様に膜貫通タンパク質のようである。STEAP-3は、STEAP-1（40.9%の同一性）よりも、STEAP-2（47.8%の同一性）により関連する。STEAP-3およびSTEAP-4は、特有の発現プロファイルを示す。例えば、STEAP-3は、主に胎盤に限定される発現パターンを有するようであり、より少ない程度で、発現は、前立腺に見出されるが試験された他の正常組織では見出されない。STEAP-4は、RT-PCR分析によって、主に肝臓で発現されるようである。STEAP-3もSTEAP-4も、高レベルのSTEAP-1発現およびSTEAP-2発現が示される前立腺癌異種移植片で発現されないようである。

40

【0045】

STEAPタンパク質は、細胞のシグナル伝達経路に関与するタンパク質の特徴を示す。詳細には、STEAP-1およびSTEAP-2は、PC3細胞に発現された場合、p38（MAPKシグナル伝達カスケードに関与するタンパク質）のリン酸化を活性化する。

50

さらに、STEAP-2発現は、チロシンリン酸化を誘導し、そしてSTEAP-1は、臭気物質処理細胞においてチロシンキナーゼの活性化を媒介する。これらの知見は、STEAP関連分子および細胞のシグナル伝達経路を変更し得る分子を同定するための高スループットアッセイにおいてSTEAPを発現するために改変される細胞の使用を支持し、新規治療剤の同定を導く。1つの実施形態において、このアッセイは、STEAP機能を阻害し得る分子を同定し、それによってこの分子は、癌または調節不全細胞の増殖と関連した他の疾患の進行を調節し得る。

【0046】

本明細書中に記載された4つのSTEAPのうちの3つは、ヒト第7番染色体にマップされる(STEAP-1、2および3)。興味深いことに、原発性前立腺癌および再発性前立腺癌の両方に関して報告された(Visakorpiら、1995 Cancer Res. 55:342、Nupponenら、1998 American J. Pathol. 153:141)、7p22(7p22.3)(対立遺伝子(allellic gain)の大きい領域)内のSTEAP-1マップは、癌におけるSTEAP-1のアップレギュレーションが、ゲノム機構を含み得ることを示唆する。さらに、STEAP-2およびSTEAP-3の両方は、染色体7q21に位置し、これらの2つの遺伝子が、遺伝子重複によって発生したことを示唆する。

【0047】

6回膜貫通ドメインを含む他の細胞表面分子としては、イオンチャネル(DollyおよびParcej、1996 J Bioenerg Biomembr 28:231)および水チャネルもしくはアクアポリン(Reizerら、1993 Crit Rev Biochem Mol Biol 28:235)が挙げられる。構造研究は、機能的なチャネルを形成するために4量体複合体に集合される両方の型の分子を示す(Christie、1995, Clin Exp Pharmacol Physiol 22:944、Walzら、1997 Nature 387:624、Chengら、1997 Nature 387:627)。前立腺におけるSTEAP-1の免疫組織化学染色は、細胞間境界において濃縮されるようであり、管腔側において染色はほとんど検出されない。これは、きつい接合点、ギャップの接合点、細胞の伝達、接着またはトランスポータータンパク質としてのSTEAP-1の役割を示唆し得る。

【0048】

これらの可能性を試験するために、STEAPを発現するツメガエルの卵母細胞(または他の細胞)は、STEAPがイオンチャネルとして機能するか否かを決定するために、電圧クランプ実験およびパッチクランプ実験を用いて分析され得る。卵母細胞の容積はまた、STEAPが水チャネル特性を示すか否かを決定するために測定され得る。STEAPがチャネルタンパク質またはギャップ接合点タンパク質として機能する場合、これらは、例えば、発現または機能を阻害し得る抗体、小分子、およびポリヌクレオチドを使用して、阻害に関して優れた標的としてはたらき得る。正常組織における限定された発現パターンおよび癌組織における高レベルの発現は、STEAP機能を妨害することが、選択的に癌細胞を殺傷し得ることを示唆する。

【0049】

STEAP遺伝子ファミリーは上皮組織で主に発現されるので、STEAPタンパク質が、上皮細胞機能においてイオンチャネル、輸送タンパク質、またはギャップ接合点タンパク質として機能する可能性があるようである。イオンチャネルは、前立腺癌細胞の増殖および侵襲性に関与している(Lalaniら、1997、Cancer Metastasis Rev 16:29)。ラットおよびヒト両方の前立腺癌細胞は、より高いまたはより低いナトリウムチャネルの発現レベルを有する細胞の亜集団を含む。より高いレベルのナトリウムチャネル発現は、インビトロにおいてより侵襲的な侵襲性と相関する(Smithら、1998、FEBS Lett. 423:19)。同様に、ナトリウムチャネルの特定の遮断が、インビトロにおいてPC-3細胞の侵襲性を阻害することが示されている(Laniadoら、1997、Am. J. Pathol. 150:1213)が

10

20

30

40

50

、LNCaP細胞における特定のカリウムチャネルの阻害は、細胞増殖を阻害した（Skrymalaら、1997、Prostate 33:112）。これらの報告は、前立腺癌中のイオンチャネルに関する役割を示唆し、そしてまた、イオンチャネル機能を阻害する小分子が前立腺癌増殖を妨害し得ることを証明する。

【0050】

（STEAPをコードする核酸分子の単離）

本明細書中に記載されるSTEAP cDNA配列は、STEAP遺伝子産物をコードする他のポリヌクレオチドの単離、ならびにSTEAP遺伝子産物ホモログ、選択的にスプライシングされたアイソフォーム、対立遺伝子改変体、およびSTEAP遺伝子産物の変異体形態をコードするポリヌクレオチドの単離を可能にする。STEAP遺伝子をコードする全長cDNAを単離するために利用され得る種々の分子クローニング方法は、周知である（例えば、Sambrook, J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubelら編、Wiley and Sons, 1995を参照のこと）。例えば、ファージクローニング方法論が、市販のクローニング系を使用して慣用的に利用され得る（例えば、Lambda ZAP Express, Stratagene）。STEAP遺伝子cDNAを含むファージクローンは、標識されたSTEAP cDNAまたはそのフラグメントを用いてプローブ化することにより同定され得る。例えば、一つの実施形態において、STEAP cDNAまたはその一部分が、合成され、そしてプローブとして使用されて、STEAP遺伝子に対応する重複するcDNAおよびSTEAP遺伝子に対応する全長cDNAを回収し得る。STEAP遺伝子自体は、STEAP DNAプローブまたはプライマーを使用して、ゲノムDNAライブラリー、細菌人工染色体ライブラリー（BAC）、酵母人工染色体ライブラリー（YAC）などをスクリーニングすることによって単離され得る。

【0051】

（組換えDNA分子および宿主 - ベクター系）

本発明はまた、STEAPポリヌクレオチドを含む組換えDNAまたはRNA分子（これには、当該分野において周知のファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、YAC、BAC、ならびに種々のウイルス性および非ウイルス性ベクターが含まれるが、これらに限定されない）、およびこのような組換えDNAまたはRNA分子で形質転換またはトランスフェクトされた細胞を提供する。本明細書中で使用される場合、組換えDNAまたはRNA分子は、インピットロでの分子操作に供されたDNAまたはRNA分子である。このような分子を生成するための方法は周知である（例えば、Sambrookら、1989（前出）を参照のこと）。

【0052】

本発明はさらに、適切な原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞においてSTEAPポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子を含む、宿主 - ベクター系を提供する。適切な真核生物宿主細胞の例としては、酵母細胞、植物細胞、または動物細胞（例えば、哺乳動物細胞または昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス感染可能細胞（例えば、Sf9細胞）））が挙げられる。適切な哺乳動物細胞の例としては、種々の前立腺癌細胞株（例えば、LNCaP、PC3、DU145、LAPC-4、TsUPr1、他のトランスフェクト可能であるかまたは形質導入可能な前立腺細胞株）、ならびに組換えタンパク質の発現のために慣用的に使用される多くの哺乳動物細胞（例えば、COS細胞、CHO細胞、293細胞、293T細胞）が挙げられる。より詳細には、STEAPのコード配列を含むポリヌクレオチドを使用し、当該分野で慣用的に使用され、そして広く知られた任意の数の宿主 - ベクター系を用いて、STEAPタンパク質またはそれらのフラグメントを生成し得る。

【0053】

STEAPタンパク質またはそれらのフラグメントの発現に適切な広範な種々の宿主 - ベ

10

20

30

40

50

クター系が利用可能である（例えば、Sambrookら、1989（前出）；Current Protocols in Molecular Biology、1995（前出）を参照のこと）。哺乳動物での発現に好ましいベクターとしては、pcDNA 3.1 myc-His-tag（Invitrogen）およびレトロウイルスベクター pSR tkneo（Mullerら、1991、MCB 11:1785）が挙げられるが、これらに限定されない。これらの発現ベクターを使用して、STEAPは、好ましくは、いくつかの前立腺癌細胞株および非前立腺癌細胞株（例えば、293、293T、rat-1、3T3、PC3、LNCaPおよびTsupr1を含む）において発現され得る。本発明の宿主ベクター系は、STEAPタンパク質またはそれらのフラグメントの産生のために有用である。このような宿主-ベクター系は、STEAPおよびSTEAP変異の機能的特性を研究するために使用され得る。

10

【0054】

STEAP遺伝子またはそれらのフラグメントによってコードされるタンパク質は、種々の用途を有する。これには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体の産生、およびSTEAP遺伝子産物に結合する、リガンドおよび他の因子および細胞構成要素を同定するための方法において。STEAPタンパク質またはそれらのフラグメントに対して惹起された抗体は、診断および予後アッセイにおいて、画像化方法（特に、癌画像化を含む）において、そしてSTEAPタンパク質の発現によって特徴付けられるヒト癌（前立腺の癌を含むが、これに限定されない）の管理における治療方法において有用であり得る。STEAPタンパク質の検出のために有用な種々の免疫学的アッセイが意図され、これには、種々の型のラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光アッセイ（ELIFA）、免疫細胞学的方法などが意図されるが、これらに限定されない。このような抗体は、標識され得、そして前立腺細胞を検出し得る免疫学的画像化試薬として使用され得る（例えば、放射線シンチグラフィ画像化方法において）。STEAPタンパク質はまた、以下にさらに記載されるように、癌ワクチンを生成するにおいて特に有用であり得る。

20

【0055】

（STEAPタンパク質）

本発明の別の局面は、種々のSTEAPタンパク質およびそのポリペプチドフラグメントを提供する。本明細書中に使用される場合、STEAPタンパク質は、図1A～Bに提供されるようなヒトSTEAP-1、図9A～Dに提供されるようなヒトSTEAP-2、図10A～Eに提供されるようなヒトSTEAP-3のアミノ酸配列、他の哺乳動物STEAPホモログ（例えば、STEAP-4）のアミノ酸配列および改変体、ならびにSTEAP生物学的活性を有するこれらのタンパク質の対立遺伝子改変体および保存的置換改変体（このような改変体およびホモログが以下に概説される方法に従って過度な実験を伴わずに単離/生成および特徴付けされ得る限り）を、有するかまたは含むタンパク質をいう。異なるSTEAPタンパク質またはそのフラグメントの部分を組合せる融合タンパク質、ならびにSTEAPタンパク質および異種ポリペプチドの融合タンパク質もまた含まれる。このようなSTEAPタンパク質は、集合的に、STEAPタンパク質、本発明のタンパク質、またはSTEAPという。本明細書中で使用される場合、用語「STEAPポリペプチド」は、少なくとも10個のアミノ酸（好ましくは、少なくとも15個のアミノ酸）のポリペプチドフラグメントまたはSTEAPタンパク質をいう。

30

40

【0056】

STEAPタンパク質の特定の実施形態は、図1A～Bに示されるようなヒトSTEAP-1のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。STEAPタンパク質の別の実施形態は、図9A～Dに示されるようなSTEAP-2アミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。別の実施形態は、図10A～Eに示されるSTEAP-3アミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。さらに別の実施形態は、図11A～Bに示される部分的なSTEAP-4アミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0057】

50

一般的に、ヒト S T E A P の天然に存在する対立遺伝子改変体は、高い程度の構造的同一性および相同性（例えば、90%以上の同一性）を共有する。代表的に、S T E A P タンパク質の対立遺伝子改変体は、本明細書中に記載される S T E A P 配列内に保存的アミノ酸置換を含むか、または S T E A P ホモログにおいて対応する位置に由来するアミノ酸の置換を含む。S T E A P 対立遺伝子改変体の1つのクラスは、特定の S T E A P アミノ酸配列の少なくとも小さな領域と高い程度の相同性を共有するが、この配列とは根本的な背反（例えば、非保存的置換、短縮化（*truncation*）挿入、またはフレームシフト）をさらに含むタンパク質である。

【0058】

保存的アミノ酸置換はしばしば、タンパク質のコンフォメーションも機能もいずれも変更することなく、タンパク質中で作製され得る。このような変化としては、以下が挙げられる：任意のイソロイシン（I）、バリン（V）、およびロイシン（L）の、任意の他のこれらの疎水性アミノ酸についての置換；グルタミン酸（E）に対するアスパラギン酸（D）、およびその逆の置換；アスパラギン（N）に対するグルタミン（Q）、およびその逆の置換；ならびに、スレオニン（T）に対するセリン（S）、およびその逆の置換。他の置換はまた、タンパク質の三次元構造における特定のアミノ酸の環境およびその役割に依存して、保存的とみなされ得る。例えば、グリシン（G）およびアラニン（A）は、しばしば交換可能であり得、アラニン（A）およびバリン（V）も同様であり得る。比較的疎水性であるメチオニン（M）はしばしば、ロイシンおよびイソロイシンと交換可能であり得、そして時としてバリンと交換可能であり得る。リシン（K）およびアルギニン（R）はしばしば、そのアミノ酸残基の重要な特徴がその電荷であり、そしてこれら2つのアミノ酸残基の異なる pK が重要でない位置において、交換可能である。さらに他の変化が、特定の状況において、「保存的」とみなされ得る。

【0059】

S T E A P タンパク質（改変体を含む）は、図 11 A ~ B に示されるアミノ酸配列を有する S T E A P タンパク質に共通した少なくとも1つのエピトープを含み、その結果、S T E A P タンパク質または改変体に特異的に結合する抗体はまた、図 11 A ~ B に示されるアミノ酸配列を有する S T E A P タンパク質に特異的に結合する。S T E A P タンパク質改変体の1つのクラスは、図 11 A ~ B のアミノ酸配列と90%以上の同一性を共有する。S T E A P タンパク質改変体のより特定のクラスは、上記のように細胞外タンパク質 S C P モチーフを含む。好ましい S T E A P タンパク質改変体は、本明細書中に記載される1つ以上のディフェンシン機能（例えば、腫瘍の死を誘導する能力または細胞移動を化学誘引および/もしくは誘導する能力を含む）を示し得る。

【0060】

S T E A P タンパク質は、多くの形態、好ましくは単離された形態で具体化され得る。本明細書中で使用される場合、このタンパク質と正常に関連する細胞構成成分から S T E A P タンパク質を取り出すために、物理的方法、機械的方法または化学的方法が使用される場合、タンパク質は「単離された」という。当業者は、単離された S T E A P タンパク質を得るために、標準的な精製方法を容易に使用し得る。精製された S T E A P タンパク質分子は、抗体または他のリガンドへの S T E A P 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および程度は、意図される用途に依存する。S T E A P タンパク質の実施形態は、精製された S T E A P および機能的な可溶性 S T E A P タンパク質を含む。1つの形態においては、このような機能的な可溶性 S T E A P 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に結合する能力を保持する。

【0061】

本発明はまた、S T E A P アミノ酸配列の生物学的に活性なフラグメントを含む S T E A P ポリペプチド（例えば、図 1 A ~ B に示されるような S T E A P - 1、図 9 A ~ D に示されるような S T E A P - 2、図 10 A ~ E に示されるような S T E A P - 3、または図 11 A ~ B に示されるような S T E A P - 4 のアミノ酸配列の部分に対応するポリペプチ

10

20

30

40

50

ド)を提供する。本発明のこのようなポリペプチドは、STEAPタンパク質の特性(例えば、STEAPタンパク質に関連するエピトープに特異的に結合する抗体の産生を誘発する能力)を示す。特定のSTEAPタンパク質に対して特有(他のSTEAPタンパク質に対して)であるアミノ酸配列を含むポリペプチドは、その特定のSTEAPタンパク質と特異的に反応する抗体を作製するために使用され得る。例えば、図11A~Eに示されるSTEAP構造のアミノ酸アラインメントを参照して、当業者は、各分子がその構造に特有な配列ストレッチを含むことを容易に認識する。これらの特有なストレッチは、特定のSTEAPに特異的な抗体を作製するために使用され得る。同様に、保存配列の領域は、複数のSTEAPに結合し得る抗体を作製するために使用され得る。

【0062】

本明細書中に開示される本発明の実施形態は、広範な種々の当該分野で認められたSTEAPタンパク質の改変体(例えば、アミノ酸の挿入、欠失および置換を有するポリペプチド)を含む。STEAP改変体は、当該分野において公知の方法(例えば、部位指向型変異誘発、アラニンスキャニング(alanine scanning)、およびPCR変異誘発)を使用して作製され得る。部位指向型変異誘発[Carterら、Nucleic Acids Res. 13:4331(1986); Zollerら、Nucleic Acids Res., 10:6487(1987)]、カセット変異誘発[Wellら、Gene 34:315(1985)]、制限選択的変異誘発[Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A 317:415(1986)]または他の公知技術を、クローン化されたDNAにおいて実施し、STEAP改変体DNAを産生し得る。スキャニングアミノ酸分析もまた、連続配列に沿って1以上のアミノ酸を同定するために使用され得る。とりわけ好ましいスキャニングアミノ酸は、比較的小さい中性アミノ酸である。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが挙げられる。アラニンが、代表的に、この群の中で好ましいスキャニングアミノ酸である。なぜなら、アラニンは、炭素を越えて側鎖を排除し、そして改変体の主鎖コンフォメーションを変更する可能性が低いからである。アラニンもまた、代表的に好ましい。なぜなら、アラニンは、最も一般的なアミノ酸であるからである。さらに、埋没位置および露出位置の両方において、頻繁に見出される[Creighton、The Proteins(W.H. Freeman & Co., NY); Chothia、J. Mol. Biol. 150:1(1976)]。アラニン置換が適切な量の改変体を生じない場合には、等配電子アミノ酸が使用され得る。

【0063】

上記で考察したように、本願発明の実施形態は、図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の全長アミノ酸配列未満を含むポリペプチドを含む。例えば、本明細書中に開示される本発明の代表的な実施形態は、以下が挙げられる:図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸1個~約アミノ酸10個からなるポリペプチド、図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸20個~約アミノ酸30個からなるポリペプチド、図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸30個~約アミノ酸40個からなるポリペプチド、図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸40個~約アミノ酸50個からなるポリペプチド、図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸50個~約アミノ酸60個からなるポリペプチド、図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸60個~約アミノ酸70個からなるポリペプチド、図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸70個~約アミノ酸80個からなるポリペプチド、図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸80個~約アミノ酸90個からなるポリペプチド、および図11A~Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸90個~約アミノ酸100個からなるポリペプチドなど。このスキームに従って、図11A~Bに示されるSTEAP-1タンパク質のアミノ酸100~339、図11A~Bに示されるSTEAP-2タンパク質のアミノ酸100~454、または図11A~Bに示されるSTEAP-3タンパク質のアミノ酸100~459、または図11A~Bに示されるSTEAP-4タンパク質のアミノ酸100~133

のアミノ酸配列の部分からなるポリペプチドが、本発明の代表的な実施形態である。STEAPタンパク質のより大きな部分からなるポリペプチドもまた意図される。例えば、図11A～Bに示されるSTEAPタンパク質の約アミノ酸1（または、20もしくは30もしくは40など）個～約アミノ酸20（または、30もしくは40もしくは50など）個からなるポリペプチドが、当該分野において周知の種々の技術によって生成され得る。

【0064】

本明細書中に開示される本発明のさらなる例示的な実施形態は、図11A～Bに示されるようなSTEAPポリペプチド配列内に含まれる1つ以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含むSTEAPポリペプチドを含む。1つ以上のこれらのモチーフまたは本明細書中に記載される目的の他の選択領域を含むSTEAPポリペプチドは、代表的に、選択されたモチーフの一面または両面上の隣接したSTEAPタンパク質配列のさらなる5～25またはそれを超えるアミノ酸残基を含む。1つの実施形態では、本発明の代表的なポリペプチドは、1つ以上の他のSTEAPタンパク質に対する相同性を示すSTEAPの1つ以上の領域を含み得る。別の実施形態において、本発明の代表的なポリペプチドは、STEAPタンパク質の1つ以上の免疫原性部分を含み得る。STEAPタンパク質の免疫原性部分の1つの例は、図1A～Bに示されるSTEAP-1アミノ酸配列のアミノ酸残基14～28である（WKMKPRRNLEEDDYL；配列番号22）。別の実施形態において、本発明の代表的なポリペプチドは、STEAP-1のアミノ酸165～173、STEAP-1のアミノ酸86～94、STEAP-1のアミノ酸262～270、STEAP-1のアミノ酸302～310、STEAP-1のアミノ酸158～166、STEAP-2のアミノ酸227～235、STEAP-2のアミノ酸402～410、STEAP-2のアミノ酸307～315、STEAP-2のアミノ酸306～314、およびSTEAP-2のアミノ酸100～108のような1つ以上の推定されたHLA-A2結合ペプチドを含み得る。別の実施形態において、本発明の代表的なポリペプチドは、図8に示されるSTEAP-2タンパク質のアミノ酸1～245、2～204、121～454、153～165、182～454、183～387、276～453、345～358、または419～454のようなSTEAP-2のフラグメントのすべてまたは一部からなる。これらの本発明の関連した実施形態としては、上記で考察された異なるモチーフの組合せを含むポリペプチドが挙げられ、好ましい実施形態は、これらのポリペプチドのモチーフまたは介在配列のいずれにも、挿入も欠失も置換も含んでいないポリペプチドである。

【0065】

STEAPポリペプチドは、本明細書中に開示されるヒトSTEAPタンパク質のアミノ酸配列に基づいて、当該分野において周知の、標準的なペプチド合成技術または化学切断方法を使用して生成され得る。あるいは、組換え方法を使用して、STEAPタンパク質のポリペプチドフラグメントをコードする核酸分子を生成し得る、この点において、本明細書中に記載されるSTEAPコード核酸分子は、STEAPタンパク質の規定のフラグメントを生成するための手段を提供する。STEAPポリペプチドは、ドメイン特異的抗体（例えば、STEAPタンパク質の細胞外エピトープおよび細胞内エピトープを認識する抗体）の生成および特徴付け、STEAPまたはその特定の構造ドメインに結合する薬剤または細胞因子の同定、および種々の治療状況（癌ワクチンを含むが、これらに限定されない）において、特に有用である。特定の興味深い構造を含むSTEAPポリペプチドは、例えば、以下：Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Karplus-SchultzまたはJameson-Wolf分析の方法を含む、当該分野で周知の種々の分析技術を使用するか、または免疫原性に基づいて、予測および/または同定され得る。このような構造を含むフラグメントは、サブユニット特異的抗STEAP抗体の生成、またはSTEAPに結合する細胞因子の同定において、特に有用である。

【0066】

以下の実施例に記載される特定の実施形態において、STEAPの分泌形態は、C末端6

10

20

30

40

50

× H i s および M Y C タグを有する、S T E A P をコードする C M V 駆動発現ベクター (p c D N A 3 . 1 / m y c H I S 、 I m v i t r o g e n) でトランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞において、簡便に発現され得る。培養液中に分泌された H I S タグ化 S T E A P は、ニッケルカラムおよび標準的な技術を使用して精製され得る。あるいは、A P 標識系が使用され得る。S T E A P の発現のための種々の構築物が、以下の実施形態に記載される。

【 0 0 6 7 】

S T E A P の改変 (例えば、共有結合性改変) は、本発明の範囲内に含まれる。1 つの型の共有結合性改変としては、S T E A P の選択された側鎖あるいは N 末端残基または C 末端残基と反応し得る有機誘導体化薬剤での、S T E A P ポリペプチドの標的化されたアミノ酸残基の反応が挙げられる。本発明の範囲内の S T E A P ポリペプチドの別の型の共有結合性改変としては、このポリペプチドのネイティブなグリコシル化パターンの変更が挙げられる。「ネイティブなグリコシル化パターンの変更」は、ネイティブ配列 S T E A P に見い出される 1 以上の炭水化物部分の欠失 (基礎となるグリコシル化部位の除去、または化学的手段および / または酵素的手段によるグリコシル化の欠失のいずれかによって)、および / またはネイティブ配列 S T E A P に存在しない、1 以上のグリコシル化部位の付加を意味するために、本明細書中で目的について意図される。さらに、この句は、存在する種々の炭水化物部分の性質および割合の変更を含む、ネイティブタンパク質のグリコシル化の質的变化を含む。S T E A P の別の型の共有結合性改変としては、米国特許第 4 , 6 4 0 , 8 3 5 号、同第 4 , 4 9 6 , 6 8 9 号、同第 4 , 3 0 1 , 1 4 4 号、同第 4 , 6 7 0 , 4 1 7 号、同第 4 , 7 9 1 , 1 9 2 号または同第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号に示されるような様式の、種々の非タンパク質様ポリマー (例えば、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレン) のうちの 1 つへの、S T E A P ポリペプチドの連結が挙げられる。

【 0 0 6 8 】

本発明の S T E A P はまた、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合された S T E A P を含むキメラ分子を形成する様式で、改変され得る。1 つの実施形態において、このようなキメラ分子としては、ポリヒスチジンエピトープタグを有する S T E A P の融合体が挙げられ、このタグは、固定されたニッケルが選択的に結合し得るエピトープを提供する。このエピトープタグは、一般に、S T E A P のアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。代替的实施形態において、このキメラ分子は、S T E A P の免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合体を含み得る。キメラ分子の二価形態 (「免疫付着因子 (i m m u n o a d h e s i n) 」とも呼ばれる) について、このような融合体は、I g G 分子の F c 領域に対するものであり得る。この I g 融合体は、好ましくは、I g 分子内の少なくとも 1 つの可変領域の、S T E A P ポリペプチドの可溶性 (膜貫通ドメインを欠失または不活性化した) 形態での置換を含む。特に好ましい実施形態において、免疫グロブリン融合体は、ヒンジ領域、C H 2 領域および C H 3 領域、または I g G I 分子のヒンジ領域、C H 1 領域、C H 2 領域および C H 3 領域を含む。免疫グロブリン融合体の産生については、米国特許第 5 , 4 2 8 , 1 3 0 号 (1 9 9 5 年 6 月 2 7 日公布) もまた参照のこと。

【 0 0 6 9 】

(S T E A P 抗体)

本発明の別の局面は、S T E A P タンパク質およびポリペプチドに結合する抗体を提供する。最も好ましい抗体は、S T E A P タンパク質に特異的に結合し、そして非 S T E A P タンパク質およびポリペプチドに結合しない (または、弱く結合する)。特に意図される抗 S T E A P 抗体としては、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにこれらの抗体の抗原結合ドメインおよび / または 1 以上の相補性決定領域を含むフラグメントが挙げられる。本明細書中で使用される場合、抗体フラグメントは、その標的に結合する免疫グロブリン分子の可変領域 (すなわち、抗原結合領域) の少なくとも一部として定義される。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

いくつかの適用について、特定の構造的ドメイン内の特定の S T E A P タンパク質および / またはエピトープと特異的に反応する抗体を産生することが所望であり得る。例えば、癌治療および診断画像化目的のために有用な好ましい抗体は、癌細胞において発現されるような S T E A P タンパク質の細胞外領域におけるエピトープと反応する抗体である。このような抗体は、免疫原として、本明細書中に記載される S T E A P タンパク質を使用するか、またはその推定された細胞外ドメインに由来するペプチドを使用して産生され得る。この点で、図 1 B において示されるような S T E A P - 1 タンパク質の形態的概略図を参照して、示された膜貫通ドメインの間の細胞外ループにおける領域が、細胞外特異的抗体を惹起するための適切な免疫原を設計する場合に使用され得る。

10

【 0 0 7 1 】

本発明の S T E A P 抗体は、前立腺癌の治療ストラテジー、診断アッセイおよび予後アッセイ、ならびに画像化方法において特に有用であり得る。同様に、このような抗体は、S T E A P が他の型の癌においてもまた発現または過剰発現される程度に、他の癌の処置、診断および / または予後に有用であり得る。本発明は、S T E A P および変異体 S T E A P のタンパク質およびポリペプチドの、検出および定量に有用な種々の免疫学的アッセイを提供する。このようなアッセイは、一般に、適切には、S T E A P または変異体 S T E A P タンパク質を認識および結合し得る、1 以上の S T E A P 抗体を含み、そして、以下を含むが、これらに限定されない当該分野で周知の種々の免疫学的アッセイ形式で行われ得る：種々の型のラジオイムノアッセイ、酵素連結免疫吸着アッセイ (E L I S A)、酵

20

【 0 0 7 2 】

S T E A P 抗体はまた、S T E A P および変異体 S T E A P のタンパク質およびポリペプチドの精製、および S T E A P ホモログおよび関連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、S T E A P タンパク質を精製する方法は、S T E A P 抗体 (これは、固体マトリックスに結合されている) を、S T E A P を含有する溶解物または他の溶液と共に、この S T E A P 抗体が S T E A P に結合するのを可能にする条件下でインキュベートする工程 ; 固体マトリックスを洗浄して不純物を除去する工程 ; および S T E A P をその結合された抗体から溶出する工程を包含する。本発明の S T E A P 抗体の他の用途としては、S T E A P タンパク質を模倣する抗イディオタイプ抗体の生成が挙げられる。

30

【 0 0 7 3 】

S T E A P 抗体はまた、例えば、S T E A P タンパク質の生物学的活性を調節または阻害することによって、あるいは、S T E A P タンパク質を発現する癌細胞を標的化および破壊することによって、治療学的に使用され得る。前立腺癌および他の癌の抗体治療は、以下の別々の小節においてより詳細に記載される。

40

【 0 0 7 4 】

抗体の調製のための種々の方法が、当該分野で周知である。例えば、抗体は、単離または免疫結合体化された形態の、S T E A P のタンパク質、ペプチドまたはフラグメントを使用して、適切な哺乳動物宿主を免疫することによって調製され得る (A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C S H P r e s s 編、H a r l o w および L a n e (1 9 8 8) ; H a r l o w、A n t i b o d i e s , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , N Y (1 9 8 9))。タンパク質免疫原の例としては、組換え S T E A P (バキュロウイルス系、哺乳動物系などにおいて発現される)、1 つ以上の抗体定常領域 (A P - 標識化 S T E A P など) に結合体化された S T E A P タンパク質の S T E A P 細胞外ドメインまたは細胞外ループが挙げられる。さらに、S T E A P

50

の融合タンパク質（例えば、STEAPのGST、マルトース結合タンパク質（MBP）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、HisMax-TOPOまたはMysHis（例えば、以下の実施例を参照のこと）との融合体のようなSTEAPの融合タンパク質もまた使用され得る。

【0075】

特定の実施形態において、図11A～Bに示されるようなオープンリーディングフレームアミノ酸配列の全てまたはほとんどを含むGST融合タンパク質が生成され得、そして適切な抗体を生成するための免疫原として使用され得る。STEAPを発現するかまたは過剰発現する細胞がまた免疫のために使用され得る。同様にSTEAP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。このような戦略は、内因性STEAPを認識するための強化された能力を有するモノクローナル抗体の産生を生じ得る。別の有用な免疫原は、ヒツジの赤血球細胞の原形質膜に結合したSTEAPペプチドを含む。

10

【0076】

図11A～Bに示されるようなSTEAPタンパク質のアミノ酸配列を使用して、抗体を生成するためにSTEAPタンパク質の特定の領域を選択し得る。例えば、STEAPアミノ酸配列の疎水性および親水性分析を使用して、STEAP構造の疎水性領域を同定し得る。免疫原性構造を示すSTEAPタンパク質の領域、ならびに他の領域およびドメインは、以下のような当該分野で公知の種々の他の方法を使用して容易に同定され得る：Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Karplus-SchultzまたはJameson-Wolf分析。HLA-A2を結合することが推定されるSTEAPのペプチドは、抗体の産生のために選択され得るか、またはCTL応答を産生するために使用され得る。このような推定されたHLA-A2結合ペプチドとしては、以下を含むがこれらに限定されない：STEAP-1のアミノ酸165-173、STEAP-1のアミノ酸86-94、STEAP-1のアミノ酸262-270、STEAP-1のアミノ酸302-310、STEAP-1のアミノ酸158-166、STEAP-2のアミノ酸227-235、STEAP-2のアミノ酸402-410、STEAP-2のアミノ酸307-315、STEAP-2のアミノ酸306-314、STEAP-2のアミノ酸100-108。以下の実施例において議論されるように、免疫原性は、STEAPを用いて実証され得、これは、それぞれ、ウサギおよびマウスを使用して、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を生成するために使用される。このB細胞応答（抗体生成）は、STEAPの免疫原性部分によって誘発された最初のT細胞応答の結果である。

20

30

【0077】

免疫原としての使用のためのタンパク質またはポリペプチドを調製するための方法、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。いくつかの状況下で、例えば、カルボジイミド試薬を使用する直接的な結合体化が使用され得；他の例において、連結試薬（例えば、Pierce Chemical Co., Rockford, ILによって供給される連結試薬）が、効果的であり得る。STEAP免疫原の投与は一般に、当該分野で一般に理解されるように、適切な期間にわたって、適切なアジュバントの使用を伴う注射によって行われ得る。免疫スケジュールの間、抗体の力価は、抗体形成の能力（adequacy）を決定することによって理解され得る。

40

【0078】

STEAPモノクローナル抗体は、好ましくは、当該分野で周知の種々の手段によって産生され得る。例えば、所望のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株が、一般に公知のように、KohlerおよびMilsteinの標準的なハイブリドーマ技術、または産生性（producing）B細胞を不死化する改変を使用して調製され得る。所望の抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原がSTEAPタンパク質またはSTEAPフラグメントである免疫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、これらの細胞を拡大し、そしてインビトロ培養物また

50

は腹水のいずれかから抗体が産生され得る。

【0079】

抗体またはフラグメントはまた、現在の技術を使用する、組換え手順によって産生され得る。STEAPタンパク質の所望の領域に特異的に結合する領域はまた、複数の種起源のキメラ抗体またはCDR移植化(grafted)抗体の状況下で産生され得る。ヒト化STEAP抗体またはヒトSTEAP抗体もまた産生され得、そして治療的状況下での使用のために好ましい。1以上の非ヒト抗体CDRを対応するヒト抗体配列と置換することによる、マウス抗体および他の非ヒト抗体をヒト化するための方法は、周知である(例えば、Jonesら、1986、Nature 321:522-525; Riechmannら、1988、Nature 332:323-327; Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-1536を参照のこと)。Carterら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285、およびSimsら、1993、J. Immunol. 151:2296もまた参照のこと。完全なヒトモノクローナル抗体を産生するための方法としては、ファージディスプレイ法およびトランスジェニック法が挙げられる(概要について、Vaughanら、1998、Nature Biotechnology 16:535-539を参照のこと)。

10

【0080】

完全なヒトSTEAPモノクローナル抗体は、大きいヒトIg遺伝子コンビナトリアルライブラリー(すなわち、ファージディスプレイ)を使用するクローニング技術を使用して生成され得る(Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications (Man. Clark, M. 編)、Nottingham Academic、45-64頁(1993)のGriffithsおよびHoogenboom、Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries; BurtonおよびBarbas、Human Antibodies from combinatorial libraries (同書)65-82頁)。完全なヒトSTEAPモノクローナル抗体はまた、1997年12月3日提出のPCT特許出願WO98/24893に記載されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作されたトランスジェニックマウスを使用して産生され得る(Jakobovits、1998、Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):607-614もまた参照のこと)。この方法は、ファージディスプレイ技術に必要とされるインビトロ操作を回避し、そして高親和性の真正ヒト抗体を効率的に産生する。

20

30

【0081】

STEAP抗体のSTEAPタンパク質との反応性は、適切には、STEAPタンパク質、STEAPペプチド、STEAP発現細胞またはその抽出物を使用する、多くの周知の手段(ウエスタンブロット、免疫沈降、ELISAおよびFACS分析を含む)によって確認され得る。

【0082】

本発明のSTEAP抗体またはそのフラグメントは、検出可能なマーカで標識され得るか、または細胞毒または他の治療薬剤のような第2の分子に結合体化され得るか、STEAPポジティブ細胞に第2の分子を標的化するために使用される(Vitetta, E. S. ら、1993、Immunotoxin therapy、DeVita, Jr., V. T. ら編、Cancer: Principle and Practice of Oncology, 第4版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636)。細胞障害性薬剤の例としては、リシン、リシンA鎖、ドキソルビシン、メイタンシノイド、ダウノルビシン、タキソール、エチジウムプロマイド、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、ジフテリア毒素、Pseudomonas 外毒素(PE)A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデシン(mo

40

50

deccin) A鎖、 -サルシン(sarcin)、ゲロニン、マイトジェリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン、キュリシン、クロチン、カリーチアミシン、サパオナリアオフィシナリス(sapaonarria officinalis)インヒビター、およびグルココルチコイドおよび他の化学療法剤、ならびに²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、および¹⁸⁶Reのような放射性同位体が挙げられるがこれらに限定されない。適切な検出可能なマーカーとしては、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が挙げられるが、これらに限定されない。抗体は、プロドラッグをその活性化形態に変換し得る抗癌プロドラッグ活性化酵素に結合体化され得る。例えば、米国特許第4,975,287号を参照のこと。

10

【0083】

さらに、2つ以上のSTEAPエピトープについて特異的な二重特異的抗体は、当該分野で一般的に公知の方法を使用して産生され得る。さらに、抗体エフェクター機能は、癌細胞に対するSTEAP抗体の治療効果を増強するために改変され得る。例えば、システイン残基は、Fc領域中に操作され得、鎖間ジスルフィド結合の形成、ならびに、内部移行、ADCCおよび/または補体媒介細胞死滅について増強された能力を有し得るホモ二量体の産生を可能にし得る(例えば、Caronら、1992、J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922)。ホモダイマー性の抗体もまた、当該分野で公知の架橋技術によって生成され得る(例えば、Wolffら、Cancer Res. 53:2560-2565)。

20

【0084】

(STEAPトランスジェニック動物)

STEAPまたはその改変形態をコードする核酸はまた、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物のいずれかを生成するために使用され得、これらの動物は、次いで、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である。トランスジェニック動物(例えば、マウスまたはラット)は、導入遺伝子を含む細胞を有する動物であり、その導入遺伝子は、その動物に、または出生前(例えば、胚段階)でその動物の祖先に導入される。導入遺伝子は、細胞のゲノム内に組み込まれるDNAであり、トランスジェニック動物は、その細胞から発生する。1つの実施形態において、STEAPをコードするcDNAが、確立された技術に従って、STEAPコードするゲノムDNAをクローニングするために使用され得、そしてそのゲノム配列は、STEAPをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を生成するために使用され得る。

30

【0085】

トランスジェニック動物(特に、マウスまたはラットのような動物)を生成するための方法は、当該分野で慣用的となり、そして例えば、米国特許第4,736,866号および4,870,009号に記載される。代表的に、特定の細胞が、組織特異的エンハンサーと共にSTEAP導入遺伝子の組み込みのために標的化される。胚段階の動物の生殖系列に導入された、STEAPをコードする1コピーの導入遺伝子を含むトランスジェニック動物を使用して、STEAPをコードするDNAの発現の増大の効果を試験し得る。このような動物は、例えば、その過剰発現と関連する病理学的状態からの防御を付与することが考えられる試薬についての、試験動物として使用され得る。本発明のこの局面に従って、動物をその試薬で処置し、そしてこの導入遺伝子を保有する処置していない動物と比較した、その病理学的状態の発生率の減少は、その病理学的状態についての潜在的な治療的介入を示す。

40

【0086】

あるいは、STEAPの非ヒトホモログを使用して、STEAP「ノックアウト」動物を構築し得、この動物は、STEAPをコードする内因性遺伝子とその動物の胚細胞に導入されたSTEAPをコードする改変ゲノムDNAと間の相同組換えの結果として、STEAPをコードする欠損性または改変型遺伝子を有する。例えば、STEAPをコードする

50

cDNAを使用して、確立された技術に従って、STEAPをコードするゲノムDNAをクローニングし得る。STEAPをコードするゲノムDNAの一部は、欠失され得るか、または別の遺伝子（例えば、組み込みをモニターするために使用され得る、選択マーカーをコードする遺伝子）で置換され得る。

【0087】

代表的に、数千ベースの変更されていない隣接DNA（5'末端および3'末端の両方）が、そのベクターに含まれる（相同組換えベクターの記載については、例えば、ThomasおよびCapecchi、Cell、51:503を参照のこと）。このベクターは、胚性幹細胞株に（例えば、エレクトロポレーションによって）導入され、そして導入されたDNAが内因性のDNAと相同組換えした細胞が、選択される[例えば、Liら、Cell、69:915(1992)を参照のこと]。次いで、この選択された細胞を、動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞に導入し、凝集キメラを形成させる[例えば、Bradley、Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach、E.J. Robertson編（IRL, Oxford、1987）、113-152頁を参照のこと]。

10

【0088】

次いで、キメラ性の胚を、適切な偽妊娠雌性養母動物に移植し、そしてその胚は、満期まで育成させて、「ノックアウト」動物を作製し得る。生殖細胞中に相同組換えされたDNAを有する子孫は、標準的な技術によって同定され得、そしてその子孫を用いて、全ての細胞が相同組換えDNAを含む動物を育種し得る。ノックアウト動物は、例えば、STEAPポリペプチドの非存在に起因する、特定の病理学的状態に対して防御する能力および病理学的状態の発生について、特徴付けられ得る。

20

【0089】

（STEAPおよびその産物の状態のモニタリング）

個体におけるSTEAP遺伝子およびSTEAP遺伝子産物の状態を評価するアッセイは、この個体に由来する生物学的サンプルの増殖または腫瘍潜在性に関する情報を提供し得る。例えば、STEAP mRNAは、多くの正常組織ではなく前立腺においてかなり多く発現され、その発現は特定の癌と関連するので、生物学的サンプル中のSTEAP mRNA転写物またはタンパク質の相対レベルを評価するアッセイは、STEAP調節不全と関連する疾患（例えば、癌または良性の前立腺増殖（BPH））を診断するために使用され得、そして適切な治療オプションを規定するに有用である予後情報を提供し得る。同様に、生物学的サンプルにおけるSTEAPヌクレオチドおよびアミノ配列の完全性を評価するアッセイもまた、この状況において使用され得る。

30

【0090】

STEAP mRNAが前立腺癌および他の癌において発現され、そして多くの正常組織において発現されないという知見は、この遺伝子が細胞増殖の調節不全に関連するという証拠を提供し、それによってこの遺伝子およびその産物を、当業者がSTEAP調節不全に関連する疾患を有することが疑われる個体由来の生物学的サンプルを評価するために使用し得る標的として同定する。別の実施形態において、STEAPの発現は、通常前立腺に制限されるので、当業者はまた、転移の指標としてSTEAP発現を検出するために他の組織から採取された生物学的サンプルを評価し得る。例えば、図31A-Fにおいて示されるように、STEAP-1に対する抗体は、従来の前立腺癌マーカー（PSA）と比較して、転移の検出のための優れたマーカーを提供する。このようなマーカーは、組織生検の評価において、そしてインビボ画像化ストラテジーの一部としての両方で有用である。この状況において、STEAP遺伝子およびその産物の発現状態の評価は、組織サンプルに潜在的な疾患に関する情報を得るために使用され得る。この状況における用語「発現状態」は、遺伝子およびその産物の発現、機能および調節（例えば、mRNA発現レベル、発現された遺伝子産物（例えば、核酸およびアミノ酸配列）の完全性、ならびにこれらの分子に対する転写改変および翻訳改変）に關与する種々の因子を広範にいうために使用

40

50

される。

【0091】

STEAPの発現状態は、特定の疾患の状態、進行および/または腫瘍攻撃性に対する感受性を推定するために有用な情報を提供し得る。本発明は、STEAP発現状態を決定し、そしてSTEAPを発現する癌（例えば、前立腺癌）を診断するための方法およびアッセイを提供する。患者サンプルにおけるSTEAP発現状態は、当該分野で周知の多数の手段（免疫組織化学的分析、インサイチュハイブリダイゼーション、レーザ捕捉マイクロ精査（micro-dissected）サンプルに対するRT-PCR分析、臨床サンプルおよび細胞株のウエスタンブロット分析、ならびに組織アレイ分析が挙げられるがこれらに限定されない）によって分析され得る。STEAP遺伝子および遺伝子産物の発現状態を評価するための代表的なプロトコールは、例えば、Current Protocols In Molecular Biology, Units 2 [Northern Blotting], 4 [Southern Blotting], 15 [Immunoblotting] および 18 [PCR Analysis], Frederick M. Ausubulら（編）（1995）に見出され得る。

10

【0092】

1つの局面において、本発明は、細胞増殖の調節不全と関連する疾患（例えば、過形成または癌）を有すると疑われる個体に由来する試験組織サンプル中の細胞によって発現されるSTEAP遺伝子産物の状態を決定して、次いでそのように決定された状態を、対応する正常サンプル中のSTEAP遺伝子産物の状態と比較することによってSTEAP遺伝子産物をモニターするための方法を提供し、正常サンプルと比較して試験サンプルにおける異常なまたは変更された状態のSTEAP遺伝子産物の存在は、この個体の細胞において細胞増殖の調節不全の存在の指標を提供する。

20

【0093】

本発明はさらに、調節不全の細胞増殖の証拠について生物学的サンプルを調査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、対応する正常なサンプル中でのSTEAPの状態に対して生物学的サンプルにおけるSTEAPの状態を比較する工程を包含し、ここで、生物学的サンプルにおけるSTEAPの状態における変更が、調節不全の細胞増殖に関連している。生物学的サンプル中のSTEAPの状態は、例えば、STEAP mRNA発現およびSTEAPタンパク質発現のレベルを調査することによって、評価され得る。1つの実施形態において、STEAPの状態における変更は、STEAP発現細胞が通常存在しない組織由来の生物学的サンプル中のSTEAP発現細胞の存在によって同定される。

30

【0094】

別の局面において、本発明は、個体における癌の存在の決定に有用なアッセイを提供する。このアッセイは、対応する正常細胞または組織における発現レベルと比べて、試験細胞サンプルまたは組織サンプルにおけるSTEAP mRNAまたはタンパク質の発現における有意な増加を検出する工程を包含する。STEAP mRNAの存在は、例えば、結腸、肺、前立腺、膵臓、膀胱、乳房、卵巣、頸部、精巣、頭部および頸部、脳、胃、骨などを含むがこれらに限定されない組織サンプル中で評価され得る。これらの組織のいずれかにおける有意なSTEAP発現の存在は、これらの癌、または別の組織に由来する癌の転移の発生、存在および/または重篤度を示すために有用であり得る。なぜなら、対応する正常組織は、STEAP mRNAを発現しないかまたは低いレベルで発現するからである。

40

【0095】

関連する実施形態において、STEAP発現状態は、核酸レベルではなくタンパク質レベルで決定され得る。例えば、このような方法またはアッセイは、試験組織サンプル中の細胞によって発現されるSTEAPタンパク質のレベルを決定する工程、およびそのように決定されたレベルを、対応する正常サンプルにおいて発現されるSTEAPのレベルに対して比較する工程を包含する。1つの実施形態において、STEAPタンパク質の存在は

50

、例えば、免疫組織化学方法を使用して評価される。S T E A P タンパク質発現を検出し得る S T E A P 抗体または結合パートナーが、この目的のために、当該分野で周知の種々のアッセイ形式において使用され得る。以下の実施例において示されるように、S T E A P 免疫反応性は、前立腺癌、膀胱癌および肺癌、ならびに B P H および前立腺癌転移に関連している。

【 0 0 9 6 】

他の関連する実施形態において、これらの分子の構造における混乱 (p e r t u r b a t i o n) (例えば、挿入、欠失、置換など) を同定するために、生物学的サンプル中の S T E A P ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の完全性を評価し得る。このような実施形態は、有用である。なぜなら、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列における混乱は、増殖調節不全の表現型と関連する多くのタンパク質で観察されるからである (例えば、M a r r o g i ら、J . G u t a n . P a t h o l . 2 6 (8) : 3 6 9 ~ 3 7 8 (1 9 9 9) を参照のこと)。この状況において、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列における混乱を観察するための広範な種々のアッセイが、当該分野において周知である。例えば、S T E A P 遺伝子産物の核酸配列またはアミノ酸配列のサイズおよび構造は、本明細書中で議論されるノーザン、サザン、ウエスタン、P C R および D N A 配列決定プロトコールによって観察され得る。さらに、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列における混乱を観察するための他の方法 (例えば、一本鎖高次構造多型分析) が、当該分野で周知である (例えば、米国特許第 5 , 3 8 2 , 5 1 0 号および同第 5 , 9 5 2 , 1 7 0 号を参照のこと)。

【 0 0 9 7 】

別の実施形態では、生物学的サンプル中の S T E A P 遺伝子のメチル化状態を試験し得る。遺伝子の 5 ' 調節領域中の C p G 島の異常な脱メチル化および/または過剰メチル化は、しばしば、不死化細胞および形質転換細胞中で生じ、そして種々の遺伝子の発現改変を生じさせ得る。例えば、クラスグルタチオン S - トランスフェラーゼ (正常な前立腺において発現されるが、90% より多くの前立腺癌においては発現されないタンパク質) のプロモーターの過剰メチル化は、この遺伝子の転写を持続的にサイレントにさせるようであり、そして前立腺癌において最も頻繁に検出されるゲノム改変である (D e M a r z o ら、1999、A m . J . P a t h o l . 1 5 5 (6) : 1 9 8 5 - 1 9 9 2)。さらに、この改変は、高度前立腺上皮内腫瘍 (P I N) の少なくとも 70% の症例において存在する (B r o o k s ら、1998、C a n c e r E p i d e m i o l . B i o m a r k e r s P r e v . 7 : 5 3 1 - 5 3 6)。

【 0 0 9 8 】

別の例では、L A G E - I 腫瘍特異遺伝子 (これは、正常な前立腺においては発現されないが、25 ~ 50% の前立腺癌において発現される) の発現は、リンパ芽球様細胞 (l y m p h o b l a s t o i d c e l l) においてデオキシ - アザシチジンによって誘導される。このことは、腫瘍での発現が、脱メチル化に起因することを示唆する (L e t h e r ら、1998、I n t . J . C a n c e r 7 6 (6) : 9 0 3 - 9 0 8)。この状況下において、遺伝子のメチル化状態を試験するための種々のアッセイが、当該分野において周知である。例えば、サザンハイブリダイゼーションアプローチにおいて、C p G 島の全体的なメチル化状態を評価するために、メチル化 C p G 部位を含む配列を切断し得ないメチル化感受性制限酵素が使用され得る。

【 0 0 9 9 】

さらに、M S P (メチル化特異的 P C R) は、迅速に、所定の遺伝子の C p G 島に存在するすべての C p G 部位のメチル化状態をプロファイル付けし得る。この手順は、亜硫酸水素ナトリウム (これは、すべての非メチル化シトシンをウラシルへと変換する) による D N A の最初の改変、次いで、非メチル化 D N A に対してメチル化 D N A に特異的なプライマーを使用する増幅を包含する。メチル化の干渉を含むプロトコールはまた、例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s I n M o l e c u l a r B i o l o g y、第 1 2 単元、F r e d e r i c k M . A u s u b e l ら編、1995 において見出され得る。

【0100】

別の関連の実施形態では、本発明は、個体における癌の存在を検出するにおいて有用なアッセイを提供する。このアッセイは、対応する正常な細胞または組織における発現レベルと比較して、試験細胞または組織サンプル中で発現されるSTEAP選択的スプライシング改変体の有意な変化を検出する工程を包含する。STEAPの選択的スプライス改変体のモニタリングは有用である。なぜなら、タンパク質の選択的スプライシングの変化は、癌の進行へと導く一連の事象の工程のうちの1つであると示唆されるからである（例えば、Carstensら、Oncogene 15(250:3059-3065(1997))を参照のこと）。

【0101】

遺伝子増幅は、STEAPの状態を評価するさらなる方法を提供する。遺伝子増幅は、本明細書中に提供された配列に基づく適切に標識されたプローブを用いる、例えば、従来のサザンブロッティング、mRNAの転写を定量するためのノーザンブロッティング[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205(1980)]、ドットブロッティング(DNA分析)、またはインサイチュハイブリダイゼーションによって直接的に、サンプル中で測定され得る。あるいは、特定の二重鎖(DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖、またはDNA-タンパク質二重鎖を含む)を認識し得る抗体を使用し得る。次いで、この抗体を標識し得、そしてアッセイを実施し得る。ここでは、二重鎖は表面に結合され、その結果、表面上での二重鎖の形成に際して、この二重鎖に結合した抗体の存在が検出され得る。

【0102】

上記に考察した組織に加えて、末梢血が、癌細胞(前立腺癌を含むが、これに限定されない)の存在について、RT-PCRを使用して従来的にアッセイされ、STEAP発現を検出し得る。RT-PCRで増幅可能なSTEAP mRNAの存在は、癌の存在の指標を提供する。末梢血中の腫瘍細胞に関するRT-PCR検出アッセイは、現在、多数のヒト固形腫瘍の診断および管理において使用するために評価されている。前立腺癌の分野において、これらとしては、PSAおよびPSMを発現する細胞の検出についてのRT-PCRアッセイが挙げられる(Verkaiら、1997、Urol. Res. 25:373-384; Ghosseinら、1995、J. Clin. Oncol. 13:1195-2000; Hestonら、1995、Clin. Chem. 41:1687-1688)。RT-PCRアッセイは、当該分野において周知である。

【0103】

本発明の関連の局面は、個体における癌の発生に対する感受性予測に関する。1つの実施形態では、癌に対する感受性を予測するための方法は、以下の工程を包含する：組織サンプル中においてSTEAP mRNAまたはSTEAPタンパク質を検出する工程であって、その存在は癌に対する感受性を示し、ここで、存在するSTEAP mRNA発現の程度は、感受性の程度に対して比例する、工程。特定の実施形態では、前立腺組織中のSTEAPの存在を試験し、サンプル中のSTEAPの存在は、前立腺癌感受性(すなわち、前立腺腫瘍の発生または存在)の指標を提供する。密接に関連した実施形態では、生物学的サンプル中のSTEAPヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性が評価されて、これらの分子の構造における摂動(perturbation)(例えば、挿入、欠失、置換など)を同定し得、サンプル中のSTEAP遺伝子産物における1以上の摂動の存在は、癌感受性(すなわち、腫瘍の発生または存在)の指標を提供する。

【0104】

本発明のさらに別の関連した局面は、腫瘍の攻撃性を測定するための方法に関する。1つの実施形態では、腫瘍の攻撃性を測定するための方法は、以下の工程を包含する：腫瘍のサンプル中の細胞によって発現されるSTEAP mRNAまたはSTEAPタンパク質のレベルを決定する工程、そのようにして決定されたレベルを、同一個体から採取された対応する正常組織または正常組織参照サンプル中において発現されるSTEAP mRNAまたはSTEAPタンパク質のレベルに対して比較する工程であって、正常サンプルと

比較した腫瘍サンプル中のSTEAP mRNAまたはSTEAPタンパク質の発現程度は、攻撃性の程度を示す、工程。特定の実施形態では、前立腺腫瘍の攻撃性は、腫瘍細胞中においてSTEAPが発現される程度を決定することによって評価され、より高い発現レベルは、より攻撃性の高い腫瘍を示す。密接に関連した実施形態では、生物学的サンプル中のSTEAPヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性を評価して、これらの分子の構造における摂動（例えば、挿入、欠失、置換など）を同定し得、1以上の摂動の存在は、より攻撃性の高い腫瘍を示す。

【0105】

本発明のさらに別の関連した局面は、経時的に、個体中の悪性疾患の進行を観察するための方法に関する。1つの実施形態では、経時的に、個体中の悪性疾患の進行を観察するための方法は、以下の工程を包含する：腫瘍のサンプル中の細胞によって発現されるSTEAP mRNAまたはSTEAPタンパク質のレベルを決定する工程、そのようにして決定されたレベルを、異なる時間の同一個体から採取された等価な組織サンプル中で発現されるSTEAP mRNAまたはSTEAPタンパク質のレベルに対して比較する工程であって、ここで腫瘍サンプル中での経時的なSTEAP mRNAまたはSTEAPタンパク質の発現程度は、癌の進行に関する情報を提供する。特定の実施形態では、癌の進行は、腫瘍細胞中のSTEAP発現が経時的に変化する程度を決定することによって評価され、より高い発現レベルは癌の進行を示す。密接に関連した実施形態では、生物学的サンプル中のSTEAPヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性を評価して、このような分子の構造における摂動（例えば、挿入、欠失、置換など）を同定し得、1以上の摂動の存在は、癌の進行を示す。

【0106】

上記の診断アプローチは、当該分野において公知の広範な種々の予後プロトコールおよび診断プロトコールのいずれとも組み合わせられ得る。例えば、本明細書中に開示された本発明の別の実施形態は、STEAP遺伝子およびSTEAP遺伝子産物の発現（または、STEAP遺伝子およびSTEAP遺伝子産物における摂動）と、組織サンプルの状態を診断および予後判定する手段としての悪性疾患関連因子との間の一致を観察するための方法に関する。この状況下において、広範な種々の悪性疾患関連因子が利用され得る（例えば、さもなくば悪性疾患と関連付けられる遺伝子の発現（PSA、PSCAおよびPSMの発現を含む）ならびに全体的な細胞学的観察（例えば、Bockingら、1984、Anal. Quant. Cytol. 6(2): 74-88; Epstein、1995、Hum. Pathol. 1995年2月; 26(2): 223-9; Thorsonら、1998、Mod. Pathol. 11(6): 543-51; Baisdenら、1999、Am. J. Surg. Pathol. 23(8): 918-24を参照のこと）。STEAP遺伝子およびSTEAP遺伝子産物の発現（または、STEAP遺伝子およびSTEAP遺伝子産物における摂動）と、さらなる悪性疾患関連因子との間の一致を観察するための方法は、例えば、一致する特定の因子のセットまたは型の存在が、組織サンプルの状態を診断および予後判定するために重要な情報を提供するもので、有用である。

【0107】

代表的な実施形態では、STEAP遺伝子およびSTEAP遺伝子産物の発現（または、STEAP遺伝子およびSTEAP遺伝子産物における摂動）と、悪性疾患関連因子との間の一致を観察する方法は、以下の工程を内含する：組織サンプル中のSTEAP mRNAまたはタンパク質の過剰発現を検出する工程、組織サンプル中のPSA mRNAまたはタンパク質の過剰発現を検出する工程、およびSTEAP mRNAまたはタンパク質の過剰発現と、PSA mRNAまたはタンパク質の過剰発現との一致を観察する工程。特定の実施形態では、前立腺組織におけるSTEAPおよびPSAのmRNA発現を試験する。好ましい実施形態では、サンプル中のSTEAP mRNAとPSA mRNAとの過剰発現の一致は、前立腺癌、前立腺癌感受性、または前立腺腫瘍の発生もしくは存在の指標を提供する。

【0108】

STEAP mRNAまたはタンパク質の発現を検出および定量するための方法は、本明細書中に記載されており、そして当該分野において周知の標準的な核酸およびタンパク質の検出技術および定量技術を使用する。STEAP mRNAの検出および定量のための標準的な方法としては、標識化STEAPリボプローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーション、STEAPポリヌクレオチドプローブを使用するノーザンブロットおよび関連技術、STEAPに特異的なプライマーを使用するRT-PCR分析、および他の増幅型の検出方法（例えば、分枝（branched）DNA、SISBA、TMAなどのような）が挙げられる。特定の実施形態では、半定量的RT-PCRを使用して、以下に続く実施例に記載のように、STEAP mRNAの発現を検出および定量し得る。STEAPを増幅し得るかなり多数のプライマー（本明細書中に具体的に記載された種々のプライマーセットを含むが、これらに限定されない）が、この目的のために使用され得る。タンパク質の検出および定量のための標準的な方法が、この目的のために使用され得る。特定の実施形態では、野生型STEAPタンパク質と特異的に反応するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が、生検組織の免疫組織化学的アッセイにおいて使用され得る。STEAPタンパク質に対して指向された抗体をまた用いて、蛍光細胞分析分離（FACS）および/またはELISAのような従来技術を使用して、患者標本（例えば、血液、尿、精液、または他のサンプル）中のSTEAPを検出し得る。

【0109】

（STEAPと相互作用する分子の同定）

本明細書中に開示されたSTEAPタンパク質配列は、当業者が、当該分野で認められた種々のプロトコルのいずれかを介して、STEAPおよびSTEAPによって活性化される経路と相互作用するタンパク質、低分子、および他の因子を同定することを可能にする。例えば、種々のいわゆる相互作用捕捉系（「ツーハイブリッドアッセイ」ともいわれる）の1つが利用され得る。このような系では、相互作用する分子が、転写因子を再構築し、そしてレポーター遺伝子の発現を指示し、次いで、この発現をアッセイする。代表的な系は、真核生物の転写活性化因子の再構築を通して、インビボでタンパク質-タンパク質相互作用を同定する。これらは、例えば、米国特許第5,955,280号、同第5,925,523号、同第5,846,722号、および同第6,004,746号に開示される。

【0110】

あるいは、ペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって、STEAPタンパク質配列と相互作用する分子を同定し得る。このような方法では、選択されたレセプター分子（例えば、STEAP）に結合するペプチドが、無作為のアミノ酸集合または制御されたアミノ酸集合をコードするライブラリーをスクリーニングすることによって同定される。ライブラリーによってコードされるペプチドは、バクテリオファージコートタンパク質の融合タンパク質として発現され、次いで、このバクテリオファージ粒子は、目的のレセプターに対してスクリーニングされる。広範な種々の用途（例えば、治療用試薬または診断用試薬）を有するペプチドが、このようにして、予期されるリガンドまたはレセプター分子の構造に関する先行情報が全くなくとも同定され得る。STEAPタンパク質配列と相互作用する分子を同定するために使用され得る代表的なペプチドライブラリーおよびスクリーニング方法は、例えば、米国特許第5,723,286号および同第5,733,731号に開示されている。

【0111】

あるいは、STEAPを発現する細胞株を使用して、STEAPによって媒介されるタンパク質-タンパク質相互作用を同定し得る。この可能性は、他者ら（Hamilton BJら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999、261:646-51）によって示されたような免疫沈降技術を使用して試験され得る。代表的に、STEAPタンパク質は、抗STEAP抗体を使用して、STEAPを発現する前立腺癌細胞株から免疫沈降され得る。あるいは、His-タグに対する抗体が、STEAP（上述のベクター）を発現するように操作された細胞株において使用され得る。免疫沈降さ

れた複合体は、ウェスタンブロッティング、タンパク質の³⁵S - メチオニン標識化、タンパク質の微小配列決定、銀染色、および二次元ゲル電気泳動のような手順によって、タンパク質の結合に関して試験され得る。

【0112】

STEAPと相互作用する低分子が、このようなスクリーニングアッセイの関連の実施形態を通して同定され得る。例えば、STEAP機能を阻害する低分子（STEAPが、細胞に結合する能力ならびに／または腫瘍の形成、進行、移動、および／もしくはアポトーシスを調節する能力を阻害する分子を含む）が、同定され得る。代表的な方法は、例えば、米国特許第5,928,868号において考察されており、そして少なくとも1つのリガンドが低分子であるハイブリッドリガンドを形成するための方法が含まれる。例示的な実施形態では、ハイブリッドリガンドが細胞中に導入される（次いで、この細胞は、第一発現ベクターおよび第二発現ベクターを含む）。各発現ベクターは、転写モジュールについてのコード配列に連結された標的タンパク質をコードするハイブリッドタンパク質を発現するためのDNAを含む。この細胞はさらに、レポーター遺伝子を含み、このレポーター遺伝子の発現は、第一ハイブリッドタンパク質と第二ハイブリッドタンパク質の互いに対して近位に条件付けられ、両方のハイブリッドタンパク質上の標的部位にハイブリッドリガンドが結合する場合にのみ生じる事象である。レポーター遺伝子を発現するこれらの細胞を選択し、そして未知の低分子または未知のハイブリッドタンパク質を同定する。

10

【0113】

本発明の代表的な実施形態は、図11A～Bに示されるSTEAPアミノ酸配列と相互作用する分子についてスクリーニングする方法から構成され、これは以下の工程を包含する：分子集団とSTEAPアミノ酸配列とを接触させる工程、分子集団とSTEAPアミノ酸配列とを、相互作用を容易にする条件下で相互作用させる工程、STEAPアミノ酸配列と相互作用する分子の存在を決定する工程、次いで、STEAPアミノ酸配列と実際に相互作用する分子から、STEAPアミノ酸配列と相互作用しない分子を分離する工程。特定の実施形態では、この方法はさらに、STEAPアミノ酸配列と相互作用する分子を精製する工程を包含する。好ましい実施形態では、STEAPアミノ酸配列を、ペプチドのライブラリーと接触させる。STEAP機能を調節する分子を同定するためのさらなるアッセイを、以下に続く実施例に記載する。

20

【0114】

本発明はさらに、STEAPまたはSTEAP関連経路の活性化を調節する分子についてスクリーニングする方法を提供する。この方法は、STEAPタンパク質を発現する細胞と分子を接触させる工程、およびSTEAPまたはSTEAP関連経路の活性化を決定する工程を包含する。この決定する工程は、以下に続く実施例に記載のリン酸化アッセイの1つの使用（例えば、リン酸化されたシグナル伝達分子に対する抗体を用いるウェスタンブロッティング）を介し得る。シグナル伝達分子のリン酸化の改変は、STEAPまたはSTEAP関連経路の活性化を調節する候補分子を示す。

30

【0115】

（治療的方法および組成物）

前立腺癌タンパク質としてのSTEAPの同定は、前立腺癌およびSTEAPに関連した他の癌の処置に対する多数の治療的アプローチへの道を開いた。上記のように、STEAPは、膜貫通タンパク質であり、そして他の細胞および分子とのその相互作用は、前立腺環境の調節、ならびに癌の開始、発達、および／または進行において役割を果たす可能性がある。STEAPは、STEAPタンパク質の活性化を阻害する目的、他の細胞および分子とのSTEAPタンパク質の結合または会合を阻害する目的、STEAPの転写または翻訳を阻害する目的、および／またはSTEAPに基づく癌ワクチンの使用の目的のアプローチを介した治療のために標的化され得る。従って、治療的戦略が、この分子の機能を阻害するようにか、またはSTEAP分子自体を標的化するように設計され得る。

40

【0116】

50

STEAPの発現プロファイルは、黒色腫および他の癌においてアップレギュレートされる組織特異的遺伝子であるMAGE、PSA、およびPMSAと類似する(Van den EyndeおよびBoon、Int J Clin Lab Res. 27: 81-86、1997)。その組織特異的発現および癌における高い発現レベルに起因して、これらの分子は現在、癌ワクチンについての標的として研究されている(Durrant、Anticancer Drugs 8: 727-733、1997; Reynoldsら、Int J Cancer 72: 972-976、1997)。STEAPの発現パターンは、その発現が、大半の正常組織において検出されないため、前立腺癌に対する癌ワクチンアプローチについての理想的標的である可能性が高いという証拠を与える。

【0117】

従って、STEAPの特定のモチーフを標的化する治療的アプローチ、またはSTEAPタンパク質の活性化を阻害する目的の治療的アプローチは、前立腺癌およびSTEAPを発現する他の癌を罹患している患者に有用であることが予期される。STEAPタンパク質の活性化を阻害する目的の治療的アプローチは、一般的に、2つのクラスに分類される。1つのクラスは、STEAPタンパク質と、その結合パートナーまたは他のタンパク質との結合または会合を阻害する種々の方法を含む。別のクラスは、STEAP遺伝子の転写またはSTEAP mRNAの翻訳を阻害する種々の方法を含む。

【0118】

(抗体に基づく治療についての標的としてのSTEAP)

癌(前立腺癌を含む)におけるSTEAPの細胞表面性質および発現プロファイルは、それらが、前立腺癌およびSTEAPを発現する他の癌の抗体治療についての有望な標的であることを示す。本明細書中の実施例に記載の実験結果は、STEAP-1およびSTEAP-2が、強力に、前立腺細胞および前立腺癌細胞内の腺上皮細胞の表面上で均一して発現されるという強い証拠を提供する。特に、免疫組織化学的分析の結果は、ヒト前立腺上皮細胞(正常および癌)の表面が、STEAP-1で均一にコーティングされているようであることを示す。生化学的分析によって、STEAP-1の細胞表面局在性が確認されている。これらは、当初、その推定6-膜貫通一次構造エレメントまたは細胞周囲染色(免疫組織化学的染色によって明白)によって示唆された。

【0119】

STEAP-1およびSTEAP-2は、前立腺癌上皮(細胞外STEAPエピトープを標的化する免疫療法介入ストラテジーについて理想的な位置)の表面にわたって高レベルで均一に発現される。STEAP免疫反応性組成物の全身投与は、STEAP細胞外エピトープへの結合を介して前立腺上皮細胞とその組成物の広範な接触を生じると予期される。さらに、正常なヒト組織ではSTEAP-1タンパク質発現がほとんど存在しないことを考慮すると、非標的器官および組織におけるSTEAP-1への免疫療法組成物の結合によって引き起こされる、毒性、非特異性および/または非標的効果を有さない精巧な感受性を予期させる豊富な理由が存在する。

【0120】

前立腺細胞および前立腺癌細胞におけるSTEAP-1の高レベル発現に加えて、STEAP-1は、ヒトの種々の他の癌(膀胱癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌、および卵巣癌を含む)において実質的に過剰発現されるようである。特に、高レベルのSTEAP-1 mRNA発現が、試験されたすべての前立腺癌組織および細胞株、ならびに試験された大半の膵臓癌、結腸癌、および膀胱癌の細胞株において検出されている。高レベルのSTEAP-1発現はまた、いくつかの卵巣癌細胞株において観察されている。低レベルの発現が、いくつかの乳癌、精巣癌、および子宮頸癌の細胞株において観察されている。非常に高レベルの発現はまた、ユーイング肉腫細胞株において検出されている。出願人は、細胞表面のSTEAP-1タンパク質が、膀胱癌、肺癌、および結腸癌において発現されるが、正常な結腸においては検出可能な細胞表面(または細胞内)STEAP-1タンパク質が存在せず、そして正常な膀胱では低い発現であることを示した。STEAP-1の細胞外ドメインと特異的に反応する抗体は、毒素もしくは治療剤の結合体としてか、または細胞の

10

20

30

40

50

増殖もしくは機能を阻害し得る裸の抗体としてのいずれかとして、全身的にこれらの癌を処置するために有用であり得る。

【0121】

STEAP-2タンパク質もまた、前立腺癌、ならびに他の癌（結腸癌および肺癌を含む）においてまた発現される。RT-PCRおよびノーザンブロットによるSTEAP-2 mRNA分析によって、この発現が、正常な組織における前立腺に限定され、そしてまたいくつかの前立腺癌、膵臓癌、結腸癌、精巣癌、卵巣癌、および他の癌において発現されることが示された。従って、STEAP-2と反応性の抗体は、前立腺癌および他の癌の処置において有用であり得る。同様に、STEAP-3およびSTEAP-4（ならびに、他のSTEAP）の発現は、いくつかの癌と関連付けられ得る。従って、これらのSTEAPファミリーメンバータンパク質と反応性の抗体もまた、治療的に有用であり得る。

10

【0122】

STEAP抗体は、この抗体が癌細胞上のSTEAPに結合し、そして細胞および腫瘍の破壊を媒介し、細胞または腫瘍の増殖を阻害し、および/または循環している微小転移巣および/または確立された転移における原発性腫瘍のSTEAP機能を排除するように、患者に導入され得る。腫瘍の血管新生の程度は、指針（これに基づいて、送達アプローチが推奨される）を提供し得る。同様に、疾患の悪性度分類および/または病期は、これに関する有用な情報を提供することが予期される。例えば、より悪性度分類の高いより進行した腫瘍は、転移を誘く可能性がより高い可能性があり、これは転移の発生を処置または予防するための全身投与を示唆する。このような抗体が治療的效果を発揮する機構は、以下を含み得る：補体媒介性細胞溶解、抗体依存性の細胞傷害性、STEAPの生理的機能の調節、リガンド結合またはシグナル伝達経路の阻害、腫瘍細胞分化の調節、腫瘍新脈管形成因子プロファイルの改変、および/またはアポトーシスの誘導。毒性剤または治療剤に結合体化されたSTEAP抗体はまた、STEAP保有腫瘍細胞に直接的に毒性剤または治療剤を送達するために治療的に使用され得る。

20

【0123】

抗STEAP抗体を使用する癌免疫療法は、他の癌の型（結腸癌（Arllen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（Shepardら、1991、J. Clin. Immunol. 11:117-127）が挙げられるが、これらに限定されない）の処置において首尾良く使用された種々のアプローチによって生み出された教示に従い得る。いくつかの治療的アプローチは、毒素への裸の抗体の結合体化（例えば、抗CD20抗体への¹³¹Iの結合体化（例えば、Bexxar、Coulter Pharmaceutical））を含むが、他の治療的アプローチは、抗体と他の治療剤（例えば、パクリタキセルとのHerceptinTM（トラツマブ（trastuzumab））（Genentech, Inc.））との同時投与を包含する。前立腺癌の処置について、例えば、STEAP抗体は、照射、化学療法、またはホルモン除去（ablation）と組み合わせて投与され得る。

30

40

【0124】

STEAP抗体療法は、すべての病期の癌に有用であり得るが、抗体療法は、特に、進行した癌または転移した癌において適切であり得る。本発明の抗体療法を用いる処置は、前に1以上の化学療法を受けた患者に指示され得るが、化学療法または照射レジメンと本

50

発明の抗体療法を組み合わせることは、化学療法による処置を受けていない患者に好適であり得る。さらに、抗体療法は、特に、化学療法剤の毒性に対してあまり耐性ではなかった患者に対する、同時化学療法の減少した投薬量の使用を可能にし得る。

【0125】

いくつかの癌患者については、好ましくは、腫瘍組織の免疫組織化学的な評価、定量的なS T E A P画像化、またはS T E A Pの発現の存在および程度を確実に示し得る他の技術を使用して、S T E A Pの発現の存在およびその発現のレベルを評価することが所望され得る。腫瘍の生検または外科的な標本の免疫組織化学的な分析が、この目的のために好ましくあり得る。腫瘍組織の免疫組織化学的分析のための方法は、当該分野で周知である。

【0126】

前立腺および他の癌を処置するにおいて有用である抗S T E A Pモノクローナル抗体として、腫瘍に対する強力な免疫応答を開始し得るもの、および直接細胞傷害性であり得るものが挙げられる。これに関して、抗-S T E A Pモノクローナル抗体(m A b)は、補体によって媒介される細胞の細胞傷害性または抗体依存性の細胞の細胞傷害性(A D C C)の機構(これらの両方ともが、エフェクター細胞のF cレセプター部位または補体タンパク質との相互作用のために、免疫グロブリン分子のインタクトなF c部分を必要とする)のいずれかによって、腫瘍細胞の溶解を誘発し得る。さらに、腫瘍の増殖に対して直接的な生物学的効果を発揮する抗S T E A P m A bが、本発明の実施において有用である。このような直接的な細胞傷害性のm A bが作用し得る可能性のある機構として、細胞の増殖の阻害、細胞の分化の調節、腫瘍の血管形成因子のプロフィルの調節、およびアポトーシスの誘導が挙げられる。特定の抗-S T E A P m A bが抗腫瘍効果を発揮する機構は、A D C C、A D M M C、補体によって媒介される細胞の溶解などを決定するように設計されたかなり多数のインビトロでのアッセイを使用して、当該分野で一般的に公知であるように評価され得る。

【0127】

特定の抗S T E A P m A bまたは抗S T E A P m A bの組み合わせの抗腫瘍活性は、適切な動物モデルを使用してインビボで評価され得る。例えば、異種(xenogenic)前立腺癌モデル(ここでは、ヒト前立腺癌外植片または継代異種移植片組織が、免疫無防備状態の動物(例えば、ヌードマウスまたはS C I Dマウス)に導入されている)が、前立腺癌に関連して適切であり、そして米国特許第6,107,540号;Kleinsら、1997、Nature Medicine 3:402-408に記載されている。例えば、PCT特許出願W O 98/16628(Sawyersら、1998年4月23日付公開)は、原発性腫瘍、微小転移巣、および後期疾患に特徴的な骨芽細胞転移の形成の発生を反復し得るヒト前立腺癌の種々の異種移植片モデルを記載している。効力は、腫瘍形成、腫瘍の回帰または転移などの阻害を測定するアッセイを使用して予測され得る。

【0128】

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

【0129】

本発明の治療法は、単一の抗S T E A P m A b抗体の投与、ならびに異なるm A b抗体の組み合わせまたはカクテルの投与を意図する。このようなm A bカクテルは、それらが、異なるエピトープを標的とするm A bを含むか、異なるエフェクター機構を使用するか、または免疫エフェクター機能性に依存するm A bと直接細胞傷害性m A bを組み合わせ

10

20

30

40

50

るのと同じ程度だけ、特定の利点を有し得る。組み合わせたこのような m A b は、相乗的治療効果を示し得る。さらに、抗 S T E A P m A b の投与は、種々の化学療法薬剤、アンドロゲン遮断薬、および免疫モジュレーター（例えば、I L - 2、G M - C S F）を含むがこれらに限定されない、他の治療薬剤と組合せられ得る。抗 S T E A P m A b は、その「裸」の形態または非結合形態で投与され得るし、またはそれらに結合した治療薬剤を有し得る。

【 0 1 3 0 】

本発明の方法の実施において使用された抗 S T E A P モノクローナル抗体は、所望の送達方法に適するキャリアを含む薬学的組成物中に処方され得る。適切なキャリアは、抗 S T E A P m A b と併用された場合に抗体の抗腫瘍性の機能を保持しかつ被験体の免疫系と非反応性である任意の材料を含む。例として、例えば、滅菌リン酸緩衝化生理食塩水、静菌水などといった多数の標準的な薬学的キャリアのいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 1 3 1 】

抗 S T E A P 抗体処方物は、腫瘍部位にその抗体を送達し得る任意の経路を介して投与され得る。投与の潜在的に有効な経路としては、静脈内経路、腹腔内経路、筋肉内経路、腫瘍内経路、皮内経路などが挙げられるが、これらに限定されない。投与の好ましい経路は、静脈内注射によってである。静脈内注射のために好ましい処方物は、保存静菌水の溶液中の抗 S T E A P m A b、滅菌非保存水中の抗 S T E A P m A b および / あるいは I n j e c t i o n (U S P) 用の 0 . 9 % 滅菌塩化ナトリウムを含むポリビニルクロライドバッグまたはポリエチレンバッグ中で希釈された抗 S T E A P m A b を含む。抗 S T E A P m A b 調製物は、凍結乾燥され得、そして滅菌パウダーとして保存され得（好ましくは、真空中で）、次いで、注射の前に、例えば、ペンジルアルコール保存剤を含む静菌水または滅菌水において再構成され得る。

20

【 0 1 3 2 】

処置は一般的に、受容可能な投与経路（例えば、静脈注射（I V））を介する、代表的には約 0 . 1 ~ 約 1 0 m g / k g 体重の範囲の用量での、抗 S T E A P 抗体調製物の反復投与を包含する。1 0 ~ 5 0 0 m g m A b / 週の範囲の用量が、効果的であり得かつ十分に許容され得る。転移性乳癌の処置において H e r c e p t i n m A b を用いる臨床実験に基づいて、初回負荷量約 4 m g / k g 患者の体重の I V に続いての、毎週の用量約 2 m g / k g の抗 S T E A P m A b 調製物の I V が、受容可能な投薬レジメンを示し得る。好ましくは、この初回負荷量が、9 0 分以上注入として投与される。周期的維持用量は、3 0 分以上の注入として投与され得るが、ただし、その初回量が十分に許容された場合に限る。しかし、当業者が理解するように、種々の因子が、特定の場合における初回量レジメンに影響する。このような因子としては、例えば、使用される抗体（A b）またはモノクローナル抗体（m A b）の結合親和性および半減期、患者における S T E A P 発現の程度、循環し落ちた（s h e d）S T E A P 抗原の程度、所望される安定状態の抗体濃度レベル、処置の頻度、ならびに本発明の処置方法と組み合わせて使用される化学療法薬剤の影響が、挙げられ得る。

30

【 0 1 3 3 】

最適には、患者は、最も有効な投薬レジメンおよび関連因子の決定を補助するために、血清中の循環する落ちた S T E A P 抗原のレベルについて評価されるべきである。このような評価はまた、治療を通じモニターする目的のために使用され得、そして他のパラメーター（例えば、前立腺癌治療における血清 P S A レベル）を評価することと組み合わせて、治療の成功を判断するために有用であり得る。

40

【 0 1 3 4 】

（ S T E A P タンパク質機能の阻害 ）

本発明は、その結合パートナーまたはリガンドへの S T E A P の結合あるいは他のタンパク質との S T E A P の会合を阻害するための、種々の方法および組成物、ならびに S T E A P 機能を阻害するための方法を包含する。

50

【 0 1 3 5 】

(組換えタンパク質を用いる S T E A P の障害)

1つのアプローチにおいて、S T E A Pへの結合が可能で、その結果、S T E A Pの結合パートナー(単数または複数)またはS T E A Pの関連する他のタンパク質(単数または複数)への、S T E A Pの接近/結合の防止が可能である組換え分子は、S T E A P機能の障害に使用される。例えば、そのような組換え分子は、S T E A P特異的な抗体分子の反応性部分(単数または複数)を含む。特定の実施形態において、S T E A P結合パートナーのS T E A P結合ドメインは、ヒトI g G(例えば、ヒトI g G 1)のF c部分に連結される2つのS T E A Pリガンド結合ドメインを含む、二量体融合タンパク質の中に設計され得る。そのようなI g G部分は、C_H1ドメインではなく、例えば、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインならびにヒンジ領域を含み得る。そのような二量体融合タンパク質は、可溶性形態で、S T E A Pの発現に関連する癌(前立腺癌に限定されない)を患う患者に投与され得る。ここで、二量体融合タンパク質は、特異的にS T E A Pに結合し、その結果、結合パートナーおよび/または調節S T E A P機能とのS T E A P相互作用をブロックする。このような二量体融合タンパク質は、さらに、公知の抗体関連性技術を使用する多量体タンパク質に併用され得る。

10

【 0 1 3 6 】

(細胞内抗体を用いる S T E A P の障害)

別のアプローチにおいて、S T E A Pに特異的に結合する単鎖抗体をコードする組換えベクターが、S T E A Pを発現する細胞中へと遺伝子移入技術を介して導入され得、その遺伝子移入技術において、そのコードされる単鎖抗S T E A P抗体が細胞内発現され、S T E A Pタンパク質に結合し、そしてそれによりS T E A Pタンパク質の機能を障害する。このような細胞内単鎖抗体を操作するための方法は、周知である。このような細胞内抗体(「内部抗体(intrabody)」としても公知)は、その細胞内の特定の区画に特異的に標的化され得、その処置の障害活性が焦点を合わせる制御を提供する。この技術は、当該分野で首尾良く適用されている(概説として、RichardsonおよびMarasco、1995、T I B T E C H、第13巻を参照のこと)。内部抗体は、他に豊富な細胞表面レセプターの発現を事実上除去することが示されている。例えば、Richardsonら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137~3141; Beerliら、1994、J. Biol. Chem. 289:23931~23936; Deshaneら、1994、Gene Ther. 1:332~337を参照のこと。

20

30

【 0 1 3 7 】

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

40

【 0 1 3 8 】

1つの実施形態では、S T E A P内部抗体は、特定のS T E A Pドメインに特異的に結合するように設計される。例えば、S T E A Pタンパク質に特異的に結合する細胞質ゾル内部抗体は、S T E A Pが核へアクセスすることを防ぎ、それによりS T E A Pが核内で任

50

意の生物学的活性を及ぼすのを防ぐ（例えば、STEAPが他の因子と転写複合体を形成するのを防ぐ）ために使用され得る。

【0139】

このような内部抗体の発現を特定の腫瘍細胞に特異的に向けるために、その内部抗体の転写が、適切な腫瘍特異的プロモーターおよび/またはエンハンサーの調節制御下に配置され得る。前立腺に特異的に内部抗体発現を標的化するために、例えば、PSAプロモーターおよび/またはプロモーター/エンハンサーが、利用され得る（例えば、米国特許第5,919,652号を参照のこと）。

【0140】

（STEAPの転写または翻訳の阻害）

別の種類の治療アプローチにおいて、本発明は、STEAP遺伝子の転写を阻害するための、種々の方法および組成物を提供する。同様に、本発明はまた、STEAP mRNAからタンパク質への翻訳を阻害するための、方法および組成物も提供する。

【0141】

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

【0142】

STEAP転写活性化を妨害することを介してSTEAPの転写を阻害する他の因子もまた、STEAPを発現する癌の処置に有用であり得る。同様に、STEAPのプロセッシングを妨害し得る因子は、STEAPを発現する癌の処置に有用であり得る。このような因子を利用する癌の処置方法もまた、本発明の範囲内にある。

【0143】

（治療ストラテジーについての一般的な考慮）

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

【0144】

上記の治療アプローチは、広範な種々の化学療法または放射線療法のレジメンのいずれか1つと組み合わせられ得る。これらの治療アプローチはまた、特に、化学療法剤の毒性に十分に寛容ではない患者において、化学療法の投薬量の減少、および/またはより頻度の少ない投与の使用を可能にし得る。

【0145】

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

10

20

30

40

50

。

【0146】

インビボでは、STEAP治療用組成物の効果は、適切な動物モデルにおいて評価され得る。例えば、外因性前立腺癌モデル（ここで、ヒト前立腺癌外植片または継代された異種移植組織が、免疫無防備動物（例えば、ヌードマウスまたはSCIDマウス）に導入される）は、前立腺癌に関して適切であり、そして記載されている（Kleinら、1997, Nature Medicine 3: 402~408）。例えば、PCT特許出願WO98/16628, Sawyersら（1998年4月23日公開）は、原発性腫瘍の発生、微小転移、および後期段階疾患の特徴である骨芽細胞性転移の形成を要約し得る、ヒト前立腺癌の種々の異種移植モデルを記載している。効力は、腫瘍形成、腫瘍後退または転移などの阻害を測定するアッセイを使用して推定され得る。以下の実施例もまた参照のこと。

10

【0147】

アポトーシスの促進を和らげる（qualify）インビボアッセイもまた、潜在的な治療用組成物の評価において有用であり得る。1つの実施形態において、治療用組成物で処置された保有マウス由来の異種移植片は、アポトーシス病巣の存在について試験され得、そして未処置のコントロール異種移植片保有マウスに比較され得る。アポトーシス病巣が処置マウスの腫瘍に見出される程度は、この組成物の治療効力の指標を提供する。

【0148】

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

20

【0149】

治療用処方物は、可溶化され得、そして腫瘍部位に治療用組成物を送達させ得る任意の経路を通じて投与され得る。潜在的に効果的な投与経路としては、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内、器官内、眼内などが挙げられるがこれらに限定されない。静脈内注射に好ましい処方物は、保存された静菌水、滅菌非保存水の溶液における治療用組成物を含み、そして/または注射用0.9%滅菌塩化ナトリウム（USP）を含むポリビニルクロリドまたはポリエチレンバッグに希釈される。治療用タンパク質調製物は、凍結乾燥され得、そして滅菌粉末として、好ましくは減圧下で貯蔵され得、次いで注射する前に、例えば、ベンジルアルコール保存剤を含む静菌水中に、または滅菌水中に再構成され得る。

30

【0150】

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

40

【0151】

(癌ワクチン)

本発明はさらに、STEAPタンパク質またはそのフラグメントを含む癌ワクチン、およびDNAベースのワクチンを提供する。STEAPの腫瘍により制限される発現を考慮すると、STEAP癌ワクチンは、非標的組織に対して非特異的効果を生成することなく、STEAPを発現している癌の特異的な予防および/または処置に効果的であることが予期される。抗癌療法での使用について、液性免疫および細胞媒介性免疫を生成するワクチンにおける腫瘍抗原の使用は、当該分野で周知であり、そしてヒトPSMAおよびげっ歯類PAP免疫原を使用して、前立腺癌に使用されている（Hodgeら、1995, In

50

t . J . Cancer 63 : 231 ~ 237 ; Fongら、1997、J . Immunol . 159 : 3113 ~ 3117)。このような方法は、STEAPタンパク質もしくはそのフラグメント、またはSTEAPをコードする核酸分子、およびSTEAP免疫原を発現し、かつ適切に提示し得る組換えベクターを用いることによって容易に実施され得る。

【0152】

例えば、ウイルス遺伝子送達系は、STEAPをコードする核酸分子を送達するために用いられ得る。本発明のこの局面の実施において使用され得る種々のウイルス遺伝子送達系は、以下を包含するが、これらに限定されない：ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、およびシンドビスウイルス (Restifo、1996、Curr . Opin . Immunol . 8 : 658 - 663)。非ウイルス送達系もまた、抗腫瘍応答を誘導するために患者に導入される (例えば筋内で)、STEAP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を用いることにより用いられ得る。1つの実施形態では、全長ヒトSTEAP cDNAが用いられ得る。

【0153】

1つの実施形態では、STEAP癌ワクチンは、図11A~Bに示されるSTEAPアミノ酸配列内の免疫原性ペプチドの同一性に基づく。以下の実施例でさらに議論するように、STEAPは、T細胞またはB細胞の応答を増加させることが示されている。従って、STEAPのこれらの特定の部分およびこれらの部分をコードするポリヌクレオチドは、癌ワクチンの生成のために選択され得る。STEAPタンパク質のこのような部分の1例は、図1A~Bに示されるようなSTEAP - 1アミノ酸配列のアミノ酸残基14から28 (WKMKPRRNLEEDDYL ; 配列番号22) である。

【0154】

別の実施形態では、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STEAP核酸分子が用いられ得る。CTLエピトープは、特定化されたHLA対立遺伝子に最適に結合し得る、STEAPタンパク質内のペプチドを同定するための特定のアルゴリズム (例えば、Epimer、Brown University) を用いて決定され得る。1つの適切なアルゴリズムは、Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) ウェブサイト (<http://bimas.dcr.t.nih.gov/>) において利用可能であるHLA Peptide Motif Searchアルゴリズムである。このアルゴリズムは、HLAクラスI分子そして具体的にはHLA - A2の溝における特定のペプチド配列の結合に基づく (Flakら、1991、Nature 351 : 290 - 6 ; Huntら、1992、Science 255 : 1261 - 3 ; Parkerら、1992、J . Immunol . 149 : 3580 - 7 ; Parkerら、1994、J . Immunol . 152 : 163 - 75)。HLA Peptide Motif Searchアルゴリズムは、HLA - A2および他のクラスI分子への推定される結合について、完全タンパク質配列からの8マー、9マーおよび10マーのペプチドの配置および順位を可能にする。ほとんどのHLA - A2結合ペプチドは、9マーであり、好適には、2位でロイシンを含み、そして9位でバリンまたはロイシンを含む (Parkerら、1992、J . Immunol . 149 : 3580 - 7)。HLA - A2へのペプチドの実際の結合は、抗原プロセッシング欠損細胞株T2上のHLA - A2発現の安定化により評価され得る (Xueら、1997、Prostate 30 : 73 - 8 ; Peshwaら、1998、Prostate 36 : 129 - 38)。特定のペプチドの免疫現性は、樹状細胞の存在下でのCD8 + CTLの刺激によりインビトロで評価され得る (Xueら ; Peshwaら、前出)。

【0155】

特定のSTEAPペプチドは、HLA - A2への結合が推定され、そして癌ワクチンにおける使用に好ましいSTEAP - 1のアミノ酸165 ~ 173、STEAP - 1のアミノ

10

20

30

40

50

酸 86 ~ 94、STEAP-1 のアミノ酸 262 ~ 270、STEAP-1 のアミノ酸 302 ~ 310、STEAP-1 のアミノ酸 158 ~ 166、STEAP-2 のアミノ酸 227 ~ 235、STEAP-2 のアミノ酸 402 ~ 410、STEAP-2 のアミノ酸 307 ~ 315、STEAP-2 のアミノ酸 306 ~ 314、および STEAP-2 のアミノ酸 100 ~ 108 に対応するペプチドを含む。

【0156】

種々のエキソビボストラテジーが、用いられ得る。1つのアプローチは、患者の免疫系に STEAP 抗原を呈示するための樹状細胞の使用を包含する。樹状細胞は、MHC クラス I および II、B7 副刺激因子 (co-stimulator)、および IL-12 を発現し、そして従って高度に特化された抗原提示細胞である。前立腺癌では、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) のペプチドでパルスされた自己樹状細胞が、第 I 相臨床試験において、前立腺癌患者の免疫系を刺激するために使用されている (Tjoeら、1996、Prostate 28:65-69; Murphyら、1996、Prostate 29:371-380)。樹状細胞は、MHC クラス I 分子およびクラス II 分子の関連において T 細胞に対して STEAP ペプチドを提示するために使用され得る。1つの実施形態では、自己樹状細胞は、MHC 分子に結合し得る STEAP ペプチドでパルスされる。別の実施形態では、樹状細胞は、完全 STEAP タンパク質でパルスされる。さらに別の実施形態は、当該分野で公知の種々の実行ベクター (例えば、アデノウイルス (Arthurら、1997、Cancer Gene Ther. 4:17-25)、レトロウイルス (Hendersonら、1996、Cancer Res. 56:3763-3770)、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、DNA トランスフェクション (Ribasら、1997、Cancer Res. 57:2865-2869)、および腫瘍由来 RNA トランスフェクション (Ashleyら、1997、J. Exp. Med. 186:1177-1182)) を用いて樹状細胞における STEAP 遺伝子の過剰発現を操作することを含む。STEAP を発現する細胞は、免疫調節因子 (例えば、GM-CSF) を発現するように操作され得、そして免疫剤として使用され得る。

【0157】

抗イディオタイプ抗 STEAP 抗体もまた、抗癌療法において、STEAP タンパク質を発現する細胞に対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして使用され得る。詳細には、抗イディオタイプ抗体の生成は、当該分野で周知であり、そして STEAP 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 STEAP 抗体を生成するように容易に適合され得る (例えば、Wagnerら、1997、Hybridoma 16:33-40; Foonら、1995、J Clin Invest 96:334-342; Herlynら、1996、Cancer Immunol Immunother 43:65-76 を参照のこと)。このような抗イディオタイプ抗体は、癌ワクチンストラテジーにおいて使用され得る。

【0158】

遺伝子免疫法は、STEAP を発現する癌細胞に対する予防的または治療的な体液性免疫応答および細胞性免疫応答を生成するために使用され得る。STEAP タンパク質 / 免疫原をコードする DNA および適切な調節配列を含む構築物は、個体の筋肉または皮膚に直接的に注射され得、それにより、筋肉または皮膚の細胞が、この構築物を取り込み、そしてコードされた STEAP タンパク質 / 免疫原を発現する。STEAP タンパク質免疫原の発現は、前立腺癌および STEAP 発癌性癌に対する予防的または治療的な体液性免疫および細胞性免疫の生成を生じる。当該分野で公知の種々の予防的および治療的遺伝子免疫技術が使用され得る (検討のために、インターネットアドレス www.genweb.com で公開されている情報および参考文献を参照のこと)。

【0159】

(診断組成物およびキット)

上記で記載または示唆された診断適用および治療適用における使用のために、本発明によって、キットもまた提供される。このようなキットは、1つ以上のコンテナ手段 (例えば

、バイアル、チューブなど)を厳重に閉じ込めて受容するように区画化されるキャリア手段を備え得る。コンテナ手段のそれぞれは、本方法において、使用されるべき別々の要素の1つを含む。例えば、コンテナ手段の1つは、検出可能に標識された、または検出可能に標識され得るプローブを含み得る。このようなプローブは、それぞれSTEAPタンパク質もしくはSTEAP遺伝子またはメッセージに特異的な抗体またはポリヌクレオチドであり得る。キットが、標的核酸配列を検出するために核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合、キットはまた、標的核酸配列の増幅用のヌクレオチドを含むコンテナ、および/またはレポーター分子(例えば、酵素標識、蛍光標識、または放射性同位体標識)に結合されるレポーター手段(例えば、ビオチン結合タンパク質(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)を含むコンテナを有し得る。

10

【0160】

本発明のキットは、代表的には、上記コンテナ、および使用説明書と共に、市販および使用者の観点で所望の材料(緩衝液、希釈剤、フィルター、ニードル、シリンジ、およびパッケージ挿入物を含む)を含む1つ以上の他のコンテナを含む。表示は、組成物が、特定の治療または非治療適用について使用されることを示し、そしてまたインビボまたはインビトロのいずれかの使用(例えば、上記の使用)についての説明を示し得るために、コンテナ上に存在し得る。

【0161】

STEAP cDNAは、ブダペスト条約の下でアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC; 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 USA)に、プラスミドp58P1D12-2として1999年3月10日に寄託され、そしてATCC受託番号207152で承認されている。

20

【0162】

従って、本発明はまた、STEAP関連分子を含む診断組成物を提供する。このような分子は、本明細書中に記載の種々のSTEAPポリヌクレオチド、プライマー、プローブ、タンパク質、フラグメント、抗体を含む。診断組成物に含まれる分子は、必要に応じて、検出可能なマーカーで標識化され得る。STEAP診断組成物は、さらに、適切な緩衝液、希釈剤および所望される場合、他の成分を含み得る。

【0163】

(実施例)

本発明の種々の局面を、以下に続くいくつかの例によってさらに記載および例示する。これらはいずれも、本発明の範囲の制限を意図するものではない。

30

【0164】

(実施例1: STEAP遺伝子のcDNAフラグメントのSSH生成単離)

(材料および方法)

(LAPC異種移植片)

LAPC異種移植片を、Charles Sawyers博士(UCLA)から入手し、記載のように生成した(Kleinら、1997、Nature Med. 3: 402-408; Craftら、1999、Cancer Res. 59: 5030-5036)。アンドロゲン依存性LAPC-4異種移植片およびアンドロゲン非依存性LAPC-4異種移植片(それぞれLAPC-4 ADおよびAI)ならびにアンドロゲン依存性LAPC-9異種移植片およびアンドロゲン非依存性LAPC-9異種移植片(それぞれLAPC-9 ADおよびAI)をそれぞれインタクトな雄SCIDマウスまたは雄去勢マウスにおいて増殖させ、そしてレシピエント雄に小組織塊として継代させた。LAPC-4 AI異種移植片は、LAPC-4 AD腫瘍から誘導し、LAPC-9 AI異種移植片は、LAPC-9 AD腫瘍から誘導した。AI異種移植片を生成するために、LAPC AD腫瘍を有する雄マウスを去勢し、そして2~3ヶ月間飼育した。LAPC腫瘍が再増殖した後、この腫瘍を採集し、そして去勢雄SCIDマウスにおいてまたは雌SCIDマウスにおいて継代させた。

40

【0165】

50

LAPC-4CD異種移植片は、以下のように脛骨内 (intratibially) で増殖した。皮膚下で増殖したLAPC-4CD異種移植片腫瘍組織を、 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ の切片に細かく切断し、この組織を、 $1 \times \text{Iscoves}$ 培地に浸した。次いで、切り刻んだ組織を、 1.3 K rpm で4分間遠心分離し、この上清を、 10 ml の氷冷 $1 \times \text{Iscoves}$ 培地中に再懸濁し、そして 1.3 K rpm で、4分間遠心分離した。次いで、このペレットを、 1% プロナーゼEを含む $1 \times \text{Iscoves}$ 中に再懸濁し、そして穏やかなゆれ攪拌 (rocking agitation) をしながら、室温で20分間インキュベートした後に2～4分間の氷上でインキュベートした。濾液を、 1.3 K rpm で4分間遠心分離し、そしてプロナーゼを、 10 ml の Iscoves 中での再懸濁および再遠心分離によって吸引されたペレットから除去した。次いで、細胞の凝集塊を、 PrEGM 培地にプレートし、そして一晩増殖させた。次いで、この細胞を収集し、濾過し、 $2 \times \text{RPMI}$ で洗浄し、そしてカウントした。約50,000個の細胞を、氷上で、当量の氷冷 Matrigel と混合し、そして27ゲージの針を介してSCIDマウスの近位脛骨幹端 (proximal tibial metaphyses) に、外科的に注射した。10～12週間後、骨髄において増殖したLAPC-4腫瘍は、回復した。

【0166】

(細胞株および組織)

ヒト細胞株 (例えば、 HeLa) を、 ATCC から入手し、そして5%ウシ胎児血清を有する DMEM 中で維持した。

【0167】

(RNA単離)

腫瘍組織および細胞株を、 10 ml/g 組織または $10 \text{ ml}/10^8$ 細胞を用いて Trizol 試薬 (Life Technologies 、 Gibco BRL) においてホモジナイズし、総RNAを単離した。ポリA⁺ RNAを、 $\text{Qiagen's Oligotex mRNA Mini}$ キットおよび Midikit を用いて総RNAから精製した。総RNAおよびmRNAを、分光光度計分析 ($\text{O.D. } 260/280 \text{ nm}$) によって定量し、そしてゲル電気泳動によって分析した。

【0168】

(オリゴヌクレオチド)

以下のHPLC精製オリゴヌクレオチドを使用した。

【0169】

DPNCDN (cDNA合成プライマー) :

5' TTTTGTGATCAAGCTT₃₀ 3' (配列番号23)

アダプター1 :

5' CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGG
GCAG3'

3' GGCCCGTCCCTAG5' (配列番号24、25)

アダプター2 :

5' GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGCTCGCGGCCG
AG3'

3' CGGCTCCCTAG5' (配列番号26、27)

PCRプライマー1 :

5' CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (配列番号28) ネスト化
プライマー (NP) 1 :

5' TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGA3' (配列番号29) ネスト化
プライマー (NP) 2 :

5' AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGA3' (配列番号30)。

【0170】

(抑制サブトラクティブ (suppression subtractive) ハイブリダイゼーション)

抑制サブトラクティブハイブリダイゼーション (SSH) を使用して、良性前立腺過形成 (BPH) と比較して、アンドロゲン依存性前立腺癌で上方制御され得る遺伝子に対応する cDNA を同定した。

【0171】

LAPC-4 AD 異種移植片 (テスター) および BPH 組織 (ドライバー) に対応する二本鎖 cDNA を、CLONTECH の PCR-Select cDNA Subtraction Kit およびプライマーとして 1 ng のオリゴヌクレオチド RSACDN を使用して、上記のように、異種移植片および BPH 組織から単離した 2 µg のポリ (A) + RNA から合成した。第一鎖および第二鎖合成を、このキットの使用マニュアルプロトコル (CLONTECH Protocol No. PT1117-1、Catalog No. K1804-1) に記載のように実施した。この得られた cDNA を、RsaI で 37 で 3 時間消化した。消化した cDNA を、フェノール/クロロホルム (1:1) で抽出し、そしてエタノール沈殿した。

10

【0172】

ドライバー cDNA (BPH) を、4:1 比で、RsaI 消化した BPH cDNA とマウス肝臓由来の消化した cDNA とを合わせることによって生成し、マウス遺伝子が、このテスター cDNA (LAPC-4 AD) から差し引かれることを確実にした。

【0173】

テスター cDNA を、5 µl の水中に 1 µl の RsaI 消化した LAPC-4 AD cDNA (400 ng) を希釈することにより生成した。次いで、この希釈した cDNA (2 µl、160 ng) を、400 u の T4 DNA リガーゼ (CLONTECH) を用いて、総容量 10 µl で、16 で一晩、別々の連結反応液中で、2 µl のアダプター 1 およびアダプター 2 (10 µM) に連結した。連結を、1 µl の 0.2 M EDTA で、そして 72 で 5 分間加熱して終結させた。

20

【0174】

第一のハイブリダイゼーションを、1.5 µl (600 ng) のドライバー cDNA を、1.5 µl (20 ng) のアダプター 1 を連結したテスター cDNA およびアダプター 2 を連結したテスター cDNA を含む 2 つの各チューブに添加することにより実施した。4 µl の最終容量で、サンプルに鉱油を重層し、MJ Research サーマルサイクラー中で、98 で 1.5 分間変性し、次いで、68 で 8 時間ハイブリダイズさせた。次いで、この 2 つのハイブリダイゼーションを、さらなる 1 µl の新鮮な変性ドライバー cDNA と一緒に混合し、そして 68 で一晩ハイブリダイズさせた。次いで、この第二のハイブリダイゼーションを、200 µl の 20 mM Hepes、pH 8.3、50 mM NaCl、0.2 mM EDTA 中で希釈し、70 で 7 分間加熱し、そして -20 で貯蔵した。

30

【0175】

(SSH から生成した遺伝子フラグメントの PCR 増幅、クローニング、および配列決定)

SSH 反応から生じる遺伝子フラグメントを増幅するために、2 つの PCR 増幅を行った。第一の PCR 反応において、1 µl の希釈した最終ハイブリダイゼーション混合物を、最終容量 25 µl 中の 1 µl の PCR プライマー 1 (10 µM)、0.5 µl dNTP ミックス (10 µM)、2.5 µl の 10× 反応緩衝液 (CLONTECH) および 0.5 µl の 50× Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH) に添加した。PCR 1 を、以下の条件を用いて実施した: 75 で 5 分、94 で 25 秒、次いで 27 サイクルの 94 で 10 秒、66 で 30 秒、72 で 1.5 分。5 つの別の第一の PCR 反応を、各実験について行った。産物をプールし、そして水で 1:10 に希釈した。第二の PCR 反応については、このプールしそして希釈した第一の PCR 反応物からの 1 µl を、プライマー NP1 および NP2 (10 µM) を PCR プライマー 1 の代わりに使用したことを除き、PCR 1 について用いた反応混合物と同じ反応混合物に添加した。PCR 2 を、10~12 サイクルの 94 で 10 秒、68 で 30

40

50

秒、72 で1.5分を用いて実施した。これらのPCR産物を、2%アガロースゲル電気泳動を用いて分析した。

【0176】

これらのPCR産物を、T/Aベクタークローニングキット (Invitrogen) を用いてpCR2.1に挿入した。形質転換したE. coliを、青/白およびアンピシリン選択に供した。白色コロニーを選択し、96ウェルプレート中に並べ、そして液体培養中で一晩増殖させた。挿入物を同定するために、PCR増幅を、PCR1の条件ならびにプライマーとしてNP1およびNP2を用いて、1mlの細菌培養物に対して実施した。PCR産物を、2%アガロースゲル電気泳動を用いて分析した。

【0177】

細菌クローンを、96ウェル形式で20%グリセロール中に貯蔵した。プラスミドDNAを、調製し、配列決定し、そしてGenBank、dbESTおよびNCI-CGAPデータベースの核酸相同性検索に供した。

【0178】

(RT-PCR発現分析)

第一鎖cDNAを、Gibco-BRL Superscript Preamplificationシステムを用いるオリゴ(dT)12~18プライミングによって、1μgのmRNAから生成した。製造者プロトコルを使用し、そしてこれは、42 で50分間の逆転写酵素とのインキュベーション、それに続く、37 で20分間のRNAse H処理を含んだ。反応を完了した後、この容量を、正規化の前に水で200μlに増大させた。16の異なる正常ヒト組織からの第一鎖cDNAを、Clontechから入手した。

【0179】

複数の組織からの第一鎖cDNAの正規化を、プライマー5' atatcgcgcgtcgtcgtcgaaca3' (配列番号31) および5' agccacacgcagctcatgttagaagg3' (配列番号32) を用いて アクチンを増幅することにより実施した。第一鎖cDNA (5μl) を、0.4μMプライマー、0.2μM各dNTP、1×PCR緩衝液 (Clontech、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、pH8.3) および1×Klentag DNAポリメラーゼ (Clontech) を含む、総容量50μlで増幅した。18サイクル、20サイクルおよび22サイクルで、5μlのPCR反応物を取り出し、そしてアガロース電気泳動のために使用した。PCRを、以下の条件下で、MJ Researchサーマルサイクラーを用いて実施した：初期変性は94 で15秒間であり、続いて18サイクル、20サイクル、および22サイクルの94 で15、65 で2分、72 で5秒。72 での最終伸長を、2分間行った。アガロースゲル電気泳動後、複数の組織からの283bpの アクチンバンドのバンド強度を、可視検査によって比較した。22サイクルのPCR後に全ての組織において等しい アクチンバンド強度を生じるように、第一鎖cDNAの希釈因数を算定した。22サイクルのPCR後に全ての組織において等しいバンド強度を達成するには、3ラウンドの正規化が必要であった。

【0180】

8P1D4遺伝子の発現レベルを決定するために、5μlの正規化した第一鎖cDNAを、以下のプライマー対を用いる、25、30、および35サイクルの増幅を用いるPCRによって分析した：

5' - ACT TTG TTG ATG ACC AGG ATT GGA - 3' (配列番号4)

5' - CAG AAC TTC AGC ACA CAC AGG AAC - 3' (配列番号5)。

半定量発現分析を、軽度のバンド強度を与えるサイクル数でのPCR産物を比較することにより達成した。

【0181】

(結果)

いくつかのSSH実験を、上述の材料および方法に記載のように行い、そしてこれらのSSH実験は、多数の候補遺伝子フラグメントクローンの単離を導いた。全ての候補クローンを配列決定し、そして、対応する遺伝子の正体に関する情報を提供するためおよび差別的な発現について特定の遺伝子进行分析するための決定を導くことを補助するために、主な公的な遺伝子データベースおよびESTデータベース中の全配列に対する相同性分析に供した。一般に、これらの検索したデータベースのいずれかにおいていかなる公知の配列とも相同性を有さず、従って新規な遺伝子を表すと考えられる遺伝子フラグメント、ならびに以前に配列決定された発現配列タグ(EST)に対して相同性を示す遺伝子フラグメントを、RT-PCRおよび/またはノーザン分析によって差別的発現分析に供した。

10

【0182】

8P1D4と名付けた、これらのcDNAクローンの1つは、436bpの長さであり、そしてNCI-CGAP腫瘍遺伝子データベースにおいてEST配列に対する相同性を示した。その後、この8P1D4遺伝子をコードする全長cDNAを、このcDNAを使用して単離し、STEAP-1と改名した。この8P1D4 cDNAヌクレオチド配列は、図1A~Bに示されるように、STEAP-1 cDNA配列のヌクレオチド150~585に対応する。28P3E1と名付けた、別のクローンは、561bpの長さであり、そしてNCI-CGAP腫瘍遺伝子データベースまたは他のデータベースにおいて、多くのEST配列に対する相同性を示した。この28P3E1配列(356bp)は、ヒト胎児組織由来のESTと同一である。全長STEAP-1 cDNAを得てそして配列決定した後に、このクローンはまた、STEAP-1(より詳細には、図1A~Bに示されるような、STEAP-1ヌクレオチド配列の残基622から3'末端まで)に対応することが明らかとなった。

20

【0183】

8P1D4 cDNAクローン由来のプライマーを使用するRT-PCRによる差別的発現分析は、8P1D4(STEAP-1)遺伝子が、正常前立腺ならびにLAPC-4異種移植片およびLAPC-9異種移植片において、ほぼ等しいレベルで発現されることを示した(図2、パネルA)。16の正常組織由来の第1鎖cDNAのさらなるRT-PCR発現分析は、前立腺における最も高いレベルの8P1D4発現を示した。いくつかの他の正常組織(すなわち、結腸、卵巣、小腸、脾臓および精巣)における実質的により低レベルな発現は、脳、脾臓、結腸および小腸における30サイクルの増幅でのみ検出可能であった(図2、パネルBおよびC)。

30

【0184】

(実施例2:全長STEAP-1をコードするcDNAのクローニング)

436bpの8P1D4遺伝子フラグメント(実施例1)を使用して、8P1D4/STEAP-1遺伝子をコードするさらなるcDNAを単離した。手短に言うと、正常なヒト前立腺cDNAライブラリー(Clontech)を、この436bpの8P1D4 cDNAから作製した標識プローブを用いてスクリーニングした。陽性クローンの1つであるクローン10は、1195bpの長さであり、そして339アミノ酸のタンパク質をコードし、ヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸配列は、いかなる公知のヒト遺伝子またはタンパク質に対しても有意な相同性を保持しなかった(国際出願WO98/53071に最近記載されたラット腎臓損傷タンパク質に対する相同性)。このコードされるタンパク質は、少なくとも6つの推定膜貫通モチーフを含み、これは、細胞表面配向性を示す(図1A~B(下線を付した推定膜貫通モチーフ)を参照のこと)。これらの構造的特徴によって、STEAP(「前立腺の6つの膜貫通上皮抗原(Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate)」)と命名した。

40

【0185】

引き続くさらなるSTEAPタンパク質の同定によって、この8P1D4遺伝子産物を「STEAP-1」と改名した。このSTEAP-1 cDNAおよびコードされるアミノ

50

酸配列を、図1A～Bに示し、これらは、それぞれ、配列番号1および配列番号2に対応する。STEAP-1 cDNAクローン10を、American Type Culture Collection(「ATCC」)(10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)に、プラスミド8P1D4クローン10.1として、1998年8月26日に寄託し、ATCC登録番号98849を付与された。このSTEAP-1 cDNAクローンを、EcoRI/XbaIの二重消化(5'末端でEcoRI、3'末端でXbaI)を使用して、このプラスミドから切除した。

【0186】

(実施例3: STEAP-1 遺伝子およびタンパク質発現分析)

STEAP-1の生物学的特徴を特徴付けることを開始するために、種々のヒト組織試料にわたる、STEAP-1 mRNAおよびSTEAP-1タンパク質の広範な評価を行った。この評価には、多くの正常ヒト組織、ヒト前立腺癌異種移植片および細胞株、ならびに種々の他のヒト癌細胞株における、STEAP-1発現のノーザンブロット分析、ウエスタンブロット分析および免疫組織化学的分析が含まれた。

【0187】

(実施例3A: 正常ヒト組織におけるSTEAP-1 mRNA発現のノーザンブロット分析)

正常ヒト組織におけるSTEAP-1 mRNA発現の最初の分析を、標識STEAP-1クローン10をプローブとして使用して、Clontech(Palo Alto, California)から得た2つの多組織ブロット(これは、総計16の異なる正常ヒト組織を含む)をノーザンブロットに供することによって行った。RNAサンプルを、アクチンプローブを使用して、定量的に正規化した。結果を、図3Aに示す。最も高い発現レベルは、正常な前立腺において検出され、結腸および肝臓において検出された発現レベルより約5～10倍低かった。これらのノーザンブロットは、約1.4 kbおよび4.0 kbの2つの転写物を示し、前者は、全長STEAP-1クローン10のcDNAに対応し、これは、STEAP-1のオープンリーディングフレーム全体をコードする。より大きい転写物が、正常な前立腺ライブラリーから3627 bpのcDNAとして別にクローニングされ、この配列は、2399 bpのイントロンを含む(図4)。

【0188】

この最初の分析は、STEAP-1クローン10プローブを使用して、37の正常ヒト組織のRNAドットブロットマトリクス(Clontech, Palo Alto, California)を分析することによって拡大した。これらの結果を図3Bに示し、これは、前立腺のみにおける強力なSTEAP-1発現を示した。非常に低いレベルのSTEAP-1 RNA発現は、肝臓、肺、気管および胎児肝臓組織において検出され、おそらく、前立腺癌と比較して5倍低いレベルであった。残りの組織のいずれにおいても、発現は検出されなかった。これらの分析に基づいて、有意なSTEAP-1発現は、正常組織において前立腺特異的であるようである。

【0189】

(実施例3B: 前立腺癌の異種移植片および細胞株におけるSTEAP-1 mRNA発現のノーザンブロット分析)

ヒト癌組織および細胞株におけるSTEAP-1発現を分析するために、ヒト前立腺癌異種移植片ならびに前立腺および非前立腺癌の細胞株の広範なパネル由来のRNAを、STEAP-1 cDNAクローン10をプローブとして使用するノーザンブロットによって分析した。全てのRNAサンプルを、エチジウムブロミド染色および標識アクチンプローブでのその後の分析によって、定量的に正規化した。

【0190】

図5に示される結果は、全てのLAPC異種移植片および全ての前立腺癌細胞株における、高レベルのSTEAP-1発現を示す。LAPC-9異種移植片における発現は、LAPC-4異種移植片と比較して高かったが、アンドロゲン依存性垂株とアンドロゲン非依

10

20

30

40

50

存性亜株との間には有意な差異は観察されなかった（図5A）。LAPC-4異種移植片における発現は、正常前立腺における発現に匹敵した。より低いレベルの発現は、PREC細胞（Clonetics）（これは、前立腺の基底細胞画分を表す）において検出された。前立腺癌細胞株の分析は、LNCaP（アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株）における最も高い発現レベルを示した。有意な発現はまた、アンドロゲン非依存性細胞株PC-3およびDU145においても検出された。高レベルのSTEAP発現はまた、前立腺癌の骨転移のモデルとしてマウスの脛骨内で増殖させた、LAPC-4腫瘍およびLAPC-9腫瘍においても検出された。

【0191】

有意に、非常に強力なSTEAP-1発現もまた、分析した多くの非前立腺ヒト癌細胞株においても検出された（図5A）。特に高レベルの発現は、RD-ES細胞、Ewing肉腫（EWS）由来細胞株において観察された。さらに、非常に高レベルの発現はまた、結腸癌細胞株（例えば、CaCo-2、LoVo、T84およびColo-205）、膀胱癌細胞株（例えば、SCABER、UM-UC-3、TCCSUPおよび5637）、卵巣癌細胞株（例えば、OV-1063およびSW626）および膵臓癌細胞株（例えば、HPAC、Capan-1、PANC-1およびBxPC-3）においても検出された。これらの結果は、対応する正常組織における強力な発現の不在（図3）と合わせて、STEAP-1が、一般に、これらの型（および他の型）のヒト癌において上方制御され得ることを示す。

【0192】

（実施例3C：前立腺癌および他の癌におけるSTEAP-1タンパク質発現のウエスタンブロット分析）

図1A～Bに示されるようなSTEAP-1アミノ酸配列のアミノ酸残基14～28（WKMKPRRNLEEDDYI；配列番号22）に対応する15マーのペプチドを合成し、そして以下のように、これを使用して、ヒツジを免疫し、このタンパク質のアミノ末端に対するヒツジモノクローナル抗体（抗STEAP-1）を作製した。このペプチドを、KLH（キーホールリンペットヘモシアニン）に結合体化させた。ヒツジを、完全フロイントアジュバント中の400μgのペプチドで最初に免疫した。その後、この動物を、不完全フロイントアジュバント中の200μgのペプチドで2週間毎にブーストした。抗STEAP抗体を、アフィゲル10（affigel 10）（Bio Rad）に結合したSTEAPペプチドを使用して、ヒツジ血清からアフィニティー精製した。精製した抗体を、0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝化生理食塩水中に保存する。

【0193】

抗体特異性を試験するために、STEAP-1のcDNAを、レトロウイルス発現ベクター（pSRtkneo、Mullerら、1991、MCB 11:1785）にクローニングした。NIH 3T3細胞を、STEAP-1をコードするレトロウイルスで感染し、2週間、G418下で選択した。感染および非感染NIH 3T3細胞のタンパク質抽出物のウエスタンブロット分析は、この感染細胞のみにおける、36kDの見かけの分子量を有するタンパク質の発現を示した（図6、「3T3 STEAP」および「3T3」と印したレーン）。

【0194】

抗STEAP-1ポリクローナル抗体を使用して、種々の前立腺癌異種移植片組織、前立腺癌細胞株および他の非前立腺癌細胞株から調製した細胞溶解物のウエスタンブロットを、プローブした。タンパク質サンプル（各20μg）を、抗Grb-2抗体でのこのブロットのプローブによって、定量的に正規化した。

【0195】

これらの結果を、図6に示す。STEAP-1タンパク質は、全てのLAPC前立腺癌異種移植片、全ての前立腺癌細胞株、初代前立腺癌試料およびその適合する正常な前立腺コントロールにおいて検出された。最も高いSTEAP-1タンパク質発現は、LAPC-9異種移植片およびLNCaP細胞において検出され、これは、直前に記載したノーザン

10

20

30

40

50

プロット分析と一致する。高レベルの発現はまた、膀胱癌細胞株UM - UC - 3においても観察された。他の癌細胞株における発現もまた、検出可能であった(図6)。

【0196】

(実施例3D: 前立腺腫瘍生検および外科的生検におけるSTEAP - 1タンパク質発現の免疫組織化学的分析)

臨床的材料におけるSTEAP - 1タンパク質発現の程度を決定するために、組織切片を、免疫組織化学的分析のために、種々の前立腺癌生検および外科的サンプルから調製した。組織を、10%ホルマリン中に固定し、パラフィンで包埋し、そして標準的なプロトコールに従って切片化した。ホルマリン固定し、パラフィン包埋した、LNCaP細胞の切片を、ポジティブコントロールとして使用した。切片を、STEAP - 1 N末端エピトープに対するヒツジ抗STEAP - 1ポリクローナル抗体(直前に記載したような)で染色した。LNCaP切片を、このポリクローナル抗体を作製するために使用したSTEAP - 1 N末端ペプチド免疫原(ペプチド1)、またはSTEAP - 1の別の領域由来の非特異的ペプチド(ペプチド2; YQQVQQNKEDAWIEH; 配列番号33)の過剰量の存在下で、染色した。

10

【0197】

結果を、図8に示す。LNCaP細胞は、全ての細胞における均一に強力な細胞周囲染色を示した(図8B)。過剰なSTEAP N末端ペプチド(ペプチド1)は、抗体染色を競合的に阻害し得たが(図8A)、ペプチド2は、効果を有さなかった(図8B)。同様に、均一に強力な細胞周囲染色が、LAPC - 9(図8F)およびLAPC - 4前立腺癌異種移植片において見られた。これらの結果は明確であり、そしてこの染色がSTEAP特異的であることを示唆する。さらに、これらの結果は、形質膜に対するSTEAPの局在を示し、これは、以下の実施例4において示された生化学的知見を確認する。

20

【0198】

これらの種々の臨床的試料を用いて得られた結果を、図8C(正常な前立腺組織)、図8D(グレード3の前立腺癌)、および図8E(グレード4の前立腺癌)において示し、そしてこれらはまた、表1に示された、要約した結果に含まれる。強力な染色に対する光は、試験した全ての前立腺癌サンプルならびに正常な前立腺または良性疾患(例えば、BPH)に由来する全てのサンプルにおける腺上皮において観察された。このシグナルは、上皮細胞の細胞膜、特に細胞 - 細胞接合部で最も強力であるようであり(図8C ~ E)、そしてまた、STEAP N末端ペプチド1で阻害される。いくらかの基底細胞染色もまた、正常な前立腺において示され(図8C)、これは、萎縮性の腺を試験した場合により明らかである。STEAP - 1は、全てのグレードの前立腺癌で発現されるようである。なぜなら、低グレード(図8D)、高グレード(図8E)および転移性の前立腺癌(LAPC - 9によって示される; 図8F; 図32A ~ Bに示されるヒト患者転移もまた参照のこと)の全てが、強力な染色を示すからである。

30

【0199】

正常な非前立腺組織の大きいパネルの免疫組織化学的染色は、これらの正常組織のほとんどにおいて、検出可能なSTEAP - 1発現を示さなかった(表1)。正常な膀胱は、移行性の上皮における低レベルの細胞表面染色を示した(図8G)。脾臓、胃、子宮、ファローピウス管および下垂体は、低レベルの細胞質染色を示した(表1)。ノーザンプロットは、脾臓におけるSTEAP - 1発現をほとんど示さなかった(図3)、この観察された細胞質染色が、特異的であるのかまたはこの抗体の非特異的結合に起因するのは明らかではない。これらの結果は、正常組織におけるSTEAP - 1の細胞表面発現が、前立腺および膀胱に制限されるようであることを示す。

40

【0200】

表1: 抗STEAP - 1ヒツジポリクローナル抗体でのヒト組織の免疫組織化学的染色

【0201】

【表1】

| 染色強度 | 組織* |
|-----------|---|
| なし | 小脳、大脳皮質、脊髄、心臓、骨格筋(2)、動脈、胸腺、脾臓(4)、骨髄、リンパ節(3)、肺(8)、肝臓(4)、回腸、腎臓(2)、精巣(2)、卵巣、胎盤、乳房、副腎(2)、甲状腺(2)、皮膚(2) |
| 軽度(細胞質) | 尿管、膀胱癌(2/5)、結腸(4/7)、結腸癌(4/7)、ファローピウス管(2)、下垂体、膵臓、胃(1/2)、子宮(1/2) |
| 軽度(膜) | 前立腺癌骨髄転移(1/6)、前立腺癌リンパ節転移(1/5)、肺癌(1/6) |
| 中程度～強度(膜) | 前立腺(7/7)、BPH(5/5)、前立腺癌(20/20)**、前立腺癌リンパ節転移(4/5)、前立腺癌骨髄転移(5/6)、膀胱(2/5)、膀胱癌(3/5)、肺癌(3/6) |

*1より多いサンプルを1組織あたりに分析した場合、括弧内の数は、分析総数あたりの陽性染色数を示す。

**前立腺癌のグレードは、3～5にわたり、そしてGleasonスコアは、7～10にわたった。

10

20

(実施例3E:膀胱癌および肺癌におけるSTEAP-1タンパク質発現の免疫組織化学的分析)

他の癌におけるSTEAP-1タンパク質発現の程度を決定するために、膀胱癌および肺癌の臨床試料由来の組織を、実施例3Dに記載のようなポリクローナル抗体および方法を使用する免疫組織化学的分析に供した。図21A～Dに示される結果は、前立腺癌組織で観察されたパターンと類似の細胞周囲染色パターンを明らかにする。

【0202】

(実施例4:STEAP-1タンパク質の生化学的特徴付け)

STEAP-1タンパク質を最初に特徴付けるために、cDNAクローン10を、pcDNA3.1Myc-Hisプラスミド(Invitrogen)(これは、そのカルボキシル末端に6Hisタグをコードする)にクローニングし、そして抗Hisモノクローナル抗体(His-プローブ、Santa Cruz)ならびに上記のような抗STEAP-1ポリクローナル抗体を使用するフローサイトメトリーによって分析した。細胞の染色を、インタクトな細胞および透過化処理した細胞に対して行った。これらの結果は、透過化処理した細胞のみが、両方の抗体で染色されることを示し、これは、STEAP-1タンパク質の両末端が、細胞内局在されていることを示す。従って、1以上のSTEAP-1タンパク質末端は、形質膜よりもむしろ細胞内オルガネラに関連しているという可能性がある。

【0203】

STEAP-1タンパク質が細胞表面で発現されるか否かを決定するために、インタクトな、STEAP-1をトランスフェクトした293T細胞を、ビオチン化試薬(これは、生存細胞には侵入しない)で標識した。次いで、STEAP-1を、抗Hisおよび抗STEAP抗体を使用して、細胞抽出物から免疫沈降させた。SV40ラージT抗原(293T細胞で高レベルで発現される細胞内タンパク質)および内因性細胞表面トランスフェリンレセプターを、それぞれ、ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールとして免疫沈降させた。免疫沈降後、これらのタンパク質を膜に転写し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジンで可視化した。この分析の結果を、図7に示す。トランスフェリンレセプター(ポジティブコントロール)およびSTEAP-1のみが、ビオチンで標識され、一方、SV40ラージT抗原(ネガティブコントロール)は、検出可能に標識されなかった(図7A)。細胞表面タンパク質のみが、この技術で標識

30

40

50

されるので、STEAP-1が細胞表面タンパク質であることが、これらの結果から明らかである。フローサイトメトリー分析から得られた結果を組み合わせ、STEAP-1が細胞内のアミノ末端およびカルボキシル末端を有する細胞表面タンパク質であることが、明らかである。

【0204】

さらに、STEAP-1二次構造予想とともに、上記の結果は、STEAP-1が6つの潜在的膜貫通ドメイン、3つの細胞外ループ、2つの細胞内ループおよび2つの細胞内末端の分子位相を有するIIIa型膜タンパク質であることを示す。細胞膜に関するSTEAP-1タンパク質位相の模式的な例示を、図2に示す。

【0205】

さらに、前立腺、膀胱および結腸の癌細胞は、ビオチン化研究によってSTEAP-1の細胞表面発現について直接分析される。簡単には、ビオチン化細胞表面タンパク質を、ストレプトアビジンゲルでアフィニティー精製し、そして上記の抗STEAP-1ポリクローナル抗体でプローブした。清浄にストレプトアビジン精製されたタンパク質のウエスタンブロットは、試験した前立腺(LNCaP、PC-3、DU145)、膀胱(UM-UC-3、TCCSUP)および結腸癌(LoVo、Colo)細胞、ならびにSTEAP-1をコードするレトロウイルスで感染したNIH3T3細胞の全てにおいて内因性STEAP-1の細胞表面ビオチン化を示すが、ネガティブコントロールとして使用した発現しないNIH3T3細胞においては示さない(図7B)。さらなるネガティブコントロールにおいて、STEAP-1タンパク質は、非ビオチン化STEAP発現細胞由来のストレプトアビジン沈殿中に検出されなかった(図7B)。

【0206】

(実施例5:STEAP-1の組換え発現)

(pGEX構築物)

細菌細胞中でSTEAP-1を発現させるために、STEAP-1の一部を、pGEX-6P-1(Amersham Pharmacia Biotech, NJ)中にクローニングすることによって、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子に融合させた。全ての構築物を、N末端に融合したGSTおよびC末端の6個のヒスチジンエピトープを有する組換えのSTEAP-1タンパク質配列を生じるように作製した。6個のヒスチジンエピトープタグを、ORFの3'末端でクローニングプライマーにヒスチジンコドンが付加することによって作製した。PrescissionTM認識部位によって、STEAP-1からのGSTタグの切断を可能にする。アンピシリン耐性遺伝子およびpBR322起点によって、E.coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にする。以下のSTEAP-1のフラグメントを、pGEX-6P-1中にクローニングした:

アミノ酸148~251;アミノ酸144~339;アミノ酸39~253;アミノ酸70~136;アミノ酸254~313。

【0207】

そして以下のフラグメントを、pGEX-4T中にクローン化した:アミノ酸2~247;アミノ酸135~318;およびアミノ酸144~339。

【0208】

STEAP-1タンパク質の以下の領域にわたるpGEX-6P-1中に作製し得るさらなる例示的な構築物は:アミノ酸1~339;アミノ酸1~144を含む。

【0209】

(pcDNA3.1/MycHis構築物)

哺乳動物細胞にSTEAP-1を発現させるために、1,017bpのSTEAP-1ORF(翻訳開始Kozakコンセンサスを有する)を、pcDNA3.1/MycHis Version B(Invitrogen, Carlsbad, CA)にクローニングした。タンパク質発現を、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターより駆動する。この組換えタンパク質は、mycおよびC末端に融合した6つのヒスチジンを有する。p

10

20

30

40

50

cDNA 3.1 / MycHis ベクターはまた、ウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化シグナル、およびエピソードのSV40複製起点にそってmRNAの安定性を増強するための転写終止配列を含み、そして単純ベクターは、ラージT抗原を発現する細胞株において救助 (rescue) される。ネオマイシン耐性遺伝子は、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E. coliにおいてプラスミドの選択および維持を可能にする。

【0210】

(pSR 構築物)

STEAP-1を構成的に発現する哺乳動物細胞株を作製するために、1,017bpのORF (翻訳開始Kozakコンセンサスを有する)を、pSR にクローニングした。アンホトロピック (amphotropic) かつエコトロピック (ecotropic) なレトロウイルスを、293T-10A1パッケージング株へのpSR 構築物のトランスフェクション、または293細胞へのpSR およびヘルパープラスミド (-) の同時トランスフェクションによって作製する。レトロウイルスを使用して、種々の哺乳動物細胞株を感染し得、宿主細胞株にクローニングされた遺伝子 (STEAP-1) の組み込みを生じる。タンパク質発現を、長末端反復 (LTR) より駆動する。ネオマイシン耐性遺伝子は、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E. coliにおいてプラスミドの選択および維持を可能にする。抗FLAG抗体を使用する検出を可能にするために、FLAGタグをN末端およびC末端に融合したさらなるpSR 構築物を作製した。ORFの3'末端でのクローニングプライマーに、FLAGコンセンサス配列 5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3' (配列番号 (SEQ ID NO:) 34) を付加した。アミノ酸182~454を含む別のpSR 構築物を作製した。この短縮型形態のSTEAP-1タンパク質は、長い細胞外N末端領域の機能を決定することを補助する。

【0211】

さらなるpSR 構築物は、全長STEAP-1タンパク質のmyc/6HIS融合タンパク質を生成するように作製されている。

【0212】

(実施例6：他のヒトSTEAPの同定および構造的分析)

STEAP-1は、公知のヒト遺伝子のいずれとも相同性を有さない。STEAP-1に相同であるさらなる遺伝子の同定の試みに際して、STEAP-1のタンパク質配列を、電子プローブとして使用して公共のEST (発現配列タグ) データベース (dbEST) でファミリーメンバーを同定した。NCBI (National Center for Biotechnology Information) の「tblasm機能」を使用して、dbESTデータベースをSTEAP-1タンパク質配列と問い合わせた。この分析は、以下にさらに記載されるように、さらなる潜在的STEAP-1相同物またはSTEAPファミリーメンバーを示した。

【0213】

さらに、SSHクローニング実験はまた、STEAP-1関連cDNAフラグメントであるクローン98P4B6を同定した。このクローンを、正常前立腺cDNAをテスターとして使用し、かつLAPC-4 AD cDNAをドライバーとして使用するSSHクローニングより単離した。98P4B6クローンの大きな部分配列を、引き続いて正常前立腺ライブラリーより単離した；このクローンは、STEAP-1の一次構造に密接な相同性を有する173アミノ酸のORFをコードし、それゆえに、STEAP-2を名付けられた。2454bpの全長STEAP-2 cDNAは、前立腺ライブラリーより単離された。STEAP-2ヌクレオチドおよびコードされたORFアミノ酸配列を、図9A~Dに示す。STEAP-1の一次構造とSTEAP-2の部分一次構造とのアミノ酸アラインメントを、図11A~Bおよび11Cに示す。STEAP-1およびSTEAP-2は、171アミノ酸残基重複にわたって61%同一性を共有する (図11C)。STEAP

- 2 cDNAは、American Typr Culture Collection (「ATCC」; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) にプラスミド98P4B6-GTD3として、1999年7月2日にATCC受託番号PTA-311として寄託された。

【0214】

STEAP-2 cDNA (98P4B6-GTD3) は、72%のGCリッチである355bpの5' UTR (非翻訳領域) を含み、このことは、翻訳調節エレメントを含むことを示唆する。このcDNAは、6つの潜在的膜貫通ドメインを有する54アミノ酸 (a.a.) のオープンリーディングフレーム (ORF) をコードする。これは、339a.a. の長さを有するSTEAP-1と対照的である。STEAP-1とのアラインメントは、237アミノ酸重複にわたって54.9%の同一性を示す。驚くことに、STEAP-2における6つの潜在的膜貫通ドメインの位置は、STEAP-1における膜貫通ドメインの位置と一致する (アラインメントを参照のこと)。STEAP-2とSTEAP-1との相同性は、第一の潜在的細胞外ループから第五の膜貫通ドメインにわたる領域において最大である。この分析およびSTEAP-2の配列は、STEAP-1とSTEAP-2との間のいくつかの顕著な差異を示唆する: STEAP-2は、205a.a. の長さの細胞内N末端 (STEAP-1では69a.a.)、および短い4a.a. 細胞内C末端 (STEAP-1では26a.a.) を示す。これらの差異は、機能、および/または細胞内シグナル伝達経路との相互作用における顕著な差異を意味し得る。STEAP-2に対応する独特のマウスESTを同定するために、STEAP-2の独特なN末端を使用して、dbESTデータベースを問い合わせた。1つのマウスESTを単離した (AI747886、マウス腎臓)。これは、マウスSTEAP-2の同定、およびマウスにおけるSTEAP-2の発現分析において使用し得た。

【0215】

STEAP-1配列およびSTEAP-2配列に密接な相同性を保有するORFをコードする2つのESTをまた、STEAP-1タンパク質配列と電子プローブすることによって同定した。これらのEST (AI139607およびR80991) を、暫定的にSTEAP-3およびSTEAP-4と名付けた。STEAP-3をコードする全長cDNAを、引き続きクローニングし、そしてそのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を、図10A~Eに示す。STEAP-3 cDNAは、American Typr Culture Collection (「ATCC」; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) にプラスミドpSTEAP-3 EBB4として、1999年12月8日にATCC受託番号PTA-1033として寄託された。STEAPに対応するESTのヌクレオチド配列を、図10Fに示す。

【0216】

STEAP-1、STEAP-2、STEAP-3および推定のSTEAP-4の部分配列の構造のアミノ酸アラインメントを、図11A~Bに示す。このアラインメントは、4つのSTEAPファミリータンパク質全ての間の、特に、推定膜貫通ドメインの密接な構造類似性を示す。上記のように、STEAP-1とSTEAP-2とは、237アミノ酸重複にわたって54.9%同一性を示す。STEAP-1とSTEAP-3とは、264アミノ酸領域にわたって40.9%同一性であるが、STEAP-2とSTEAP-3とは、416アミノ酸領域にわたって47.8%同一性である。

【0217】

(実施例7: STEAP-2の組換え発現のための構築物)

(pGEX構築物)

細菌細胞中でSTEAP-2を発現させるために、STEAP-2の一部を、pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ) 中にクローニングすることによって、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子に融合させた。全ての構築物を、N末端に融合したGSTおよびC末端の6個のヒスチジンエピ

10

20

30

40

50

トープを有する組換えのSTEAP-2タンパク質配列を生じるように作製した。6個のヒスチジンエピトープタグを、ORFの3'末端でクローニングプライマーにヒスチジンコドンが付加することによって作製した。PreScissionTM認識部位によって、STEAP-2からのGSTタグの切断を可能にする。アンピシリン耐性遺伝子およびpBR322起点によって、E.coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にする。以下のSTEAP-2のフラグメントを、pGEX-6P-1中にクローニングした：

アミノ酸287～390；アミノ酸285～454；アミノ酸193～454。

【0218】

STEAP-2タンパク質の以下の領域にわたるpGEX-6P-1中に作製し得るさらなる例示的な構築物は：アミノ酸1～193；アミノ酸1～454を含む。

【0219】

以下のフラグメントを、pGEX-4T中にクローニングした：アミノ酸2～204；183～387；および276～453。

【0220】

(pCRII構築物)

RNAインサイチュ研究のためのセンスおよびアンチセンスのリボプローブを作製するために、pCRII構築物を、GTD3 STEAP-2 cDNAの367～877bpを使用して作製した。pCRIIベクターは、挿入物に隣接するSp6プロモーターおよびT7プロモーターを有し、RNAインサイチュ実験において使用されるSTEAP-2 RNAリボプローブの生成を駆動する。

【0221】

(pcDNA4/HisMax-TOPO構築物)

哺乳動物細胞にSTEAP-2を発現させるために、1,362bpのSTEAP-2 ORF (翻訳開始Kozakコンセンサスを有する)を、pcDNA4/HisMax-TOPO Version A (cat#K864-20、Invitrogen, Carlsbad, CA)にクローニングした。タンパク質発現を、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターより駆動する。この組換えタンパク質は、XpressTMおよびN末端に融合した6つのヒスチジンタグを有する。1,362bpのORFのみを含む構築物に加えて、終止コドンの前のベクター配列から生じる28アミノ酸融合物を含む組換えタンパク質のC末端を有するさらなる構築物を作製した。pcDNA4/HisMax-TOPOベクターはまた、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナル、およびエピソームのSV40複製起点にそってmRNAの安定性を増強するための転写終止配列を含み、そして単純ベクターは、ラージT抗原を発現する細胞株において救助(rescue)される。ゼオシン(Zeocin)耐性遺伝子は、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E.coliにおいてプラスミドの選択および維持を可能にする。

【0222】

(pcDNA3.1/MycHis構築物)

哺乳動物細胞にSTEAP-2を発現させるために、1,362bpのSTEAP-2 ORF (翻訳開始Kozakコンセンサスを有する)を、pcDNA3.1/MycHis Version A (Invitrogen, Carlsbad, CA)にクローニングした。タンパク質発現を、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターより駆動する。この組換えタンパク質は、mycおよびC末端に融合した6つのヒスチジンを有する。pcDNA3.1/MycHisベクターはまた、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナル、およびエピソームのSV40複製起点にそってmRNAの安定性を増強するための転写終止配列を含み、そして単純ベクターは、ラージT抗原を発現する細胞株において救助(rescue)される。ネオマイシン耐性遺伝子は、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E.coliにおいてプラスミドの選択および維持を可能にする。さらなるpcD

10

20

30

40

50

NA3.1/MycHis構築物を、STEAP-2アミノ酸の6～454、121～454および182～454を使用して作製した。

【0223】

(pBlueBacHis2a)

SF9昆虫細胞にSTEAP-1を発現するために、STEAP-1 ORFを、pBlueBacHis2A(Invitrogen, California)にクローニングした。タンパク質発現を、ポリヘドリンプロモーターより駆動する。N末端ポリHisおよびXpressタグは、組換えSTEAP-1タンパク質の検出および精製を可能にする。C末端エンテロキナーゼ認識部位は、これらのタグの切断を可能にする。アンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E.coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にする。AcMNPV DNAを用いる共トランスフェクションに続いて、相同性組換え事象がこれらの配列間で生じ、その結果、目的の遺伝子およびポリヘドリンを有する組換えベクターを生じる。簡略化サブクローニングに対する種々の制限酵素部位が存在する。さらに、レポーター遺伝子(b-ガラクトシダーゼ)は、便利に組換えプラークを同定し、それによって単調なプラークスクリーニングを容易にする。

【0224】

(pcDNA3.1CT-GFP-TOPO構築物)

哺乳動物細胞にSTEAP-2を発現させかつ蛍光を使用して組換えタンパク質の検出を可能にするために、1,362bp ORF(翻訳開始Kozakコンセンサスを有する)を、pcDNA3.1CT-GFP-TOPO(Invitrogen, CA)にクローニングした。タンパク質発現を、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターより駆動する。この組換えタンパク質は、非侵潤、インビボ検出および細胞生物学研究を容易にする。C末端に融合した緑色蛍光タンパク質(GFP)を有する。pcDNA3.1/MycHisベクターはまた、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナル、およびエピソードのSV40複製起点にそってmRNAの安定性を増強するための転写終止配列を含み、そして単純ベクターは、ラージT抗原を発現する細胞株において救助(rescue)される。ゼオシン(Zeocin)耐性遺伝子は、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E.coliにおいてプラスミドの選択および維持を可能にする。

【0225】

N末端GFP融合物を有するさらなる構築物は、STEAP-2タンパク質の全長にわたってpcDNA3.1NT-GFP-TOPO中に作製されている。

【0226】

(pSR 構築物)

STEAP-2を構成的に発現する哺乳動物細胞株を作製するために、1,362bpのORF(翻訳開始Kozakコンセンサスを有する)を、pSR にクローニングした。アンホトロピック(amphotropic)かつエコトロピック(ecotropic)なレトロウイルスを、それぞれ293T-10A1パッケージング株へのpSR 構築物のトランスフェクション、または293細胞へのpSR およびヘルパープラスミド(-)の同時トランスフェクションによって作製する。レトロウイルスを使用して、種々の哺乳動物細胞株を感染し得、宿主細胞株にクローニングされた遺伝子(STEAP-2)の組み込みを生じる。タンパク質発現を、長末端反復(LTR)より駆動する。ネオマイシン耐性遺伝子は、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E.coliにおいてプラスミドの選択および維持を可能にする。抗FLAG抗体を使用する検出を可能にするために、FLAGタグをN末端およびC末端に融合したさらなるpSR 構築物を作製した。ORFの3'末端でのクローニングプライマーに、FLAGコンセンサス配列 5' gat ta c a a g gat g a c g a c gat a a g 3' (配列番号34)を付加した。アミノ酸182～454を含む別のpSR 構築物を作製した。この短縮型形態のSTEAP-2タンパク質は、長い細胞外N末端領域の機能を決定することを補助する。

【 0 2 2 7 】

さらなる p S R 構築物は、全長 S T E A P - 2 タンパク質の m y c / 6 H I S 融合タンパク質を生成するように作製されている。

【 0 2 2 8 】

(実施例 8 : S T E A P - 2 および他のヒト S T E A P ファミリーメンバーの発現分析)
(実施例 8 A : 正常ヒト組織における S T E A P ファミリーメンバーの組織特異的発現)
S T E A P - 2 の R T - P C R 分析は、L A P C 前立腺癌異種移植片の全てにおける発現を示す(図 1 4、パネル A)。8つの正常ヒト組織の分析は、25 サイクルの増幅の後に前立腺特異的発現を示す(図 1 4、パネル B)。他の組織における低いレベルの発現は、30 サイクルの増幅の後にのみ検出された。S T E A P - 2 についてのノーザンブロットは、前立腺にのみ発現した(および L A P C 異種移植片における顕著に低いレベル)2つの転写物(約 3 k b および 8 k b のサイズ)のパターンを示し、他の 15 の正常ヒト組織のいずれにも検出可能な発現はなかった(図 1 5、パネル C)。従って、正常ヒト組織における S T E A P - 2 発現は、高度に前立腺特異的であるようだ。

10

【 0 2 2 9 】

正常組織における S T E A P ファミリーメンバーの発現分析を、ノーザンブロットおよび/または R T - P C R によって実施した。S T E A P ファミリーメンバーの全ては、組織制限発現パターンを示すようである。S T E A P - 3 / A I 1 3 9 6 0 7 発現を、図 1 2 A (ノーザン) および図 1 2 B (R T - P C R) に示す。S T E A P - 4 / R 8 0 9 9 1 発現を、図 1 3 に示す。

20

【 0 2 3 0 】

(実施例 8 B : 種々の癌細胞株における S T E A P - 2 の発現)
上記の R T - P C R の結果は、異なる S T E A P ファミリーメンバーが異なる組織発現パターンを示すことを示唆した。興味深いことに、前立腺に非常に特異的である S T E A P - 2 は、正常前立腺組織および異常の前立腺組織の両方において高度に発現する S T E A P - 1 と対照的である。

【 0 2 3 1 】

(S T E A P - 1 に比べた) S T E A P - 2 前立腺癌発現プロファイルにおけるこの示唆された差異をよりよく特徴付けるために、L A P C 異種移植片、ならびにいくつかの前立腺および他の癌細胞株由来の R N A に対して、S T E A P - 2 特異的プローブ(c D N A クローン 9 8 P 4 B 6 と標識された)を使用してノーザンブロッティングを実施した。これらの結果を、図 1 6 に示し、以下のように概要し得る。S T E A P - 2 は、正常前立腺、ならびにいくつかの前立腺異種移植片および細胞株に高度に発現する。より特定には、非常に強度の発現を、L A P C - 9 A D 異種移植片および L N C a P 細胞において観察した。顕著に減弱した発現または発現なしを、他の前立腺癌異種移植片および細胞株において観察した。非常に強度の発現をまた、E w i n g S a r c o m a 細胞株 R D - E S において明らかであった。膀胱、結腸、脾臓および卵巣の腫瘍由来の癌細胞株において高度に発現する S T E A P - 1 とは異なって、S T E A P - 2 は、これらの同一の細胞株において低い~検出可能でない発現を示した(図 5 と比較して)。驚くことに、S T E A P - 2 はまた、前立腺の正常基底細胞区画の例示である P r E C 細胞において検出可能でない。これらの結果は、S T E A P - 1 の発現と S T E A P - 2 の発現とが差示的に調節されることを示唆する。S T E A P - 1 は癌において一般にアップレギュレートされる遺伝子であり得るが、S T E A P - 2 は、正常前立腺および前立腺癌により限定される遺伝子であり得る。

30

40

【 0 2 3 2 】

(実施例 8 C : 正常前立腺および前立腺癌における S T E A P - 2 R N A のインサイチュ発現の分析)
S T E A P - 2 R N A の発現を、標識したアンチセンスプローブでのインサイチュハイブリダイゼーションを使用して、そしてコントロールとして標識したセンスプローブを使用して評価した。試験した 4 つの正常前立腺組織標本の 4 つ全ては、S T E A P について

50

ポジティブであった（図 2 2 A ~ B）。同様に、5つの前立腺癌組織標本の5つは、S T E A P RNA インサイチュハイブリダイゼーションを使用してポジティブであった（図 2 3 A ~ B）。試験した L N C a P 細胞の P I N 標本およびサンプルは、同様にポジティブであった。

【 0 2 3 3 】

（実施例 8 D：癌組織における S T E A P - 2 発現の分析）

種々の癌組織における S T E A P - 2 の発現を、R T - P C R を使用して試験した。これらの結果を、図 2 4 に示す。ここで、レーン 1 は、L A P C 4 A D 異種移植片由来のサンプルを示す；レーン 2 は、L A P C 9 A D 異種移植片である；レーン 3 は、L A P C 9 A D ² 異種移植片である（ヒト骨移植片とともに増殖した）；レーン 4 は、L A P C 9 A D I T である（脛骨内で増殖した）；レーン 5 は、結腸癌患者由来のプールした組織である；レーン 6 は、肺癌患者由来のプールした組織である；レーン 7 は、患者の正常前立腺組織である；レーン 8 は、患者の前立腺癌組織である；レーン 9 は、腎癌患者由来のプールした組織である；レーン 10 は、膀胱癌患者由来のプールした組織である；レーン 11 は、H e l a 細胞である；レーン 12 は、水ブランクである。最高の発現を、3つの L A P C 9 A D 異種移植片において見出す。高発現を、L A P C 4 A D 異種移植片、ならびに正常前立腺および肺癌において同様に観察する。顕著な発現をまた、結腸癌および膀胱がんにおいて検出した。低い発現を、前立腺癌および腎癌の患者サンプルにおいて検出した。

【 0 2 3 4 】

（実施例 8 E：正常組織における S T E A P - 2 発現の分析）

76の正常組織における S T E A P - 2 の発現を、RNA サンプルのドットプロット分析を使用して試験した。図 2 5 に示すように、S T E A P - 2 は、正常前立腺においてのみ非常に高いレベルで発現される。

【 0 2 3 5 】

（実施例 9：S T E A P 遺伝子の染色体上配置）

S T E A P - 1 の染色体上配置を、Gene Bridge 4 Human / Hamster 放射線ハイブリッド (RH) パネル (Walter ら、1994、Nat. Genetics 7:22) (Research Genetics, Huntsville AL) を使用して決定したが、S T E A P - 2 および S T E A P 相同物を、Stanford G3 放射線ハイブリッドパネル (Stewart ら、1997、Genome Res. 7:422) を使用してマッピングした。

【 0 2 3 6 】

以下の P C R プライマーを S T E A P - 1 について使用した：

【 0 2 3 7 】

【 化 1 】

8P1D4.1 5' ACTTTGTTGATGACCAGGATTGGA 3' (SEQ ID NO: 4)

8P1D4.2 5' CAGAACTTCAGCACACACAGGAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

93の放射線ハイブリッドパネル DNA について生じた S T E A P - 1 マッピングベクター

【 0 2 3 8 】

【 化 2 】

(21000002011010100010000001011101012210001110011101101010001000100010
21000001111001010000)

10

20

30

40

50

【化 3】

10

【化 4】

20

【化 5】

30

【化 6】

40

【化 7】

R80991.3 5' ACAAGAGCCACCTCTGGGTGAA 3' (SEQ ID NO: 35)
R80991.4 5' AGTTGAGCGAGTTTGCAATGGAC 3' (SEQ ID NO: 36)

【化 8】

00100000000010000111000000001001000001)

20

30

40

50

分野において一般に公知の方法を使用してマウスの遺伝子の標的した破壊を行うための遺伝子ノックアウト (K/O) ベクターに挿入し得る。さらに、代謝過程および上皮機能における STEAP の役割を、解明し得る。このような K/O マウスを、他の前立腺癌マウスモデル (例えば、TRAMP モデル (Greenberg ら、1995、PNAS 92:3439)) と交配させて、多かれ少なかれ攻撃的および転移性の前立腺癌の発生および進行に影響するか否かを決定し得る。

【0252】

(実施例 11: STEAP-1 および STEAP-2 の推定 HLA-A2 結合ペプチド) STEAP-1 および STEAP-2 タンパク質の完全アミノ酸配列を、Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) ウェブサイト (<http://bimas.dcr.t.nih.gov/>) において見出される HLA Peptide Motif Search アルゴリズムに入力した。この HLA Peptide Motif Search アルゴリズムは、HLA クラス I 分子 (そして特に、HLA-A2) の溝 (groove) の特定のペプチド配列の結合に基づいて、Ken Parker 博士によって開発された (Falk ら、1991, Nature 351:290-6; Hunt ら、1992, Science 255:1261-3; Parker ら、1992, J. Immunol. 149:3580-7; Parker ら、1994, J. Immunol. 152:163-75)。このアルゴリズムは、HLA-A2 ならびに他の HLA クラス I 分子に対して推定される結合についての完全タンパク質配列からの 8 マー、9 マー、および 10 マーのペプチドの位置付けおよび順位付けを可能にする。大半の HLA-A2 結合ペプチドは、9 マーであり、これは優先的に、2 位にロイシン (L) および 9 位にバリン (V) またはロイシン (L) を含む。

【0253】

STEAP-1 および STEAP-2 の推定結合ペプチドの結果を、下記の表 2 に示す。両方のタンパク質について、上位 5 つに順位付けされる候補を、その位置、各特異的ペプチドのアミノ酸配列、および推定結合スコアと共に示す。この結合スコアは、pH 6.5 で 37 °C での、ペプチドを含む複合体の解離に関する推定半減期に対応する。最高結合スコアを有するペプチド (すなわち、STEAP-1 ペプチド 165 についての 10776.470; STEAP-2 ペプチド 227 についての 1789.612) が、細胞表面上の HLA クラス I に最も緊密に結合すると予測された。従って、これらは、T 細胞認識のための最良の免疫原性標的を表す。HLA-A2 へのペプチドの実際の結合は、最終的には、抗原プロセッシング欠損細胞株 T2 上での HLA-A2 発現の安定性によって評価され得る (参考文献 5, 6)。特異的ペプチドの免疫原性は、樹状細胞の存在下における CD8+ 細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の刺激によって、インビトロで評価され得る (Xue ら、1997, Prostate 30:73-8; Peshwa ら、1998, Prostate 36:129-38)。

【0254】

【表 2】

表2:HLA-A2に対して最高の親和性を有する、STEAP-1およびSTEAP-2ペプチド配列の推定結合

| STEAP-1 | | | |
|---------|------|-----------|-------------------|
| 順位 | 開始位置 | 部分配列残基の列挙 | スコア (解離の推定半減期) |
| 1 | 165 | GLLSFFFAV | 10776.470 |
| 2 | 86 | FLYTLTREV | 470.951 |
| 3 | 262 | LLGTIHAL | 309.050 |
| 4 | 302 | LIFKSILFL | 233.719 |
| 5 | 158 | MLTRKQFGL | 210.633 |
| STEAP-2 | | | |
| 順位 | 開始位置 | 部分配列残基の列挙 | スコア (解離の推定半減期) |
| 1 | 227 | FLYSFVRDV | 1789.612 |
| 2 | 402 | ALLISTFHV | 1492.586 |
| 3 | 307 | LLSFFFAMV | 853.681 |
| 4 | 306 | GLLSFFFAM | 769.748 |
| 5 | 100 | SLWDLRHLL | 726.962 |

(実施例12:細胞性タンパク質のチロシンリン酸化のSTEAP-2誘導)

多重膜貫通タンパク質 (multi-transmembrane protein) は、膜からシグナルを伝達し、そして種々の下流の事象 (遺伝子発現、細胞の分化、移動および増殖を含む) を調節するシグナル伝達カスケードを開始する能力を有する (Biochim. Biophys. Acta 1997、1348:56-62、J. Virol. 1995; 69:675-83)。下流のシグナル伝達事象におけるSTEAP-1およびSTEAP-2の関与を決定するために、PC3細胞のチロシンリン酸化に対するSTEAP-1およびSTEAP-2の効果を研究した (図26)。neo、STEAP-1またはSTEAP-2を安定して発現するPC3細胞を、1%ウシ胎仔血清 (FBS) 中において一晩増殖させて、レセプター占拠率およびバックグラウンド活性を低下させた。次いで、これらの細胞を、1%または10%のいずれかのFBSの存在下で5分間インキュベートし、溶解し、そして抗ホスホチロシン (4G10 mAb) を用いるウェスタンブロッティングによって分析した。抗Grb2 Abを使用する重畳を、ゲルが等しくロードされたことを示すために使用した。

【0255】

この結果 (図26) は、PC3細胞中のSTEAP-2発現が、チロシン残基において、いくつかのタンパク質 (p150、p120、およびp75を含む) のリン酸化を誘導することを示している。対照的に、STEAP-1の発現は、p150の脱リン酸化を誘導した。いくつかのリン酸化タンパク質は、既知のシグナル伝達タンパク質に対応する。このことは、STEAP-1およびSTEAP-2が、特定のシグナル伝達カスケードの活

性化を制御し得ることを示す。

【0256】

(実施例13: MAPKカスケードのSTEAP-1およびSTEAP-2媒介性活性化)

いくつかの多重膜貫通タンパク質は、タンパク質キナーゼカスケード(MAPK経路を含む)を活性化することによって、特定の生物学的応答を誘導する(Curr. Med. Chem. 2000; 7: 911-43, Life Sci. 2000; 67: 335-6, Biol. Chem. 2000; 275: 4660-9)。STEAP-1およびSTEAP-2の発現が、特定のシグナル伝達経路を調節するに十分である否か、さもなくば、PC3細胞を休止させるにおいて十分であるか否かを決定するために、p38MAPKカスケードの活性化に対するこれらの遺伝子の効果を、前立腺癌細胞株PC3において研究した(図27A~B)。p38キナーゼの活性化は、チロシンおよびセリン残基におけるそのリン酸化に依存する。リン酸化されたp38は、Phospho-p38 mAbによって、非リン酸化状態から区別され得る。このリン酸特異的Abを使用して、操作されたPC3細胞株におけるp38のリン酸化状態を研究した。

10

【0257】

STEAP-1、STEAP-2、またはneoを安定して発現するPC3細胞を、1%または10%のいずれかのFBS中において一晚増殖させた。全細胞溶解産物を、ウェスタンブロッティングによって分析した。既知のp38活性化因子(NaSaIまたはTNF)で処理されたPC3細胞を、ポジティブコントロールとして使用した。この結果によって、コントロールneo遺伝子の発現は、p38リン酸化に対してなんら効果を有さないが、PC3細胞におけるSTEAP-1およびSTEAP-2の発現は、p38経路の活性化を誘導するに十分であることが示されている(図27A)。この結果は、抗p38 Abを使用するウェスタンブロッティングによって確認された。このウェスタンブロッティングは、ゲルにおける等しいタンパク質ローディングを示している(図27B)。

20

【0258】

別の実験セットでは、マイトジェン性MAPK経路(すなわち、ERKカスケード)を活性化するための、前立腺癌細胞株PC3中におけるSTEAP-1またはSTEAP-2の発現の十分性を決定した(図28A~B)。ERKの活性化は、チロシンおよびセリン残基におけるそのリン酸化に依存する。リン酸化されたERKは、Phospho-ERK mAbによって、非リン酸化状態から区別され得る。このリン酸特異的Abを使用して、操作されたPC3細胞株におけるERKのリン酸化状態を研究した。Rasの活性化形態を発現するPC3細胞を、ポジティブコントロールとして使用した。

30

【0259】

この結果によって、コントロールneo遺伝子の発現は、ERKリン酸化に対してなんら効果を有さないが、PC3細胞におけるSTEAP-2の発現は、ERKリン酸化における少なくとも3倍の増加を誘導するに十分であることが示されている(図28A)。STEAP-1の発現はまた、1%PBS中で増殖されたPC3細胞において、幾分かのERKリン酸化を誘導した。これらの結果は、抗ERKウェスタンブロッティングを使用して確認され(図28A)、そしてSTEAP-1およびSTEAP-2によるERK経路の活性化を確認している。

40

【0260】

FBSは、レセプター媒介性のERK活性化に寄与し得るいくつかの成分を含むので、本発明者らは、低レベルおよび最適レベルのFBS中でのSTEAP-1の効果を試験した。neoまたはSTEAP-1を発現するPC3細胞を、0.1%または10%のいずれかのFBS中で一晚増殖させた。これらの細胞を、抗Phospho-ERKウェスタンブロッティングによって分析した。この実験によって、STEAP-1が、0.1%FBS中においてERKのリン酸化を誘導することが示され、そしてSTEAP-1の発現が、さらなる刺激物の非存在下でERKシグナル伝達カスケードの活性化を誘導するに十分であることを確認している。

50

【0261】

(実施例14: STEAP-1のリガンド媒介性活性化)

いくつかの因子が、多重膜貫通タンパク質を活性化し、そして下流のシグナル伝達事象(イオン、ロイコトリエン、リゾホスファチド酸などを含む)を媒介することが示されている(Cell Biochem Biophys. 1999; 30: 213-42)。多重膜貫通タンパク質を活性化することが公知の化合物の一群は、臭気物質である(Neuron 2000; 25: 503-4)。本実施例では、3つのクラスの臭気物質を、PC3細胞においてチロシンキナーゼ媒介性シグナル伝達の活性化を誘導する能力についてスクリーニングした(図29)。

【0262】

neoまたはSTEAP-1を安定して発現するPC3細胞を、0.1% FBS中において一晩増殖させて、レセプター占拠を可能にした。次いで、この細胞を、示される濃度(0.1~10 μM)のシトラルバ(citralva)、エチルバニリンまたはIBMPを用いて5分間処理した。10% FBSでの処理を、コントロールとして使用した。異なる処理条件から生成された全細胞溶解産物(20 μg)を、SDS-PAGEによって分離し、そして抗ホスチロシンウェスタンブロッティングによって分析した。

【0263】

この実験によって、3つすべてのクラスの臭気物質が、PC3-STEAP-1細胞において幾分かのチロシンリン酸化を誘導するが、IBMPのみが、STEAP-1遺伝子を発現しないPC3-neo細胞のリン酸化に対して測定可能な効果を有していたことが示された。さらに、シトラルバおよびエチルバニリンは両方とも、STEAP-1特異的様式で、PC3-STEAP-1細胞においてp136-140およびp200-210のリン酸化の増加を誘導した。さらに、シトラルバは、160-200 kDaのタンパク質のデノボでのリン酸化を誘導した。この結果は、STEAP-1が、臭気物質処理細胞においてチロシンキナーゼ経路の活性化を媒介していることを実証している。

【0264】

シトラルバが、STEAP-1媒介様式で、タンパク質のチロシンリン酸化を誘導したという知見は、STEAP-1が1以上のシグナル伝達カスケードの活性化を開始し得ることを示唆する。STEAP-1の臭気物質活性化に関連した潜在的なシグナル伝達カスケードを同定するために、MAPKカスケードの活性化に対する臭気物質の効果を、PC3細胞において研究した(図30)。neoまたはSTEAP-1のいずれかを安定して発現するPC3細胞を、0.1% FBS中で一晩増殖させた。次いで、細胞を、5分間シトラルバを用いて処理した。10% FBSでの処理をコントロールとして使用した。リン酸特異的mAb(抗phospho-ERK)を使用して観察されたように、シトラルバは、STEAP-2特異的様式で、ERK経路を活性化した。これらの結果はまた、STEAP-1単独の発現が、ERK経路の活性化を誘導するに十分であるという図27~28に記載の知見と確認している。

【0265】

(実施例15: 潜在的シグナル伝達経路の同定)

STEAPが、細胞中において既知のシグナル伝達経路を直接的または間接的に活性化することを確認するため、そしてSTEAPが媒介する下流事象を描写するために、ルシフェラーゼ(luc)に基づいた転写レポーターアッセイを、STEAPを発現する細胞において実施する。これらの転写レポーターは、十分に特徴付けられたシグナル伝達経路の下流に存在する既知の転写因子に対してコンセンサスな結合部位を含む。レポーター、およびこれらの関連した転写因子の例、シグナル伝達経路、ならびに活性化刺激物を、以下に列挙する:

1. NFκB-luc, NFκB/Rel; Ik-キナーゼ/SAPK; 増殖/アポトーシス/ストレス
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; 増殖/分化
3. AP-1-luc, FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; 増殖/アポトー

10

20

30

40

50

シス/ストレス

4. ARE - luc , アンドロゲンレセプター ; ステロイド / MAPK ; 増殖 / 分化 / アポトーシス

5. p53 - luc , p53 ; SAPK ; 増殖 / 分化 / アポトーシス

6. CRE - luc , CREB / ATF2 ; PKA / p38 ; 増殖 / アポトーシス / ストレス。

【0266】

STEAP 媒介性効果を、mRNA 発現を示す細胞においてアッセイし得る。ルシフェラーゼレポータープラスミドを、脂質媒介性トランスフェクションによって導入し得る (TFX-50、Promega)。ルシフェラーゼ活性 (相対的転写活性の指標) を、ルシフェリン基質を伴う細胞抽出物のインキュベーションによって測定し、そして反応の発光を、照度計においてモニターする。

10

【0267】

(実施例 16 : STEAP 機能のインビトロアッセイ)

前立腺癌における STEAP の発現プロフィールは、腫瘍の開始、進行および / または維持における機能的役割を示唆する。STEAP 機能を、インビトロアプローチを使用して、哺乳動物細胞中において評価し得る。哺乳動物発現のために、STEAP を、多数の適切なベクター (pcDNA3.1 myc-His-タグおよびレトロウイルスベクター pSR tkneo (Muller ら, 1991, MCB 11:1785) を含む) 中にクローニングし得る。このような発現ベクターを使用して、STEAP を、いくつかの癌細胞株 (例えば、PC-3、NIH 3T3、LNCaP、および 293T を含む) において発現させ得る。STEAP の発現を、抗 STEAP 抗体を使用してモニターし得る。

20

【0268】

STEAP を発現する哺乳動物細胞株を、インビトロアッセイおよびインビボアッセイにおいて試験し得る (組織培養における細胞増殖、アポトーシスシグナルの活性化、SCID マウスにおける原発性腫瘍および転移腫瘍の形成、ならびに膜侵襲 (membrane invasion) 培養システム (MICS: Welch ら, Int. J. Cancer 43:449-457) を使用するインビトロでの侵襲を含む)。STEAP 細胞表現型を、STEAP の発現を欠く細胞の表現型と比較する。さらに、外因的に添加された STEAP タンパク質を伴ってまたは伴わずに処理された細胞を、増殖パラメーターの改変について分析し得る。

30

【0269】

STEAP を発現する細胞株はまた、マトリゲル (matrigel) コーティングされた多孔性膜チャンバ (Becton Dickinson) を通した細胞の通過を測定することによって、侵襲性および移動特性の改変についてアッセイされ得る。膜を通した反対側への細胞の通過は、カルセイン (calcein) - Am (Molecular Probes) をロードした指標細胞を用いる蛍光アッセイを使用して、モニターされる (Becton Dickinson Technical Bulletin #428)。分析された細胞株は、親細胞ならびに STEAP を過剰発現する PC3、3T3 および LNCaP 細胞を含む。STEAP が、化学誘引物質特性を有するか否かをアッセイするために、コントロール培地と比較した STEAP 馴化培地の勾配に対する多孔性膜を通した通過について、親の指標細胞をモニターする。このアッセイはまた、癌治療組成物の候補による STEAP 誘導効果の特異的中和を定性および定量するためにもまた使用され得る。

40

【0270】

前立腺癌細胞および他の癌細胞または正常細胞において発現される細胞性タンパク質に対して STEAP が結合するか否かを確証するために、2つのアプローチを採択し得る。第一のアプローチでは、種々の細胞株への組換え HIS-タグ化 STEAP 結合についてのインビトロアッセイが使用される。別のアプローチでは、組換えアルカリホスファターゼ

50

- S T E A P融合タンパク質が、G e n H u n t e t C o r p o r a t i o nからのA P - T A Gシステム(N a s h v i l l e , T N , カタログ番号Q 2 0 2)を使用して生成され、そしてこのA P - T A G融合物を使用して、記載のような種々の前立腺癌細胞株へのS T E A P結合を試験する(C h e n gおよびF l a n a g a n , 1 9 9 4 , C e l l 7 9 : 1 5 7 - 1 6 8)。細胞を洗浄し、そしてA P基質であるB C I P (これは、脱リン酸化に際して、不溶性の青色沈殿を形成する)を添加した後、光学顕微鏡下で青色に染色されている細胞を同定することによって、S T E A P結合を決定する。

【 0 2 7 1 】

種々の癌細胞株(種々の前立腺癌細胞株(例えば、L N C a P , P C - 3 , D U 1 4 5 , T S U P R , I A P C 4)を含むが、これに限定されない)が試験され得る。他の細胞株(例えば、P R E C前立腺細胞株, 2 9 3 T , P I N細胞、N I H 3 T 3などのような)もまた試験され得る。さらに、L A P Cおよび他の前立腺癌異種移植片が試験され得る。平衡状態の解離速度定数が、結合相互作用の強度を評価するために算出され得る。さらに、1細胞あたりの細胞表面レセプターの数決定され得る。S T E A Pに対する最高の結合能力を有する細胞株または組織が、S T E A P結合パートナーをクローニングするために好ましい。

【 0 2 7 2 】

別の機能的アッセイでは、S T E A Pを安定して発現するN I H 3 T 3細胞が、軟寒天においてコロニーを形成するその能力について分析され得る。これらの実験では、このような手順に使用される細胞(例えば、N I H 3 T 3細胞)をトランスフェクトして、S T E A Pもしくはn e oまたは活性化R a s (それぞれ、試験遺伝子、ネガティブコントロール、およびポジティブコントロールとして)を安定して発現させ、S T E A Pの形質転換能力を評価し得る。代表的な実験は、二連で実施され、そしてこのアッセイは、細胞プレATINGの約4週間後に評価される。S T E A Pが、ネガティブコントロール(例えば、n e o)と比較して、コロニー形成における増加を誘導することが実験観察によって実証された場合には、このような結果は、S T E A Pが、顕著な形質転換能力を有することを示す。

【 0 2 7 3 】

(実施例17: S T E A P腫瘍増殖の促進についてのインビボアッセイ)

腫瘍細胞増殖に対するS T E A Pタンパク質の効果は、腫瘍保有マウスにおける遺伝子過剰発現によって、インビボで評価され得る。例えば、S C I Dマウスに、t k N e o空ベクターまたはS T E A Pを含む 1×10^6 個の前立腺細胞株を、各フラスコにおいて皮下的に注射し得る。少なくとも2つのストラテジーが、使用され得る: (1) L T Rプロモーターの調節下での構造的なS T E A P発現、および(2)誘導可能なベクター系(例えば、エクジソン、t e tなど)の制御下での調節発現。次いで、腫瘍体積を、触知可能な腫瘍の出現でモニターし、そしてS T E A P発現細胞が、より高速で増殖するか否かを決定するために経時的に追跡した。さらに、マウスに、 1×10^5 個の同一細胞を同所的に移植して、S T E A Pが、標的組織(すなわち、前立腺)における局所的増殖に対する効果、またはその細胞が、転移(特に、肺、リンパ節、肝臓、骨髄などに)する能力に対する効果を有するか否かを決定し得る。骨腫瘍形成および増殖に対するS T E A Pの効果は、実施例1に記載のように、脛骨内(i n t r a t i b i a l l y)に前立腺腫瘍細胞を注射することによって評価され得る。

【 0 2 7 4 】

これらのアッセイはまた、治療用組成物候補(例えば、S T E A P抗体、S T E A Pアンチセンス分子、およびリボザイムなど)のS T E A P阻害性効果を決定するために有用である。

【 0 2 7 5 】

(実施例18: 抗S T E A P - 1ポリクローナル抗体を使用する、マウスおよびヒトにおける前立腺癌転移の検出)

(マウス)

10

20

30

40

50

STEAP - 1 免疫組織化学的分析を、4 μ g の同所性 LAPC - 9 前立腺癌腫瘍を保有するマウス由来のホルマリン固定組織、ならびにそれに由来する肺およびリンパ節転移物において実施した。連続性の肺切片を、抗 STEAP - 1 ヒツジポリクローナル抗体および抗 PSA ウサギポリクローナル抗体 (pAb) を使用して試験した。染色された組織の顕微鏡試験を使用して、LAPC - 9 前立腺癌細胞を検出した。これらの結果を、図 3 1 A ~ F に示す。

【0276】

抗 STEAP - 1 ヒツジ pAb は、マウス前立腺 (図 3 1 A)、ならびにリンパ節 (図 3 1 B) および肺 (図 3 1 C ~ D) への転移物において、ヒト前立腺癌細胞を容易に検出した。肺への小さな (図 3 1 C) および大きな (図 3 1 D) 微小転移の両方が、抗 STEAP - 1 pAb を使用して容易に検出された。肺での転移が、前立腺癌起源であることを確認するために、連続性の肺切片に対する免疫組織化学を、抗 PSA pAb を使用して実施した (図 3 1 E ~ F)。抗 STEAP - 1 pAb を用いて観察された強力な細胞表面染色は、抗 PSA ポリクローナル抗体の使用と比較して、微小転移の容易な検出を可能にする。

【0277】

(ヒト)

STEAP - 1 ポリクローナル Ab を、ヒト患者由来の転移性前立腺癌標本の類似の免疫組織化学的アッセイにおいて使用した。STEAP - 1 の高い発現が、研究されたリンパ節および骨の両方の転移において検出された。図 3 2 A (リンパ節転移) および 3 2 B (骨転移) において示されるように、強力な細胞周囲染色が、これらのヒト患者サンプルにおいて観察された。このことは、STEAP - 1 が、転移性前立腺癌の検出のために優れたマーカーであることを確認する。

【0278】

(実施例 19: STEAP - 1、STEAP - 2、および STEAP - 3 細胞外ループ - Fc 融合構築物)

哺乳動物細胞株の馴化培地中に STEAP - 1、STEAP - 2 および STEAP - 3 の細胞外ループを発現および分泌させるために、これらの遺伝子のフラグメントを、pFcベクター中にクローニングして、ヒト IgG Fc 領域の C 末端融合物を生成し得る。pFcベクターは、5' - c c t c g a c c t c c a a c a c c g g g g - 3' (配列番号 47) によってコードされる IgA プロテアーゼ切断部位 (Roche, カタログ番号 1461265) を先行させて、ヒト免疫グロブリン G1 である Fc (GenBank 登録番号 X70421 の塩基 74 ~ 768) を、XhoI および ApaI を使用して pTag - 5 (GenHunter Corp. Nashville, TN) 中にクローニングすることによって生成された。この構築物は、STEAP - 1、STEAP - 2 および STEAP - 3 の細胞外領域の C 末端に IgG Fc 融合物を生成するが、N 末端に IgG K シグナル配列を融合している。

【0279】

生じる組換えタンパク質を、トランスフェクトされた哺乳動物細胞の培地中への分泌について最適化し、そしてこれを使用して、STEAP - 1、STEAP - 2、および STEAP - 3 タンパク質と相互作用するリガンドまたはレセプターのようなタンパク質を同定し得る。これらのタンパク質融合物はまた、抗体を産生するための免疫原として使用され得る。タンパク質発現は、CMV プロモーターに由来する。Zeosin 耐性遺伝子は、このタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選別を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子は、E. coli 中でのプラスミドの選別を可能にする。

【0280】

STEAP - 1、STEAP - 2 および STEAP - 3 タンパク質の以下の細胞来ループが、pFc 中へのクローニングのために適切である。

【0281】

【化 9】

10

20

30

40

50

- STEAP-1 revihplatshqqyfykipilv (SEQ ID NO: 37)
 rrsrykllnwayqqvqqnkedawiehdivwrmei (SEQ ID NO: 38)
 widikqfvwytpptf (SEQ ID NO: 39)
- STEAP-2 ysfvrdvihpyarnqqsdffykipiei (SEQ ID NO: 40)
 rrserylflnmayqqvhanienwneeevwrie (SEQ ID NO: 41)
 krafeeyryfy (SEQ ID NO: 42)
- STEAP-3 ypyvyekkdntfmaaisipnripf (SEQ ID NO: 43)
 yyvrwrlgnlvtqailkknepfstssawlsdsy (SEQ ID NO: 44)

10

20

(実施例 20 : STEAP - 2 に対するポリクローナル抗体の産生)

3つの免疫原を使用して、STEAP - 2 に対して特異的な抗体を産生した。2つの免疫原は、STEAP - 2 タンパク質配列のアミノ酸 153 ~ 165 (ALQLGPKDASRQV ; 配列番号 45) およびアミノ酸 345 ~ 358 (IENSWNEEEVWRIE ; 配列番号 46) をコードするペプチドであった。第一のペプチド残基は、STEAP - 2 の N 末端に存在する (これは膜トポロジー予測プログラム SOSUI を使用すると、細胞内である)。後者のペプチド残基は、膜貫通ドメイン 3 と 4 との間の領域に存在し、そしてこの領域は、3つの細胞外ループの第二をコードすることが予測されている。第三の免疫原は、STEAP - 2 タンパク質配列のアミノ酸 2 ~ 204 を含むグルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質であった。この組換え GST - STEAP - 2 融合タンパク質は、グルタチオン - セファロース (sepharose) アフィニティクロマトグラフィーによって、誘導された細菌から精製された。

30

【0282】

上記の抗原に加えて、STEAP - 2 タンパク質の他の領域をコードするペプチド、STEAP - 2 タンパク質の全長配列または部分配列のいずれかをコードする細菌産生タンパク質およびバキュロウイルス産生タンパク質を使用して、種々の STEAP - 2 特異的抗体を産生した。これらの抗体は、STEAP - 2 機能を調節し得る領域に対して指向している。

【0283】

(ポリクローナル抗体 (pAb) の産生)

STEAP - 2 に対する pAb の産生のために、精製された GST - 融合タンパク質およびキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に結合体化されたペプチドを使用して、以下のように個々のウサギに免疫した。ウサギに、完全フロイントアジュバントに混合された、200 μg の融合タンパク質または KLH - ペプチド抗原を用いて免疫した。次いで、これらのウサギに、2週間毎に、不完全フロイントアジュバント中の 200 μg の免疫原を用いて注射した。試験採血を、各免疫から約 7 ~ 10 日後に行った。ペプチド 153 ~ 165 抗血清の力価は、個々の免疫原に対する ELISA によって決定された場合に、少なくとも 25,000 であり、そしてペプチド 345 ~ 358 の力価は、少なくとも 10,000 であった。GST - 融合血清の力価は、少なくとも 300,000 であった

40

50

。ペプチド抗血清を、A f f i g e lマトリクス (B i o R a d) に共有結合された個々のペプチドから構成されるアフィニティカラムに対して血清を通過させることによってアフィニティー精製した。G S T融合物に対して惹起された血清を、まず、G S Tアフィニティカラムに対して通過させることによって、G S T - 反応性抗体を除去することによって半精製する。次いで、S T E A P - 2特異的抗体を、G S T - S T E A P - 2アフィニティカラムに対して通過させることによって単離する。あるいは、S T E A P - 2特異的抗血清を、同一アミノ酸をコードするマルトース結合タンパク質 (M B P) - S T E A P - 2融合タンパク質を使用するアフィニティクロマトグラフィーによって単離する。

【0284】

(実施例21: S T E A Pタンパク質に対するモノクローナル抗体の産生)

S T E A P - 1、S T E A P - 2、S T E A P - 3またはS T E A P - 4タンパク質に対するm A bを産生するために、B a l b Cマウスに、完全フロイントアジュバントに混合された、個々のS T E A Pメンバータンパク質配列の領域をコードする、20 ~ 50 μ gのK L H共役ペプチドまたは細菌性組換えポリペプチド (例えば、G S T - 融合タンパク質) を用いて、腹腔内で免疫する。次いで、引き続き、マウスに、2 ~ 4週間毎に、フロイント不完全アジュバント中に混合された20 ~ 50 μ gの免疫原を用いて免疫する。あるいは、R i b iアジュバントを、初回免疫のために使用する。試験採血を、免疫から7 ~ 10日後に行い、免疫応答の力価および特異性をモニターする。

【0285】

S T E A P - 1のアミノ酸148 ~ 251を含むG S T - 融合タンパク質で免疫されたマウス由来の血清は、E L I S Aによって決定された場合に、少なくとも 8×10^6 の力価に達し、そしてウエスタンブロットによって、S T E A P - 1タンパク質を特異的に認識した (図33)。一旦、適切な反応性および特異性が、E L I S A、ウエスタンブロットティング、およびフローサイトメトリー分析によって決定されるように得られると、次いで、融合物およびハイブリドーマの生成を、当該分野において周知の確立された手順を使用して実施する (H a r l o wおよびL a n e、1988)。

【0286】

図33は、抗S T E A P - 1マウスp A bが、操作された細胞株中のS T E A P - 1タンパク質、およびL N C a P細胞中の内因性S T E A P - 1タンパク質を認識することを示すウエスタンブロットである。p c D N A 3 . 1 M Y C / H I Sタグ化S T E A P - 1またはn e o空ベクターのいずれかでトランスフェクトされたL N C a P細胞および293 T細胞、ならびにS T E A P - 1またはn e oコントロール遺伝子を発現するように操作されたR A T 1細胞の溶解産物を、S D S - P A G Eによって分離し、そしてニトロセルロースに転写した。次いで、このブロットを、S G T - S T E A P - 1融合タンパク質で免疫したマウス由来の血清の1 : 1000希釈物を使用する抗S T E A Pウエスタン分析に供した。

【0287】

代替的な抗原および免疫ストラテジーもまた、S T E A Pタンパク質の種々の領域に対して特異的な反応性および特異性を有するm A bを生成するために使用される。このような抗原としては、各S T E A Pファミリーメンバータンパク質配列の種々の領域 (例えば、推定細胞外ドメイン) をコードする、バキュロウイルス産生組換えタンパク質、または哺乳動物発現および分泌ヒトI g G F c融合タンパク質が挙げられ得る。細胞に基づく免疫ストラテジーもまた使用される。ここでは、S T E A Pファミリーメンバーのc D N Aを、N I H 3 T 3マウス線維芽細胞または300 . 19マウスp r e - B細胞のような細胞中において過剰発現させ、そしてこれらの細胞由来の細胞全体または膜調製物を、免疫原として使用する。さらに、S T E A P - 1またはS T E A P - 2 c D N Aをコードする哺乳動物発現ベクター (例えば、p c D N A 3 . 1) が使用される、D N Aに基づく免疫プロトコールを使用して、プラスミドD N Aの直接注射によってマウスに免疫する。このプロトコールは、単独で、またはタンパク質および/もしくは細胞に基づく免疫ストラテジーと組み合わせてのいずれかで使用される。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 8 】

本出願のいたるところに、種々の刊行物が、参照される。これらの刊行物の開示は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

【 0 2 8 9 】

本発明は、本明細書中に開示される実施形態による範囲に限定されず、この実施形態は、本発明の個々の局面の単一の例示として意図され、機能的に等価な任意のものは、本発明の範囲内である。本明細書中に記載のモデルおよび方法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、先の記載および教示から当業者にとって明らかとなり、そして本発明の範囲内に含まれることが同様に意図される。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逸脱なく実施され得る。

【 0 2 9 0 】

【表 3】

| | |
|--------------------------------------|--------|
| 出願人または代理人 の参照ファイル番号: 29. 17WO 1 | 国際出願番号 |
|--------------------------------------|--------|

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13規則の2)

| | |
|---|---------------|
| A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。 75 頁、4～6 行、 | |
| B. 寄託物の表示 <input checked="" type="checkbox"/> その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 <input type="checkbox"/> | |
| 寄託機関の名称 アメリカン タイプ カルチャー コレクション | |
| 寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む) アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209、マナサス ユニバーシティ ブールバード 10801 | |
| 寄託日 1998年8月26日 (26. 08. 98) | 受託番号 98849 |
| C. 追加の表示 (なければ空白のまま) <input type="checkbox"/> この情報は追付の用紙に続く <input type="checkbox"/> | |
| D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合) | |
| E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま) 下記の表示物は、追って国際事務局に提出する (表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定) | |

| |
|---|
| 受理官庁記入欄 <input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理された |
| 認定官 ミスティ ウォーカー 国際部門 703-305-3682 |

PCT/R0/134様式 (1992年7月)

| |
|---|
| 国際事務局記入欄 <input type="checkbox"/> この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された |
| 認定官 |

10

20

30

40

50

【 0 2 9 1 】

【 表 4 】

| | |
|---|-----------------|
| 出願人または代理人 の参照ファイル番号: 29. 17WO 1 | 国際出願番号 |
| 寄託された微生物に関する表示 (PCT規則13規則の2) | |
| A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。 84 頁、 1～3 行、 | |
| B. 寄託物の表示 その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 寄託機関の名称 アメリカン タイプ カルチャー コレクション | |
| 寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む) アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209、マナサス ユニバーシティ ブールバード 10801 | |
| 寄託日 1999年7月2日 (02. 07. 99) | 受託番号 PTA-311 |
| C. 追加の表示 (なければ空白のまま) この情報は追付の用紙に続く <input type="checkbox"/> | |
| D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合) | |
| E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま) 下記の表示物は、追って国際事務局に提出する (表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定) | |

| | |
|--|--|
| 受理官庁記入欄 <input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理された 認定官 ミスティ ウォーカー 国際部門 703-305-3682 PCT/RO/134様式 (1992年7月) | 国際事務局記入欄 <input type="checkbox"/> この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された 認定官 |
|--|--|

10

20

30

40

【 0 2 9 2 】

【 表 5 】

| | |
|--|--------|
| 出願人または代理人 の参照ファイル番号: 29. 17WO 1 | 国際出願番号 |
|--|--------|

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13規則の2)

| | |
|--|--|
| A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。 84頁、 27~29 行、 | |
| B. 寄託物の表示 | その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 <input checked="" type="checkbox"/> |
| 寄託機関の名称 アメリカン タイプ カルチャー コレクション | |
| 寄託機関の住所（郵便番号および国を含む） アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209、マナサス ユニバーシティ ブールバード 10801 | |
| 寄託日 1999年12月8日 (08.12.99) | 受託番号 PTA-1033 |
| C. 追加の表示（なければ空白のまま） <input type="checkbox"/> この情報は追付の用紙に続く | |
| D. 表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合） | |
| E. 別に添付する表示物（なければ空白のまま） 下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定） | |

| |
|--|
| 受理官庁記入欄 |
| <input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理された |
| 認定官 ミスティ ウォーカー 国際部門 703-305-3682 |

PCT/RO/134様式（1992年7月）

| |
|---|
| 国際事務局記入欄 |
| <input type="checkbox"/> この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された |
| 認定官 |

【図面の簡単な説明】

【図1A】 図1は、STEAPの構造である。1A~B: STEAP-1 (8P1B4) クローン 10 cDNA (それぞれ、配列番号1および2) のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列。開始メチオニンはアミノ酸残基位置1で太字で示され、そして6つの推定膜貫通ドメインは太字で示されており、そして下線が付されている。1C: STEAP-1 膜貫通方向の模式図; 推定の膜貫通ドメインを縁取るアミノ酸残基を示しており、そして図1A~Bの番号付けに相当する。1D: クローン10およびクローン3の重複する配列によって決定される、STEAP-1 遺伝子 (配列番号3) のG/Cリッチ5' 非コード配列。

【図1B】 図1は、STEAPの構造である。1A~B: STEAP-1 (8P1B4) クローン 10 cDNA (それぞれ、配列番号1および2) のヌクレオチドおよび推

定アミノ酸配列。開始メチオニンはアミノ酸残基位置 1 で太字で示され、そして 6 つの推定膜貫通ドメインは太字で示されており、そして下線が付されている。1 C : S T E A P - 1 膜貫通方向の模式図；推定の膜貫通ドメインを縁取るアミノ酸残基を示しており、そして図 1 A ~ B の番号付けに相当する。1 D : クローン 1 0 およびクローン 3 の重複する配列によって決定される、S T E A P - 1 遺伝子 (配列番号 3) の G / C リッチ 5 ' 非コード配列。

【図 1 C】 図 1 は、S T E A P の構造である。1 A ~ B : S T E A P - 1 (8 P 1 B 4) クローン 1 0 c D N A (それぞれ、配列番号 1 および 2) のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列。開始メチオニンはアミノ酸残基位置 1 で太字で示され、そして 6 つの推定膜貫通ドメインは太字で示されており、そして下線が付されている。1 C : S T E A P - 1 膜貫通方向の模式図；推定の膜貫通ドメインを縁取るアミノ酸残基を示しており、そして図 1 A ~ B の番号付けに相当する。1 D : クローン 1 0 およびクローン 3 の重複する配列によって決定される、S T E A P - 1 遺伝子 (配列番号 3) の G / C リッチ 5 ' 非コード配列。

10

【図 1 D】 図 1 は、S T E A P の構造である。1 A ~ B : S T E A P - 1 (8 P 1 B 4) クローン 1 0 c D N A (それぞれ、配列番号 1 および 2) のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列。開始メチオニンはアミノ酸残基位置 1 で太字で示され、そして 6 つの推定膜貫通ドメインは太字で示されており、そして下線が付されている。1 C : S T E A P - 1 膜貫通方向の模式図；推定の膜貫通ドメインを縁取るアミノ酸残基を示しており、そして図 1 A ~ B の番号付けに相当する。1 D : クローン 1 0 およびクローン 3 の重複する配列によって決定される、S T E A P - 1 遺伝子 (配列番号 3) の G / C リッチ 5 ' 非コード配列。

20

【図 2 A】 図 2 A は、前立腺組織における S T E A P - 1 の優先的発現。一本鎖 c D N A を 1 6 の正常な組織、L A P C 異種移植片 (4 A D 、 4 A I および 9 A D) および H e L a 細胞から調製した。アクチンおよび G A P D H に対するプライマーを用いて P C R によって中和を実施した。S T E A P - 1 (8 P 1 D 4) c D N A 由来のプライマーを用いる半定量的 P C R (図 1 A ~ B) は、正常な前立腺および L A P C 異種移植片における S T E A P - 1 の優先的発現を示す。以下のプライマーを S T E A P - 1 を増幅するために用いた：

8 P 1 D 4 . 1 5 ' A C T T T G T T G A T G A C C A G G A T T G G A 3 ' (配列番号 4)

30

8 P 1 D 4 . 2 5 ' C A G A A C T T C A G C A C A C A C A G G A A C 3 ' (配列番号 5)。

レーンは以下のとおりである：1 脳；2 前立腺；3 L A P C - 4 A D；4 L A P C - 4 A I；5 L A P C - 9 A D；6 H e L a；7 マウス c D N A；8 陰性コントロール。

【図 2 B】 図 2 B は、前立腺組織における S T E A P - 1 の優先的発現。一本鎖 c D N A を 1 6 の正常な組織、L A P C 異種移植片 (4 A D 、 4 A I および 9 A D) および H e L a 細胞から調製した。アクチンおよび G A P D H に対するプライマーを用いて P C R によって中和を実施した。S T E A P - 1 (8 P 1 D 4) c D N A 由来のプライマーを用いる半定量的 P C R (図 1 A ~ B) は、正常な前立腺および L A P C 異種移植片における S T E A P - 1 の優先的発現を示す。以下のプライマーを S T E A P - 1 を増幅するために用いた：

40

8 P 1 D 4 . 1 5 ' A C T T T G T T G A T G A C C A G G A T T G G A 3 ' (配列番号 4)

8 P 1 D 4 . 2 5 ' C A G A A C T T C A G C A C A C A C A G G A A C 3 ' (配列番号 5)。

レーンは以下のとおりである：1 脳；2 心臓；3 腎臓；4 肝臓；5 肺；6 脾臓；7 胎盤；8 骨格筋。

【図 2 C】 図 2 C は、前立腺組織における S T E A P - 1 の優先的発現。一本鎖 c D N

50

Aを16の正常な組織、LAPC異種移植片(4AD、4AIおよび9AD)およびHeLa細胞から調製した。アクチンおよびGAPDHに対するプライマーを用いてPCRによって中和を実施した。STEAP-1(8P1D4)cDNA由来のプライマーを用いる半定量的PCR(図1A~B)は、正常な前立腺およびLAPC異種移植片におけるSTEAP-1の優先的発現を示す。以下のプライマーをSTEAP-1を増幅するために用いた:

8P1D4.1 5'ACTTTTGTTGATGACCCAGGATTGGA3'(配列番号4)

8P1D4.2 5'CAGAACTTTCAGCACACACAGGAAC3'(配列番号5)。

レーンは以下のとおりである: 1結腸; 2卵巣; 3白血球; 4前立腺; 5小腸; 6脾臓; 7精巣; 8胸腺。

【図3A】 種々の正常なヒト組織および前立腺癌異種移植片におけるSTEAP-1発現のノーザンブロット分析であり、前立腺組織におけるSTEAP-1の優先的発現を示す。

2つの複数の組織のノーザンブロット(Clontech)を全長STEAP cDNAクローン10(図1A~B)でプローブした。キロベース(kb)のサイズ標準を、一方の側で示す。各レーンは、2μgのmRNAを含む、このmRNAは、アクチンプローブを用いて正規化した。A1脳; A2扁桃; A3尾状核; A4小脳; A5大脳皮質; A6前頭葉; A7海馬; A8延髄; B1後頭葉; B2被殻; B3黒質; B4側頭葉; B5視床; B6視床下核; B7脊髄; C1心臓; C2大動脈; C3骨格筋; C4結腸; C5膀胱; C6子宮; C7前立腺; C8胃; D1精巣; D2卵巣; D3脾臓; D4脳下垂体; D5副腎; D6甲状腺; D7唾液腺; D8乳腺; E1腎臓; E2肝臓; E3小腸; E4脾臓; E5胸腺; E6末梢白血球; E7リンパ節; E8骨髄; F1盲腸; F2肺; F3喉頭; F4胎盤; G1胎児脳; G2胎児心臓; G3胎児腎臓; G4胎児肝臓; G5胎児脾臓; G6胎児胸腺; G7胎児肺。

【図3B】 種々の正常なヒト組織および前立腺癌異種移植片におけるSTEAP-1発現のノーザンブロット分析であり、前立腺組織におけるSTEAP-1の優先的発現を示す。

図3Bは、STEAP-1 cDNAクローン10(図1A~B)でプローブした複数の組織RNAドットブロット(Clontech, Human Master Blotカタログ番号7770-1)であり、これは有意な検出可能発現を伴う他の組織に対して、前立腺における約5倍大きい発現を示す。

【図4】 ノーザンブロット(図3A)における4kbのメッセージに対応するSTEAP-1 GTH9クローンのヌクレオチド配列(配列番号6)。この配列は、図1A~BのSTEAP-1クローン10配列に対して2399塩基対のイントロンを含む; コード領域は、ヌクレオチド96~857および3257~3510(太字で示される)である。開始ATGは、太字でかつ下線を付してあり、終止コドンは、太字でかつ下線を付してあり、そしてイントロンとエキソンの境界には下線を付している。

【図5】 前立腺および複数の癌細胞株ならびに前立腺癌異種移植片におけるSTEAP-1の発現。異種移植片および細胞株フィルターを、1レーンあたり10μgの総RNAで調製した。このブロットをプローブとしてSTEAP-1クローン10を用いて分析した。全てのRNAサンプルを臭化エチジウム染色、および引き続きアクチンプローブを用いた分析によって正規化した。図5A: 種々の癌細胞株ならびに異種移植片および前立腺における発現。レーンは以下の通りである: (1)PrEC細胞、(2)正常前立腺組織、(3)LAPC-4AD異種移植片、(4)LAPC-4AI異種移植片、(5)LAPC-9AD異種移植片、(6)LAPC-9AI異種移植片、(7)LNCaP細胞、(8)PC-3細胞、(9)DU145細胞、(10)PANC-1細胞、(11)BxPC-3細胞、(12)HPAC細胞、(13)Capan-1細胞、(14)CACO-2細胞、(15)LOVO細胞、(16)T84細胞、(17)COLO-2

10

20

30

40

50

05細胞、(18)KCL-22細胞(急性リンパ球性白血病、ALL)、(19)HT1197細胞、(20)SCABER細胞、(21)UM-UC-3細胞、(22)TCCSUP細胞、(23)J82細胞、(24)5637細胞、(25)RD-ES細胞(ユーイング肉腫、EWS)、(26)CAMA-1細胞、(27)DU4475細胞、(28)MCF-7細胞、(29)MDA-MB-435s細胞、(30)NTERA-2細胞、(31)NCCIT細胞、(32)TERA-1細胞、(33)TERA-2細胞、(34)A431細胞、(35)HeLa細胞、(36)OV-1063細胞、(37)PA-1細胞、(38)SW626細胞、(39)CAOV-3細胞。図5B:マウスの脛骨(it)において増殖したLAPC-4およびLAPC-9異種移植片における発現と比較した、皮下(sc)で増殖したLAPC異種移植片中のSTEAP-1の発現。

【図6】 組織および複数の細胞株におけるSTEAP-1タンパク質発現のウエスタンブロット分析。前立腺癌の異種移植片および細胞株から調製した細胞溶解物のウエスタンブロットを、ポリクローナル抗体STEAP-1抗体調製物でプローブした。このサンプルは、20μgのタンパク質を含み、そしてウエスタンブロットの抗Grb2プローブを用いて正規化した。

【図7】 STEAP-1の細胞表面ビオチン化。図7A:ベクター単独または6-Hisタグ化STEAP-1をコードするcDNAを含むベクターでトランスフェクトした293T細胞の細胞表面ビオチン化。細胞溶解物を特定の抗体を用いて免疫沈降し、膜に転写し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジンを用いてプローブした。レーン1~4および6は、STEAP-1発現293T細胞から調製した溶解物からの免疫沈降に相当する。レーン5および7は、ベクターで形質転換した細胞由来の免疫沈降である。この免疫沈降は、以下の抗体を用いて実施した:(1)ヒツジ(免疫なし)、(2)抗ラージT抗原、(3)抗CD71(トランスフェリンレセプター)、(4)抗-His、(5)抗-His、(6)抗-STEAP-1、(7)抗STEAP-1。図7B:前立腺癌(LNCaP、PC-3、DU145)、膀胱癌(UM-UC-3、TCCSUP)および結腸癌(LOVO、COLO)の各々の細胞株を溶解の前にビオチン化する(+)か、またはしなかった(-)。ストレプトアビジンゲル精製タンパク質のウエスタンブロットを、抗STEAP-1抗体でプローブした。分子量マーカーは、キロダルトン(kD)で示す。

【図8】 抗STEAP-1ポリクローナル抗体を用いた、STEAP-1発現の免疫組織化学分析。組織を10%ホルマリンで固定し、そしてパラフィンに埋設した。組織切片を、N末端ペプチドを指向する抗STEAP-1ポリクローナル抗体を用いて染色した。図8A:N末端STEAP-1ペプチドの存在下でプローブしたLNCaP細胞、図8B:LNCaPおよび非特異的ペプチド2、図8C:正常前立腺組織、図8D:グレード3(3等級)前立腺癌、図8E:グレード2、グリーソン(Gleason)7前立腺癌、図8F:LAPC-9 AD異種移植片、図8G:正常膀胱、図8H:正常結腸。全ての画像は、400×倍率である。

【図9】 STEAP-2(98P4B6)クローンGTD3 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号7)および推定アミノ酸配列(配列番号8)。開始メチオニンおよびコザック(Kozak)配列を、太字で示し、そして推定膜貫通ドメインを太字下線で示す。5'UTRは、72%という高GC含量を示す。

【図10A】 (図10A~E)

STEAP-3のヌクレオチド配列(配列番号9)および推定アミノ酸配列(配列番号10)。コザック領域は、太字である。

【図10B】 (図10A~E)

STEAP-3のヌクレオチド配列(配列番号9)および推定アミノ酸配列(配列番号10)。コザック領域は、太字である。

【図10C】 (図10A~E)

STEAP-3のヌクレオチド配列(配列番号9)および推定アミノ酸配列(配列番号10)。コザック領域は、太字である。

10

20

30

40

50

【図10D】 (図10A~E)

STEAP-3のヌクレオチド配列(配列番号9)および推定アミノ酸配列(配列番号10)。コザック領域は、太字である。

【図10E】 (図10A~E)

STEAP-3のヌクレオチド配列(配列番号9)および推定アミノ酸配列(配列番号10)。コザック領域は、太字である。

【図10F】 (図10F)

STEAP-1のタンパク質配列を用いた検索によって得たさらなるSTEAPファミリーメンバーに相当する、dbESTデータベースエントリーのヌクレオチド配列(それぞれ、配列番号11~14)。

10

【図11】 STEAPファミリータンパク質の一次構造比較:

(図11A~B)PIMAプログラム(インターネットアドレス:<<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>>のPIMA 1.4プログラム)を用いたSTEAP1~4(それぞれ、配列番号2、8、10および15)のアミノ酸配列アラインメント; SOSUIプログラム(以下のインターネットアドレスから入手可能:http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv_sosui/submit.html)によって同定された膜貫通ドメインは太字である。PIMA最大連結クラスター化結果を示す; 同一の残基は太字で示す。

(図11C)STEAP-1(8P1D4クローン10; 配列番号2)配列およびSTEAP-2(98P4B6クローンGTD3; 配列番号8)配列のアミノ酸配列アラインメント。このアラインメントは、baylor College of Medicine Search Launcher WebサイトのSIMアラインメントプログラムを用いて実施した。膜貫通ドメインを太字で示す。結果は、237残基重複において54.9%を示す(スコア:717.0; ギャップ頻度:0.0%)。

20

(図11D)STEAP-1(配列番号2)配列およびSTEAP-3(98P4B6クローンGTD3; 配列番号10)配列のアミノ酸配列アラインメント。同一の残基にアスタリスク(*)を付けて示す。SIMの結果:264残基重複において40.9%同一性; スコア:625.0; ギャップ頻度:0.0%。

(図11E)STEAP-2(配列番号8)配列およびSTEAP-3(98P4B6クローンGTD3; 配列番号10)配列のアミノ酸配列アラインメント。同一の残基にアスタリスク(*)を付けて示す。SIMの結果:416残基重複において47.8%同一性; スコア:1075.0; ギャップ頻度:0.2%。

30

【図12A】 ノーザンブロット(図12A~B)およびRT-PCR

(図12B)による正常組織におけるSTEAP-3 mRNAの発現。RT-PCR分析については、一本鎖cDNAを16の正常な組織から調製した。アクチンおよびGAPDHに対するプライマーを用いたPCRによって正規化を実施した。半定量的PCR(AI139607に対するプライマーを用いる)は、25サイクルの増幅後、胎盤および前立腺におけるAI139607の優先的発現を示す。AI139607を増幅するために、以下のプライマーを用いた:

AI139607.1 5' TTAGGACAACCTTGATCACCCAGCA 3' (配列番号16)

AI139607.2 5' TGTCCAGTCCAAACTGGGTATTT 3' (配列番号17)。

レーンは(左から右に)以下の通りである:パネル1:心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および膵臓; パネル2:脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸および白血球。

40

【図12B】 ノーザンブロット(図12A~B)およびRT-PCR(図12B)による正常組織におけるSTEAP-3 mRNAの発現。RT-PCR分析については、一本鎖cDNAを16の正常な組織から調製した。アクチンおよびGAPDHに対するプラ

50

イマーを用いたPCRによって正規化を実施した。半定量的PCR(AI139607に対するプライマーを用いる)は、25サイクルの増幅後、胎盤および前立腺におけるAI139607の優先的発現を示す。AI139607を増幅するために、以下のプライマーを用いた：

AI139607.1 5' TTAGGACAACCTTGATCACCAAGCA 3' (配列番号16)

AI139607.2 5' TGTCCAGTCCAAACTGGGTATTT 3' (配列番号17)。

レーンは以下の通りである：1 脳；2 心臓；3 腎臓；4 肝臓；5 肺；6 脾臓；7 胎盤；8 骨格筋。

10

【図12C】 ノーザンブロット(図12A~B)およびRT-PCR(図12B)による正常組織におけるSTEAP-3 mRNAの発現。RT-PCR分析については、一本鎖cDNAを16の正常な組織から調製した。アクチンおよびGAPDHに対するプライマーを用いたPCRによって正規化を実施した。半定量的PCR(AI139607に対するプライマーを用いる)は、25サイクルの増幅後、胎盤および前立腺におけるAI139607の優先的発現を示す。AI139607を増幅するために、以下のプライマーを用いた：

AI139607.1 5' TTAGGACAACCTTGATCACCAAGCA 3' (配列番号16)

AI139607.2 5' TGTCCAGTCCAAACTGGGTATTT 3' (配列番号17)。

20

レーンは以下の通りである：1 結腸；2 卵巣；3 白血球；4 前立腺；5 小腸；6 脾臓；7 精巣；8 胸腺。

【図13】 肝臓におけるSTEAP-4/R80991の優先的発現。一本鎖cDNAを16の正常な組織から調製した。アクチンおよびGAPDHに対するプライマーを用いたPCRによって正規化を実施した。半定量的PCR(R80991に対するプライマーを用いる)は、25サイクルの増幅後、肝臓におけるR80991の優先的発現を示す。R80991を増幅するために、以下のプライマーを用いた：

R80991.1 5' AGGGAGTTTCAGCTTTCGTTCAGTC 3' (配列番号18)

30

R80991.2 5' GGTAGAACTTGTAGCGGCTCTCCT 3' (配列番号19)。

【図13A】 肝臓におけるSTEAP-4/R80991の優先的発現。一本鎖cDNAを16の正常な組織から調製した。アクチンおよびGAPDHに対するプライマーを用いたPCRによって正規化を実施した。半定量的PCR(R80991に対するプライマーを用いる)は、25サイクルの増幅後、肝臓におけるR80991の優先的発現を示す。R80991を増幅するために、以下のプライマーを用いた：

R80991.1 5' AGGGAGTTTCAGCTTTCGTTCAGTC 3' (配列番号18)

R80991.2 5' GGTAGAACTTGTAGCGGCTCTCCT 3' (配列番号19)。

40

レーンは以下の通りである：1 脳；2 心臓；3 腎臓；4 肝臓；5 肺；6 脾臓；7 胎盤；8 骨格筋。

【図13B】 肝臓におけるSTEAP-4/R80991の優先的発現。一本鎖cDNAを16の正常な組織から調製した。アクチンおよびGAPDHに対するプライマーを用いたPCRによって正規化を実施した。半定量的PCR(R80991に対するプライマーを用いる)は、25サイクルの増幅後、肝臓におけるR80991の優先的発現を示す。R80991を増幅するために、以下のプライマーを用いた：

R80991.1 5' AGGGAGTTTCAGCTTTCGTTCAGTC 3' (配列番号18)

50

R 8 0 9 9 1 . 2 5 ' G G T A G A A C T T G T A G C G G C T C T C C T 3 ' (配列番号 1 9)。

レーンには以下の通りである：1 結腸；2 卵巣；3 白血球；4 前立腺；5 小腸；6 脾臓；7 精巣；8 胸腺。

【図 1 4】 前立腺組織における S T E A P - 2 (9 8 P 4 B 6) の優先的発現。一本鎖 c D N A を 8 つの正常な組織、L A P C 異種移植片 (4 A D、4 A I、および 9 A D)、ならびに H e L a 細胞から調製した。アクチンおよび G A P D H に対するプライマーを用いた P C R によって正規化を実施した。半定量的 P C R (9 8 P 4 B 6 に対するプライマーを用いる) は、正常前立腺および L A P C 異種移植片における 9 8 P 4 B 6 の優先的発現を示す。S T E A P I I を増幅するために、以下のプライマーを用いた：

9 8 P 4 B 6 . 1 5 ' G A C T G A G C T G G A A C T G G A A T T T G T 3 ' (配列番号 2 0)

9 8 P 4 B 6 . 2 5 ' T T T G A G G A G A C T T C A T C T C A C T G G 3 ' (配列番号 2 1)

【図 1 4 A】 前立腺組織における S T E A P - 2 (9 8 P 4 B 6) の優先的発現。一本鎖 c D N A を 8 つの正常な組織、L A P C 異種移植片 (4 A D、4 A I、および 9 A D)、ならびに H e L a 細胞から調製した。アクチンおよび G A P D H に対するプライマーを用いた P C R によって正規化を実施した。半定量的 P C R (9 8 P 4 B 6 に対するプライマーを用いる) は、正常前立腺および L A P C 異種移植片における 9 8 P 4 B 6 の優先的発現を示す。S T E A P I I を増幅するために、以下のプライマーを用いた：

9 8 P 4 B 6 . 1 5 ' G A C T G A G C T G G A A C T G G A A T T T G T 3 ' (配列番号 2 0)

9 8 P 4 B 6 . 2 5 ' T T T G A G G A G A C T T C A T C T C A C T G G 3 ' (配列番号 2 1)

レーンには以下の通りである：1 脳；2 前立腺、3 L A P C - 4 A D；4 L A P C - 4 A I；5 L A P C - 9 A D；6 H e L a；7 マウス c D N A；8 陰性コントロール。

【図 1 4 B】 前立腺組織における S T E A P - 2 (9 8 P 4 B 6) の優先的発現。一本鎖 c D N A を 8 つの正常な組織、L A P C 異種移植片 (4 A D、4 A I、および 9 A D)、ならびに H e L a 細胞から調製した。アクチンおよび G A P D H に対するプライマーを用いた P C R によって正規化を実施した。半定量的 P C R (9 8 P 4 B 6 に対するプライマーを用いる) は、正常前立腺および L A P C 異種移植片における 9 8 P 4 B 6 の優先的発現を示す。S T E A P I I を増幅するために、以下のプライマーを用いた：

9 8 P 4 B 6 . 1 5 ' G A C T G A G C T G G A A C T G G A A T T T G T 3 ' (配列番号 2 0)

9 8 P 4 B 6 . 2 5 ' T T T G A G G A G A C T T C A T C T C A C T G G 3 ' (配列番号 2 1)

レーンには以下の通りである：1 結腸；2 卵巣；3 白血球；4 前立腺；5 小腸；6 脾臓；7 精巣；8 胸腺。

【図 1 5】 ノーザンプロットによって決定した正常組織および前立腺癌異種移植片における、前立腺特異的 S T E A P - 2 / 9 8 P 4 B 6 の発現。ヒト正常組織フィルター (A および B) を C L O N T E C H から入手し、そして 1 レーンあたり 2 μ g の m R N A を含む。異種移植片フィルター (C) を、1 レーンあたり 1 0 μ g の総 R N A を用いて調製した。プローブとして 9 8 P 4 B 6 クローン由来の S S H を用いてプロットを分析した。全ての R N A サンプルを臭化エリジウム染色によって正規化した。

【図 1 5 A】 ノーザンプロットによって決定した正常組織および前立腺癌異種移植片における、前立腺特異的 S T E A P - 2 / 9 8 P 4 B 6 の発現。ヒト正常組織フィルター (A および B) を C L O N T E C H から入手し、そして 1 レーンあたり 2 μ g の m R N A を含む。異種移植片フィルター (C) を、1 レーンあたり 1 0 μ g の総 R N A を用いて調製した。プローブとして 9 8 P 4 B 6 クローン由来の S S H を用いてプロットを分析した

10

20

30

40

50

。全てのRNAサンプルを臭化エリジウム染色によって正規化した。

レーンは以下の通りである：1 心臓；2 脳；3 胎盤；4 肺；5 肝臓；6 骨格筋；7 腎臓；8 脾臓。

【図15B】 ノーザンブロットによって決定した正常組織および前立腺癌異種移植片における、前立腺特異的STEAP-2/98P4B6の発現。ヒト正常組織フィルター（AおよびB）をCLONTechから入手し、そして1レーンあたり2 μ gのmRNAを含む。異種移植片フィルター（C）を、1レーンあたり10 μ gの総RNAを用いて調製した。プローブとして98P4B6クローン由来のSSHを用いてブロットを分析した。全てのRNAサンプルを臭化エリジウム染色によって正規化した。

レーンは以下の通りである：1 脾臓；2 胸腺；3 前立腺；4 精巣；5 卵巣；6 小腸；7 結腸；8 白血球。

【図15C】 レーンは以下の通りである：1 前立腺；2 LAPC-4 AD；3 LAPC-4 AI；4 LAPC-9 AD；LAPC-9 AI。

【図16】 ノーザンブロット分析によって決定した、前立腺および選択した癌細胞株における、STEAP-2の発現。異種移植片および細胞株フィルターを、1レーンあたり10 μ gの総RNAを用いて調製した。プローブとして98P4B6クローン由来のSSHを用いてブロットを分析した。全てのRNAサンプルを臭化エリジウム染色によって正規化した。レーンは以下の通りである：1 前立腺；2 LAPC-4 AD；3 LAPC-4 AI；4 LAPC-9 AD；LAPC-9 AI；6 TsuPr1；7 DU145；8 LNCaP；9 PC-3；10 LAPC-4 CL；11 PrEC；12 HT1197；13 SCaBER；14 UM-UC-3；15 TCCSUP；16 J82；17 5637；18 RD-ES；19 293T；20 PANC-1；21 BxPC-3；22 HPAC；23 Capan-1；24 LS180；25 SK-CO-1；26 CaCo-2；27 LoVo；28 T84；29 Colo-205；30 BT-20；31 CAMA-1；32 DU4475；33 MCF-7；34 MDA-MB-435s；35 NTERA-2；36 NCCIT；37 TERA-1；38 TERA-2；39 A431；40 HeLa；41 OV-1063；42 PA-1；43 SW626；44 CAO-3。

【図17】 STEAPファミリーメンバーの染色体局在化。本明細書に記載されるSTEAP遺伝子の染色体局在化を、GeneBridge4放射ハイブリッドパネル（Research Genetics, Huntsville AI）を用いて決定した。STEAP-2およびAI139607についてのマッピングを、Stanford G3放射ハイブリッドパネル（Research Genetics, Huntsville AI）を用いて実施した。

【図18】 ヒトSTEAP-1遺伝子のORF内のイントロン-エキソン境界の模式図。全部で3つのイントロン（i）および4つのエキソン（e）を同定した。

【図19】 図19は、種々の種におけるSTEAP-1遺伝子のZooBlotサザン分析を示す。ゲノムDNAを、ヒト、サル、イヌ、マウス、トリおよびショウジョウバエを含むいくつかの異なる生物から調製した。10 μ gの各DNAサンプルを、EcoRIで消化し、ニトロセルロース膜上にブロットし、そしてSTEAP-1プローブでプローブした。サイズ標準は、キロベース（kb）で側方に示す。

【図20】 図20は、STEAP-1プローブでのマウスBACのサザンブロット分析を示す。DNAを、ゲノムDNAを単離するために、ヒト細胞、およびマウスSTEAP遺伝子を含むマウスBACクローン（12P11）から調製した。各DNAサンプルを、EcoRIで消化し、ニトロセルロース膜上にブロットし、そしてプローブした。8 μ gのゲノムDNAを、250 ngのマウスBAC DNAと比較した。レーンは以下である：（1）1 kb ラダー；（2）ヒト雌ゲノム；（3）12P11 BACマウス（mus）；（4）ヒト雌ゲノム；（5）12P11 BACマウス；（6）3T3。

【図21A】 図21Aは、STEAP-1に対するヒツジポリクローナル抗体を使用する免疫組織化学染色であり、膀胱癌標本における細胞周囲（pericellular）

10

20

30

40

50

染色を示す。

【図21B】 図21Bは、STEAP-1に対するヒツジポリクローナル抗体を使用する免疫組織化学染色であり、第二の膀胱癌標本における細胞周囲(pericellular)染色を示す。

【図21C】 図21Cは、STEAP-1に対するヒツジポリクローナル抗体を使用する免疫組織化学染色であり、肺癌標本における細胞周囲(pericellular)染色を示す。

【図21D】 図21Dは、STEAP-1に対するヒツジポリクローナル抗体を使用する免疫組織化学染色であり、第二の肺癌標本における細胞周囲(pericellular)染色を示す。

10

【図22A】 図22Aは、アンチセンスプローブでのRNAインサイチュハイブリダイゼーションによる、正常前立腺におけるSTEAP-2の発現を示す。

【図22B】 図22Bは、コントロールとしてセンスプローブを使用する、RNAインサイチュハイブリダイゼーションによる、正常前立腺におけるSTEAP-2の発現を示す。

【図23A】 図23Aは、アンチセンスプローブでのRNAインサイチュハイブリダイゼーションによる、前立腺癌におけるSTEAP-2の発現を示す。

【図23B】 図23Bは、センスプローブを使用する、RNAインサイチュハイブリダイゼーションについての前立腺癌コントロールにおけるSTEAP-2の発現を示す。

【図24】 図24は、RT-PCRを使用して試験したような種々の癌におけるSTEAP-2の発現を示す。レーン1は、LAPC4 AD異種移植片由来のサンプルを示す；レーン2は、LAPC9 AD異種移植片である；レーン3は、LAPC9 AD²異種移植片である(ヒト骨移植片と増殖した)；レーン4は、LAPC9 AD ITである(脛骨内(intrabially)で増殖した)；レーン5は、結腸癌患者由来の、プールした組織である；レーン6は、肺癌患者由来の、プールした組織である；Mは、マーカーレーンを示す；レーン7は、患者の正常前立腺組織である；レーン8は、患者の前立腺癌組織である；レーン9は、腎癌組織由来の、プールした組織である；レーン10は、膀胱癌患者由来の、プールした組織である；レーン11は、HeLa細胞である；および、レーン12は、水ブランクである。

20

【図25】 図25は、76の正常組織におけるSTEAP-2発現のRNAドットプロット分析を示す。RNA組織供給源：A1 全脳；A2 小脳、左；A3 黒質；A4 心臓；A5 食道；A6 結腸、逆行；A7 腎臓；A8 肺；A9 肝臓；A10 HL60、白血病；A11 胎児脳；B1 大脳皮質；B2 小脳、右；B3 accumbens nucleus；B4 大動脈；B5 胃；B6 結腸、下行；B7 骨格筋；B8 胎盤；B9 脾臓；B10 HeLa、S3；B11 胎児心臓；C1 前頭葉；C2 脳梁；C3 視床；C4 房、左；C5 空腸；C6 直腸；C7 脾臓；C8 膀胱；C9 副腎；C10 K562、白血病；C11 胎児腎臓；D1 頭頂葉；D2 扁桃；D3 下垂体；D4 房、右；D5 空腸；D6 ブランク；D7 胸腺；D8 子宮；D9 甲状腺；D10 MOLT-4、白血病；D11 胎児肝臓；E1 後頭葉；E2 尾状核；E3 脊髄；E4 脳室、左；E5 回腸；E6 ブランク；E7 白血球；E8 前立腺；E9 唾液腺；E10 RAJI、白血病；E11 胎児脾臓；F1 側頭葉；F2 海馬；F3 ブランク；F4 脳室、右；F5 回盲部；F6 ブランク；F7 リンパ節；F8 精巣；F9 乳腺；F10 DAUDI、白血病；F11 胎児胸腺；G1 中心回；G2 延髄；G3 ブランク；G4 心室中隔；G5 虫垂；G6 ブランク；G7 骨髓；G8 卵巣；G9 ブランク；G10 SW480、結腸癌；G11 胎児肺；H1 橋；H2 被殻；H3 ブランク；H4 心尖；H5 結腸、横行；H6 ブランク；H7 気管；H8 ブランク；H9 ブランク；H10 A549、肺癌；H11 ブランク。

30

40

【図26】 図26は、PC3細胞におけるSTEAP-2の発現がp150、p120およびp75を含む種々のタンパク質のチロシン残基へのリン酸化を誘導するために十分

50

であることを示す、抗ホスホチロシン抗体 (4 G 1 0 m A b) でのウエスタンブロットである。抗 G r b 2 A b を使用するオーバーレイは、ゲルが等しくロードされたことを示す。

【図 2 7】 図 2 7 は、ウエスタンブロットを示す。図 2 7 A は、P C 3 細胞における S T E A P - 1 および S T E A P - 2 の発現が P C 3 - n e o と比較して p 3 8 キナーゼを活性化することを示す、抗リン酸化 p 3 8 を使用したウエスタンブロットである。p 3 8 アクチベーターであることが既知の T N F - N a S a I および N a S a I は、ポジティブコントロールとして働く。図 2 7 B は、図 2 7 A におけるように、ゲル上を等量のタンパク質がロードすることを抗 p 3 8 を使用して示すウエスタンブロットである。

【図 2 8】 図 2 8 は、ウエスタンブロットを示す。図 2 8 A は、1 % F B S 中の E R K 経路の活性化を試験するための、抗リン酸化 E R K を使用したウエスタンブロットである。R a s を発現する P C 3 細胞 (ポジティブコントロール)、S T E A P - 1、S T E A P - 2、または n e o (ネガティブコントロール) を、1 % F B S 中で増殖した。これらの結果は、n e o コントロール遺伝子の発現は E R K リン酸化に効果がないが、S T E A P - 1 および S T E A P - 2 の発現は E R K リン酸化を誘導することを示す。抗 E R K 抗体を使用して、全てのレーンにおいて E R K の存在を確認した。図 2 8 B は、0 . 1 % F B S および 1 0 % F B S 中の E R K 経路の活性化を試験するための、抗リン酸化 E R K を使用したウエスタンブロットである。S T E A P - 1 または n e o (ネガティブコントロール) を発現する P C 3 細胞を、0 . 1 % F B S または 1 0 % F B S のいずれかにおいて増殖した。これらの結果は、S T E A P - 1 の発現が E R K シグナル伝達カスケードの活性化を誘導するために十分であることを確認する。

【図 2 9】 図 2 9 は、臭気物質 (o d o r a n t) によって媒介される P C 3 - S T E A P - 1 細胞におけるシグナル伝達を示す。図 2 9 A は、n e o を安定に発現する P C 3 細胞の抗ホスホチロシンウエスタンブロットを示し、この細胞は、0 . 1 % F B S 中で一晩増殖させ、レセプターの保有を可能にし、次いで、シトラルバ (c i t r a l v a)、エチルバニリンまたは I B M P で処理した。1 0 % F B S での処理は、コントロールとして使用した。図 2 9 B は、図 2 9 A について記載したように処理した、S T E A P - 1 を安定に発現する P C 3 細胞の抗ホスホチロシンウエスタンブロットを示す。これらの結果は、シトラルバ (c i t r a l v a) およびエチルバニリンが、P C 3 - S T E A P - 1 細胞において p 1 3 6 ~ 1 4 0 のリン酸化を特異的に誘導することを示す。さらに、シトラルバは、デノボでの 1 6 0 ~ 2 0 0 k D a でのタンパク質のリン酸化を誘導する。

【図 3 0】 図 3 0 は、臭気物質による E R K カスケードの活性化を示す。n e o または S T E A P - 1 のいずれかを安定に発現する P C 3 細胞の抗 E R K ウエスタンブロットであり、この細胞は、0 . 1 % F B S 中で一晩増殖させた。次いで、細胞を、シトラルバで 5 分間処理した。1 0 % F B S での処理は、コントロールとして使用した。全細胞溶解物を、抗リン酸化 E R K を使用して分析した。これらの結果は、シトラルバが E R K をリン酸化し、これによって S T E A P - 1 特異的様式で E R K 経路を活性化することを示す。

【図 3 1】 図 3 1 は、抗 S T E A P - 1 免疫組織化学分析を示す。図 3 1 A は、L A P C - 9 正常位 (o r t h o t o p i c) の前立腺癌腫瘍 (2 0 0 倍の倍率) である。S T E A P - 1 を発現する細胞は、核周囲の染色を示す。図 3 1 B は、L A P C - 9 リンパ節転移巣 (4 0 0 倍の倍率) である。S T E A P - 1 を発現する細胞は、核周囲の染色を示す。図 3 1 C ~ D は、L A P C - 9 肺転移巣 (8 0 0 倍の倍率) である。S T E A P - 1 を発現する細胞は、核周囲の染色を示す。図 3 1 E ~ F は、L A P C - 9 前立腺癌の微小転移巣 (8 0 0 倍の倍率) である。P S A を発現する細胞は、核周囲の染色を示す。

【図 3 2】 図 3 2 は、ヒト患者のリンパ節転移巣 (図 3 2 A)、および骨転移巣 (図 3 2 B) における強度の核周囲染色を示す、S T E A P - 1 の免疫組織化学検出である。

【図 3 3】 図 3 3 は、操作された細胞株における S T E A P - 1 タンパク質、および L N C a P 細胞における内因性 S T E A P - 1 タンパク質を抗 S T E A P - 1 マウス p A b が認識することを示すウエスタンブロットである。p c D N A 3 . 1 M Y C / H I S タグ

10

20

30

40

50

化 S T E A P - 1、または n e o 空ベクターのいずれかでトランスフェクトされた L N C a P 細胞および 2 9 3 T 細胞、ならびに S T E A P - 1 または n e o コントロール遺伝子を発現するように操作された R A T 1 細胞の溶解物を、S D S - P A G E によって分離し、そしてニトロセルロースに転写した。次いで、これらのプロットを、G S T - S T E A P - 1 融合タンパク質で免疫したマウス由来の血清の 1 : 1 0 0 0 希釈を使用した抗 S T E A P ウェスタンブロット分析に供した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> UroGenesys, Inc.

<120> NOVEL SERPENTINE TRANSMEMBRANE ANTIGENS
EXPRESSED IN HUMAN CANCERS AND USES THEREOF

10

<130> 129.17WO11

<150> 09/455,486

<151> 1999-12-06

<160> 47

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1130

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (64)...(1083)

<400> 1

| | |
|---|-----|
| atggaaagca gaaaagacat cacaacccaa gaagaacttt ggaaaatgaa gcctaggaga | 60 |
| aat tta gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc | 108 |
| Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser | |
| 1 5 10 15 | |
| atg cta aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct | 156 |
| Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala | |
| 20 25 30 | |
| gat gaa ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt | 204 |
| Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe | |
| 35 40 45 | |
| cca cag tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg | 252 |
| Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu | |
| 50 55 60 | |
| act ttt ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac cct tta gca act | 300 |
| Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr | |
| 65 70 75 | |
| tcc cat caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa | 348 |
| Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys | |
| 80 85 90 95 | |
| gtc ttg cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca | 396 |
| Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro | |
| 100 105 110 | |
| ggg gtg ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag | 444 |
| Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys | |
| 115 120 125 | |
| aag ttt cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt | 492 |
| Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe | |
| 130 135 140 | |

30

40


```

ggg ctt ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg 540
Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu
145 150 155

tct tac cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca 588
Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala
160 165 170 175

tat caa cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat 636
Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp
180 185 190

gtt tgg aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca 684
Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala
195 200 205

ata ctg gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct 732
Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser
210 215 220

ttg aca tgg aga gaa ttt cac tat att cag agc aag cta gga att gtt 780
Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys Leu Gly Ile Val
225 230 235

tcc ctt cta ctg ggc aca ata cac gca ttg att ttt gcc tgg aat aag 828
Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe Ala Trp Asn Lys
240 245 250 255

tgg ata gat ata aaa caa ttt gta tgg tat aca cct cca act ttt atg 876
Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Met
260 265 270

ata gct gtt ttc ctt cca att gtt gtc ctg ata ttt aaa agc ata cta 924
Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe Lys Ser Ile Leu
275 280 285

ttc ctg cca tgc ttg agg aag aag ata ctg aag att aga cat ggt tgg 972
Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile Arg His Gly Trp
290 295 300

gaa gac gtc acc aaa att aac aaa act gag ata tgt tcc cag ttg tag 1020
Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys Ser Gln Leu *
305 310 315

aat tac tgt tta cac aca ttt ttg ttc aat att gat ata ttt tat cac 1068
Asn Tyr Cys Leu His Thr Phe Leu Phe Asn Ile Asp Ile Phe Tyr His
320 325 330

caa cat ttc aag ttt gtatttgta ataaaaatgat tattcaagga aaaaaaaaaa 1123
Gln His Phe Lys Phe
335

aaaaaaa 1130

<210> 2
<211> 339
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 2
Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met
1 5 10 15
Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp

```

10

20

30

20 25 30
 Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro
 35 40 45
 Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser
 65 70 75 80
 His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val
 85 90 95
 Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly
 100 105 110
 Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys
 115 120 125
 Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly
 130 135 140
 Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser
 145 150 155 160
 Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr
 165 170 175
 Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val
 180 185 190
 Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile
 195 200 205
 Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu
 210 215 220
 Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys Leu Gly Ile Val Ser
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe Ala Trp Asn Lys Trp
 245 250 255
 Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Met Ile
 260 265 270
 Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe Lys Ser Ile Leu Phe
 275 280 285
 Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile Arg His Gly Trp Glu
 290 295 300
 Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys Ser Gln Leu Asn Tyr
 305 310 315 320
 Cys Leu His Thr Phe Leu Phe Asn Ile Asp Ile Phe Tyr His Gln His
 325 330 335
 Phe Lys Phe

10

20

<210> 3
 <211> 111
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<400> 3
 ggcggaggcg gagggcgagg gcgaggggagc gggagcgccg cctggagcgc ggcaggtcat 60
 attgaacatt ccagataacct atcattactc gatgctgttg ataacagcaa g 111

30

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4
 actttgttga tgaccaggat tgga 24

<210> 5
 <211> 24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
cagaacttca gcacacacag gaac

24

<210> 6
<211> 3627
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 6
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcgaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aattaatgga aagcagaaaa gacatcacaa 120
accaagaaga actttggaaa atgaagccta ggagaaattt agaagaagac gattatttgc 180
ataaggacac gggagagacc agcatgctaa aaagacctgt gcttttgcct ttgcacacaa 240
cagcccatgc tgatgaattt gactgcccct cagaacttca gcacacacag gaactctttc 300
cacagtggca cttgccaatt aaaatagctg ctattatagc atctctgact tttctttaca 360
ctctctcgag ggaagtaatt caccctctag caacttccca tcaacaatat ttttataaaa 420
ttccaatcct ggcatcaaac aaagtcttgc caatgggttc catcactctc ttggcattgg 480
tttacctgcc aggtgtgata gcagcaattg tccaacttca taatggaacc aagtataaga 540
agtttcacac ttggttggtat aagtggatgt taacaagaaa gcagtttggg cttctcagtt 600
tcttttttgc tgtactgcat gcaatttata gtctgtctta cccaatgagg cgatcctaca 660
gatacaagtt gctaaactgg gcatacaaac aggtccaaca aaataaagaa gatgcctgga 720
ttgagcatga ttgttgagga atggagattt atgtgtctct ggggaattgt ggattggcaa 780
tactggctct gttggctgtg acatctatct catctgtgag tgactctttg acatggagag 840
aatcttacta tattcaggta aataatataa aaataaacc taagaggtaa atcttctttt 900
tgtgtttatg atatagaata tgttgacttt accccataaa aaataacaaa tgtttttcaa 960
cagcaaaagat cttatacttg ttccaattaa taatgtgtct tctgttgttt tttccctattg 1020
cttctaatta ggacaagtgt ttcttagaca taaataaaa gcattaaaat attctttgtt 1080
tttttttttt tgtttgtttg tttttgtttt gtttgtttgt ttttttgaga tgaagtctcg 1140
ctctgttgcc catgctggag tacagtggca cgatctcgcc tcaactgcaac ctgcgcctcc 1200
tgggttcagg cgattctctt gcctcagcct cctgagtagc tgggattaca ggcacccatc 1260
accatgtcca gctaattttt gtatttttag tagagacagg gttttcccat gttggccagg 1320
ctgggtctga tctcctgacc tcaaatgatc cgcacacctc ggcttcccaa agtgctggga 1380
tgacagttgt gagccaccac actcagcctg ctctttctaa tatttgaaac ttgttagaca 1440
atgtgttacc catctaattg gatatttttag gaatccaata tgcatgggtt attatttctt 1500
aaaaaaaaa ttcttttacc tgtcacctga atttagtaat gccttttatg ttacacaaat 1560
tagcactttc cagaacacaa aactctctcc ttgaaataat agagttttta tctaccaaaag 1620
atargctagt gtctcatttc aaaggctgtc ttttccagct tacattttat atacttaact 1680
acttgaagtt tctaaatatt cttgtaatct taaaactatc tcagatttac tgagggttat 1740
cttctgggtg tagattatcc ataagaagag tgatgtgcca gaatcactct gggatccttg 1800
tctgacaaga ttcaaaggac taaattttaa tcagtcatga acactgcaa ttaccgttta 1860
tgggttagaca tctttggaaa tttccacaag gtcagacatt cgcactatc ccttctacat 1920
gtccacacgt atactccaac actttattag gcactctgatt agtttggaat gtatgcctcc 1980
atctgaatta gtccagtgtg gcttagagtt ggtacaacat tctcacagaa tttcctaatt 2040
ttgttaggtt agcctgataa ccactggagt tctttgggtc tcattaaata gctttcttca 2100
cacattgctc tgctgtttac acatatgatg aacactgctt tttagacttc attaggaatt 2160
taggactgca tcttgacaac tgagcctatt ctactatatg tacaatacct agcccataat 2220
agggtataca tacacatttg gtaaaactaa ttttcaacca atgacatgta tttttcaact 2280
agtaacctag aaatgtttca cttaaaatct gagaactggg tacactacaa gttaccttgg 2340
agattcatat atgaaaacgc aaacttagct atttgattgt attcactggg acttaagaat 2400
gcgcctgaat aattgtgagt tctgatttgt ctggcaggct aatgaccatt tccagtaaaag 2460
tgaatagagg tcagaagtgc tataaaagag gtgtgtcag aacaccgttg agattacata 2520
ggtgaacaac tatttttaag caactttatt tgtgtagtga caaagcatcc caatgcaggc 2580
tgaaatgttt catcacatct ctggatctct ctattttgtg cagacattga aaaaattggt 2640
catattatct ccatgttatc agaataattg atttttttaa aacataggcc aagttcattc 2700
acttcattat tcatttatca aaatcagagt gaatcacatt agtcgccttc acaactgata 2760
aagatcactg aagtcaaat gatttttgcct ataactctca atctacctat atttaattga 2820
gaatctaaaa tgtacaaact attgtgttga ttctgcagtg atcctgctat aagtaagact 2880
cagtccttga ttttaggtat cctgtgaaaa gcagaattaa gacaaatata caagagacaa 2940

10

20

30

```

agcacaaaaa ataaatatca taaggggatg aacaaaatgg tggagaaaga gtagacaaag 3000
tttttgatca cctgccttca aagaaaggct gtgaattttg ttcacttaga cagcttggag 3060
acaagaaatt acccaaaagt aagggtgagga ggataggcaa aaagagcaga aagatgtgaa 3120
tggacattgt tgagaaatgt gataggaaaa caatcataga taaaggattt ccaagcaaca 3180
gagcatatcc agatgaggta ggatgggata aactcttatt gaaccaatct tcaccaattt 3240
tggttttctt ttgcagagca agctaggaaat tgtttcctt ctactgggca caatacacgc 3300
attgattttt gcctggaata agtggataga tataaaacaa ttigtatggc atacacctcc 3360
aactttttat atagctgttt tccttccaat tggtgtcctg atatttaaaa gcatactatt 3420
cctgccatgc ttgaggaaga agatactgaa gattagacat gggtgggaag acgtcaccac 3480
aattaacaaa actgagatat gttcccagtt gtagaattac tgtttacaca catttttgtt 3540
caatattgat atattttatc accaacattt caagtttgta ttgtttaata aaatgattat 3600
tcaaggaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 3627

```

```

<210> 7
<211> 2099
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

```

10

```

<220>
<221> CDS
<222> (355)...(1719)

```

```

<400> 7
atggaatcaa tctctatgat ggaagccct aagagcctta gtgaaacttg ttacctaata 60
ggcataaatg gtatcaaaga tgaaggaag gtcactgtag gtgtgattgg aagtgagat 120
tttgccaaat ccttgaccat tcgacttatt agatgaggct atcatgtggt catagggaag 180
agaatccta agtttgcttc tgaattttt cctcatgtgg tagatgtcac tcatcatgaa 240
gatgctctca caaaaacaaa tataatattt gttgctatac acagagaaca ttatacctcc 300
ctgtgggacc tgagacatct gcttgtgggt aaaatcctga ttgatgtgag caat aac 357
                                     Asn
                                     1

```

```

atg agg ata aac cag tac cca gaa tcc aat gct gaa tat ttg gct tca 405
Met Arg Ile Asn Gln Tyr Pro Glu Ser Asn Ala Glu Tyr Leu Ala Ser
                    5                      10                      15

```

20

```

tta ttc cca gat tct ttg att gtc aaa gga ttt aat gtt gtc tca gct 453
Leu Phe Pro Asp Ser Leu Ile Val Lys Gly Phe Asn Val Val Ser Ala
                    20                      25                      30

```

```

tgg gca ctt cag tta gga cct aag gat gcc agc cgg cag gtt tat ata 501
Trp Ala Leu Gln Leu Gly Pro Lys Asp Ala Ser Arg Gln Val Tyr Ile
                    35                      40                      45

```

```

tgc agc aac aat att caa gcg cga caa cag gtt att gaa ctt gcc cgc 549
Cys Ser Asn Asn Ile Gln Ala Arg Gln Gln Val Ile Glu Leu Ala Arg
                    50                      55                      60                      65

```

```

cag ttg aat ttc att ccc att gac ttg gga tcc tta tca tca gcc aga 597
Gln Leu Asn Phe Ile Pro Ile Asp Leu Gly Ser Leu Ser Ser Ala Arg
                    70                      75                      80

```

30

```

gag att gaa aat tta ccc cta cga ctc ttt act ctc tgg aga ggg cca 645
Glu Ile Glu Asn Leu Pro Leu Arg Leu Phe Thr Leu Trp Arg Gly Pro
                    85                      90                      95

```

```

gtg gtg gta gct ata agc ttg gcc aca ttt ttt ttc ctt tat tcc ttt 693
Val Val Val Ala Ile Ser Leu Ala Thr Phe Phe Phe Leu Tyr Ser Phe
                    100                      105                      110

```

```

gtc aga gat gtg att cat cca tat gct aga aac caa cag agt gac ttt 741
Val Arg Asp Val Ile His Pro Tyr Ala Arg Asn Gln Gln Ser Asp Phe
                    115                      120                      125

```

| | |
|---|------|
| tac aaa att cct ata gag att gtg aat aaa acc tta cct ata gtt gcc Tyr Lys Ile Pro Ile Glu Ile Val Asn Lys Thr Leu Pro Ile Val Ala 130 135 140 145 | 789 |
| att act ttg ctc tcc cta gta tac ctt gca ggt ctt ctg gca gct gct Ile Thr Leu Leu Ser Leu Val Tyr Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ala Ala 150 155 160 | 837 |
| tat caa ctt tat tac ggc acc aag tat agg aga ttt cca cct tgg ttg Tyr Gln Leu Tyr Tyr Gly Thr Lys Tyr Arg Arg Phe Pro Pro Trp Leu 165 170 175 | 885 |
| gaa acc tgg tta cag tgt aga aaa cag ctt gga tta cta agt ttt ttc Glu Thr Trp Leu Gln Cys Arg Lys Gln Leu Gly Leu Leu Ser Phe Phe 180 185 190 | 933 |
| ttc gct atg gtc cat gtt gcc tac agc ctc tgc tta ccg atg aga agg Phe Ala Met Val His Val Ala Tyr Ser Leu Cys Leu Pro Met Arg Arg 195 200 205 | 981 |
| tca gag aga tat ttg ttt ctc aac atg gct tat cag cag gtt cat gca Ser Glu Arg Tyr Leu Phe Leu Asn Met Ala Tyr Gln Gln Val His Ala 210 215 220 225 | 1029 |
| aat att gaa aac tct tgg aat gag gaa gaa gtt tgg aga att gaa atg Asn Ile Glu Asn Ser Trp Asn Glu Glu Val Trp Arg Ile Glu Met 230 235 240 | 1077 |
| tat atc tcc ttt ggc ata atg agc ctt ggc tta ctt tcc ctc ctg gca Tyr Ile Ser Phe Gly Ile Met Ser Leu Gly Leu Leu Ser Leu Leu Ala 245 250 255 | 1125 |
| gtc act tct atc cct tca gtg agc aat gct tta aac tgg aga gaa ttc Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala Leu Asn Trp Arg Glu Phe 260 265 270 | 1173 |
| agt ttt att cag tct aca ctt gga tat gtc gct ctg ctc ata agt act Ser Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val Ala Leu Leu Ile Ser Thr 275 280 285 | 1221 |
| ttc cat gtt tta att tat gga tgg aaa cga gct ttt gag gaa gag tac Phe His Val Leu Ile Tyr Gly Trp Lys Arg Ala Phe Glu Glu Glu Tyr 290 295 300 305 | 1269 |
| tac aga ttt tat aca cca cca aac ttt gtt ctt gct ctt gtt ttg ccc Tyr Arg Phe Tyr Thr Pro Pro Asn Phe Val Leu Ala Leu Val Leu Pro 310 315 320 | 1317 |
| tca att gta att ctg gat ctt ttg cag ctt tgc aga tac cca gac tga Ser Ile Val Ile Leu Asp Leu Leu Gln Leu Cys Arg Tyr Pro Asp * 325 330 335 | 1365 |
| gct gga act gga att tgt ctt cct att gac tct act tct tta aaa gcg Ala Gly Thr Gly Ile Cys Leu Pro Ile Asp Ser Thr Ser Leu Lys Ala 340 345 350 | 1413 |
| gct gcc cat tac att cct cag ctg tcc ttg cag tta ggt gta cat gtg Ala Ala His Tyr Ile Pro Gln Leu Ser Leu Gln Leu Gly Val His Val 355 360 365 | 1461 |
| act gag tgt tgg cca gtg aga tga agt ctc ctc aaa gga agg cag cat Thr Glu Cys Trp Pro Val Arg * Ser Leu Leu Lys Gly Arg Gln His 370 375 380 | 1509 |

10

20

30

gtg tcc ttt ttc atc cct tca tct tgc tgc tgg gat tgt gga tat aac 1557
Val Ser Phe Phe Ile Pro Ser Ser Cys Cys Trp Asp Cys Gly Tyr Asn
385 390 395

agg agc cct ggc agc tgt ctc cag agg atc aaa gcc aca ccc aaa gag 1605
Arg Ser Pro Gly Ser Cys Leu Gln Arg Ile Lys Ala Thr Pro Lys Glu
400 405 410 415

taa ggc aga tta gag acc aga aag acc ttg act act tcc cta ctt cca 1653
* Gly Arg Leu Glu Thr Arg Lys Thr Leu Thr Thr Ser Leu Leu Pro
420 425 430

ctg ctt ttc ctg cat tta agc cat tgt aaa tct ggg tgt gtt aca tga 1701
Leu Leu Phe Leu His Leu Ser His Cys Lys Ser Gly Cys Val Thr *
435 440 445

agt gaa aat taa ttc ttt ctgcccttca gttctttatc ctgataccat 1749
Ser Glu Asn * Phe Phe
450

ttaacactgt ctgaattaac tagactgcaa taattctttc ttttgaaagc ttttaaagga 1809
taatgtgcaa ttcacattaa aattgatttt ccattgtcaa ttagttatata tcatttttct 1869
gccttgatct ttcattagat attttgatc tgcttggaat atattatctt ctttttaact 1929
gtgtaattgg taattactaa aactctgtaa tctccaaaat attgctatca aattacacac 1989
catgttttct atcatttcta tagatctgcc ttataaacat ttaaataaaa agtactattt 2049
aatgatttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2099

<210> 8
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 8
Asn Met Arg Ile Asn Gln Tyr Pro Glu Ser Asn Ala Glu Tyr Leu Ala 20
1 5 10 15
Ser Leu Phe Pro Asp Ser Leu Ile Val Lys Gly Phe Asn Val Val Ser
20 25 30
Ala Trp Ala Leu Gln Leu Gly Pro Lys Asp Ala Ser Arg Gln Val Tyr
35 40 45
Ile Cys Ser Asn Asn Ile Gln Ala Arg Gln Gln Val Ile Glu Leu Ala
50 55 60
Arg Gln Leu Asn Phe Ile Pro Ile Asp Leu Gly Ser Leu Ser Ser Ala
65 70 75 80
Arg Glu Ile Glu Asn Leu Pro Leu Arg Leu Phe Thr Leu Trp Arg Gly
85 90 95
Pro Val Val Val Ala Ile Ser Leu Ala Thr Phe Phe Phe Leu Tyr Ser
100 105 110
Phe Val Arg Asp Val Ile His Pro Tyr Ala Arg Asn Gln Gln Ser Asp
115 120 125
Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Glu Ile Val Asn Lys Thr Leu Pro Ile Val
130 135 140
Ala Ile Thr Leu Leu Ser Leu Val Tyr Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ala
145 150 155 160
Ala Tyr Gln Leu Tyr Tyr Gly Thr Lys Tyr Arg Arg Phe Pro Pro Trp
165 170 175
Leu Glu Thr Trp Leu Gln Cys Arg Lys Gln Leu Gly Leu Leu Ser Phe
180 185 190
Phe Phe Ala Met Val His Val Ala Tyr Ser Leu Cys Leu Pro Met Arg
195 200 205
Arg Ser Glu Arg Tyr Leu Phe Leu Asn Met Ala Tyr Gln Gln Val His
210 215 220
Ala Asn Ile Glu Asn Ser Trp Asn Glu Glu Glu Val Trp Arg Ile Glu
225 230 235 240
Met Tyr Ile Ser Phe Gly Ile Met Ser Leu Gly Leu Leu Ser Leu Leu

10

20

30

245 250 255
 Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala Leu Asn Trp Arg Glu
 260 265 270
 Phe Ser Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val Ala Leu Leu Ile Ser
 275 280 285
 Thr Phe His Val Leu Ile Tyr Gly Trp Lys Arg Ala Phe Glu Glu Glu
 290 295 300
 Tyr Tyr Arg Phe Tyr Thr Pro Pro Asn Phe Val Leu Ala Leu Val Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Ile Val Ile Leu Asp Leu Leu Gln Leu Cys Arg Tyr Pro Asp
 325 330 335
 Ala Gly Thr Gly Ile Cys Leu Pro Ile Asp Ser Thr Ser Leu Lys Ala
 340 345 350
 Ala Ala His Tyr Ile Pro Gln Leu Ser Leu Gln Leu Gly Val His Val
 355 360 365
 Thr Glu Cys Trp Pro Val Arg Ser Leu Leu Lys Gly Arg Gln His Val
 370 375 380
 Ser Phe Phe Ile Pro Ser Ser Cys Cys Trp Asp Cys Gly Tyr Asn Arg
 385 390 395 400
 Ser Pro Gly Ser Cys Leu Gln Arg Ile Lys Ala Thr Pro Lys Glu Gly
 405 410 415
 Arg Leu Glu Thr Arg Lys Thr Leu Thr Thr Ser Leu Leu Pro Leu Leu
 420 425 430
 Phe Leu His Leu Ser His Cys Lys Ser Gly Cys Val Thr Ser Glu Asn
 435 440 445
 Phe Phe
 450

<210> 9
 <211> 4419
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (85)...(1464)

<400> 9
 cgaaacttcc ctctaccgcg ccggcccgcg gcgcgcaccg ttggcgctgg acgcttcttc 60
 cttggaagcg cctctccctc agtt atg gag aaa act tgt ata gat gca ctt 111
 Met Glu Lys Thr Cys Ile Asp Ala Leu
 1 5

 cct ctt act atg aat tct tca gaa aag caa gag act gta tgt att ttt 159
 Pro Leu Thr Met Asn Ser Ser Glu Lys Gln Glu Thr Val Cys Ile Phe
 10 15 20 25

 gga act ggt gat ttt gga aga tca ctg gga ttg aaa atg ctc cag tgt 207
 Gly Thr Gly Asp Phe Gly Arg Ser Leu Gly Leu Lys Met Leu Gln Cys
 30 35 40

 ggt tat tct gtt gtt ttt gga agt cga aac ccc cag aag acc acc cta 255
 Gly Tyr Ser Val Val Phe Gly Ser Arg Asn Pro Gln Lys Thr Thr Leu
 45 50 55

 ctg ccc agt ggt gca gaa gtc ttg agc tat tca gaa gca gcc aag aag 303
 Leu Pro Ser Gly Ala Glu Val Leu Ser Tyr Ser Glu Ala Ala Lys Lys
 60 65 70

 tct ggc atc ata atc ata gca atc cac aga gag cat tat gat ttt ctc 351
 Ser Gly Ile Ile Ile Ile Ala Ile His Arg Glu His Tyr Asp Phe Leu
 75 80 85

 aca gaa tta act gag gtt ctc aat gga aaa ata ttg gta gac atc agc 399

10

20

30

Thr Glu Leu Thr Glu Val Leu Asn Gly Lys Ile Leu Val Asp Ile Ser
 90 95 100 105
 aac aac ctc aaa atc aat caa tat cca gaa tct aat gca gag tac ctt 447
 Asn Asn Leu Lys Ile Asn Gln Tyr Pro Glu Ser Asn Ala Glu Tyr Leu
 110 115 120
 gct cat ttg gtg cca gga gcc cac gtg gta aaa gca ttt aac acc atc 495
 Ala His Leu Val Pro Gly Ala His Val Val Lys Ala Phe Asn Thr Ile
 125 130 135
 tca gcc tgg gct ctc cag tca gga gca ctg gat gca agt cgg cag gtg 543
 Ser Ala Trp Ala Leu Gln Ser Gly Ala Leu Asp Ala Ser Arg Gln Val
 140 145 150
 ttt gtg tgt gga aat gac agc aaa gcc aag caa aga gtg atg gat att 591
 Phe Val Cys Gly Asn Asp Ser Lys Ala Lys Gln Arg Val Met Asp Ile
 155 160 165
 gtt cgt aat ctt gga ctt act cca atg gat caa gga tca ctc atg gca 639
 Val Arg Asn Leu Gly Leu Thr Pro Met Asp Gln Gly Ser Leu Met Ala
 170 175 180 185
 gcc aaa gaa att gaa aag tac ccc ctg cag cta ttt cca atg tgg agg 687
 Ala Lys Glu Ile Glu Lys Tyr Pro Leu Gln Leu Phe Pro Met Trp Arg
 190 195 200
 ttc ccc ttc tat ttg tct gct gtg ctg tgt gtc ttc ttg ttt ttc tat 735
 Phe Pro Phe Tyr Leu Ser Ala Val Leu Cys Val Phe Leu Phe Phe Tyr
 205 210 215
 tgt gtt ata aga gac gta atc tac cct tat gtt tat gaa aag aaa gat 783
 Cys Val Ile Arg Asp Val Ile Tyr Pro Tyr Val Tyr Glu Lys Lys Asp
 220 225 230
 aat aca ttt cgt atg gct att tcc att cca aat cgt atc ttt cca ata 831
 Asn Thr Phe Arg Met Ala Ile Ser Ile Pro Asn Arg Ile Phe Pro Ile
 235 240 245
 aca gca ctt aca ctg ctt gct ttg gtt tac ctc cct ggt gtt att gct 879
 Thr Ala Leu Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala
 250 255 260 265
 gcc att cta caa ctg tac cga ggc aca aaa tac cgt cga ttc cca gac 927
 Ala Ile Leu Gln Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Tyr Arg Arg Phe Pro Asp
 270 275 280
 tgg ctt gac cac tgg atg ctt tgc cga aag cag ctt ggc ttg gta gct 975
 Trp Leu Asp His Trp Met Leu Cys Arg Lys Gln Leu Gly Leu Val Ala
 285 290 295
 ctg gga ttt gcc ttc ctt cat gtc ctc tac aca ctt gtg att cct att 1023
 Leu Gly Phe Ala Phe Leu His Val Leu Tyr Thr Leu Val Ile Pro Ile
 300 305 310
 cga tat tat gta cga tgg aga ttg gga aac tta acc gtt acc cag gca 1071
 Arg Tyr Tyr Val Arg Trp Arg Leu Gly Asn Leu Thr Val Thr Gln Ala
 315 320 325
 ata ctc aag aag gag aat cca ttt agc acc tcc tca gcc tgg ctc agt 1119
 Ile Leu Lys Lys Glu Asn Pro Phe Ser Thr Ser Ser Ala Trp Leu Ser
 330 335 340 345
 gat tca tat gtg gct ttg gga ata ctt ggg ttt ttt ctg ttt gta ctc 1167

10

20

30

| | |
|--|------|
| Asp Ser Tyr Val Ala Leu Gly Ile Leu Gly Phe Phe Leu Phe Val Leu | |
| 350 355 360 | |
| ttg gga atc act tct ttg cca tct gtt agc aat gca gtc aac tgg aga | 1215 |
| Leu Gly Ile Thr Ser Leu Pro Ser Val Ser Asn Ala Val Asn Trp Arg | |
| 365 370 375 | |
| gag ttc cga ttt gtc cag tcc aaa ctg ggt tat ttg acc ctg atc ttg | 1263 |
| Glu Phe Arg Phe Val Gln Ser Lys Leu Gly Tyr Leu Thr Leu Ile Leu | |
| 380 385 390 | |
| tgt aca gcc cac acc ctg gtg tac ggt ggg aag aga ttc ctc agc cct | 1311 |
| Cys Thr Ala His Thr Leu Val Tyr Gly Gly Lys Arg Phe Leu Ser Pro | |
| 395 400 405 | |
| tca aat ctc aga tgg tat ctt cct gca gcc tac gtg tta ggg ctt atc | 1359 |
| Ser Asn Leu Arg Trp Tyr Leu Pro Ala Ala Tyr Val Leu Gly Leu Ile | |
| 410 415 420 425 | |
| att cct tgc aca tca agt ttg tcc taa tca tgc cat gtg tag aca aca | 1407 |
| Ile Pro Cys Thr Ser Ser Leu Ser * Ser Cys His Val * Thr Thr | |
| 430 435 | |
| ccc tta caa gga tcc gcc agg gct ggg aaa gga act caa aac act aga | 1455 |
| Pro Leu Gln Gly Ser Ala Arg Ala Gly Lys Gly Thr Gln Asn Thr Arg | |
| 440 445 450 455 | |
| aaa agc att gaatggaaaa tcaatatatta aaacaaagtt caatttagct | 1504 |
| Lys Ser Ile | |
| | |
| ggatttctga actatgggttt tgaatgttta aagaagaatg atgggtacag ttaggaaagt | 1564 |
| ttttttctta caccgtgact gagggaaaca ttgcttctct ttgagaaatt gactgacata | 1624 |
| ctggaagaga acaccatttt atctcagggt agtgaagaat cagtgcaggt ccttgactct | 1684 |
| tattttccca gagggccatgg agctgagatt gagactagcc ttgtgggttc acactaaaga | 1744 |
| gtttccctgt tatgggcaac atgcatgacc taatgtcttg caaaatccaa tagaagtatt | 1804 |
| gcagcttctt tctctggctc aagggctgag ttaagtgaag ggaaaaacag cacaatgggtg | 1864 |
| accactgata aaggctttat taggtatatc tgaggaagtg ggtcacatga aatgtaaaaa | 1924 |
| gggaatgagg tttttgttgt tttttggaag taaaggcaaa cataaatatt accatgatga | 1984 |
| attctagtga aatgacccct tgactttgct ttcttaata cagatatatta ctgagaggaa | 2044 |
| ctatttttat aacacaagaa aaatttacaa ttgattaaaa gtatccatgt cttggataca | 2104 |
| tacgtatcta tagagctggc atgtaattct tcctctataa agaataggtg taggaaagac | 2164 |
| tgaataaaaa tggagggata tccccttggg ttctacttgc attgtgcaat aagcaaaaga | 2224 |
| gggttgataa aagttcttga tcaaaaagtt caaagaaacc agaatttttag acagcaagct | 2284 |
| aaataaatat tgtaaaattg cactatatta ggtaaggtat tatttaggta ttataaatatg | 2344 |
| ccttgtaaat tttatattcc aaatattgct caatattttt catctattaa attaatttct | 2404 |
| agtgtaaata agtagcttct atatctgtct tagtctatta taattgtaag gagtaaaatt | 2464 |
| aaatgaatag tctgcaggta taaatttgaa caatgcatag atgatcgaaa attacggaaa | 2524 |
| atcatagggc agagaggtgt gaagattcat cattatgtga aatttggatc tttctcaaat | 2584 |
| ccttgctgaa atttaggatg gttctcactg tttttctgtg ctgatagtac cctttccaag | 2644 |
| gtgaccttca gggggattaa ccttcctagc tcaagcaatg agctaaaagg agccttatgc | 2704 |
| atgatcttcc cacatatcaa aataactaaa aggcactgag ttgggcatct tttgccttgc | 2764 |
| tctgctaaga cctttttttt ttttttactt tcattataac atattataca tgacattata | 2824 |
| caaaaatgat taaaatatat taaaacaaca tcaacaatcc aggatatttt tctataaaac | 2884 |
| tttttaaaaa taattgtatc tatatatcca attttacatc ctttttcaaa ggctttgttt | 2944 |
| ttctaagggc ttgtttttcc tttttattat ttttttcttt tttatttttt tgagacagtc | 3004 |
| ttgctctgtc gctcaggctg gagtgcagtg gcacgatctc agctcactgc aacctctctc | 3064 |
| tcccagggtc aagtgattct tgttcacag cctcccgagt agctgggact acaggcatgt | 3124 |
| gccactatgc ccagctaatt ttgtacttt tagtagagac aggggtttcac cacattggtc | 3184 |
| aggctgggtc tgaatgctg gcgtcaagtg atctgcctgc ctccgcctta cgtaatatat | 3244 |
| tttcttaatg gctgcataat atcacatcaa ataggcatctt ttcaaacctc tttccttatt | 3304 |
| aaacatgtag actatatcca ttttttacta aaataaataa catcttcagat aatatctttg | 3364 |
| cactgataat gttgcccaag catttctaaa gtgaccttat caatttaatt accattggat | 3424 |
| gagggtgttg ctttcatcgc accattgtag attgtctttt ttatttcaat ttgcgtttat | 3484 |

10

20

30

```

ttataactgg ttgcaaaggt acacagaaca cagctcctt caacttatct ttgataaacc 3544
caagcaagga tacaaaaagt tggacgacat tgagtagagt catggtatatac ggtgctgacc 3604
ctacagtatc agtggaaaaag ataaggaaaaa tgtcactact cacctatggt atgcaaaaaca 3664
gttaggtgtg ctggggcttg atactgctct tttacttgag cattggttga ttaaagtta 3724
ggtaccatcc aggtggtgtc agagaagtct ttggagttaa ccatgctctt tttgttaaag 3784
aagagagtaa tgtgtttatc ctgggtcata gtccgtcacc gaaaatagaa aatgccatcc 3844
ataggtaaaa tgctgaccta tagaaaaaaa tgaactctac ttttatagcc tagtaaaaaat 3904
gctctacctg agtagttaaa agcaattcat gaagcctgaa gctaaagagc actctgatgg 3964
ttttggcata atagctgcat ttccagacct gacctttggc cccaaccaca agtgcctcaa 4024
gccccaccag ctgaccaaag aaagcccaag ttctccttct gtccttccca caacctccct 4084
gctcccaaaa ctatgaaatt aatttgacca tattaacaca gctgactcct ccagtttact 4144
taaggtagaa agaagtaggt tacaacagat gaaaataagt gctttgggag aactgtattc 4204
cttttaacag atccaaacta ttttacattt aaaaaaaaag ttaactaaa cttctttact 4264
gctgatatgt ttctgtatt ctagaaaaat ttttacattt tcacattatt tttgtacact 4324
ttcccatgt taaggatga tggcttttat aaatgtgtat tcattaaatg ttactttaaa 4384
aataaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaa 4419

```

```

<210> 10
<211> 458
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 10
Met Glu Lys Thr Cys Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Met Asn Ser Ser
1 5 10 15
Glu Lys Gln Glu Thr Val Cys Ile Phe Gly Thr Gly Asp Phe Gly Arg
20 25 30
Ser Leu Gly Leu Lys Met Leu Gln Cys Gly Tyr Ser Val Val Phe Gly
35 40 45
Ser Arg Asn Pro Gln Lys Thr Thr Leu Leu Pro Ser Gly Ala Glu Val
50 55 60
Leu Ser Tyr Ser Glu Ala Ala Lys Lys Ser Gly Ile Ile Ile Ala
65 70 75 80
Ile His Arg Glu His Tyr Asp Phe Leu Thr Glu Leu Thr Glu Val Leu
85 90 95
Asn Gly Lys Ile Leu Val Asp Ile Ser Asn Asn Leu Lys Ile Asn Gln
100 105 110
Tyr Pro Glu Ser Asn Ala Glu Tyr Leu Ala His Leu Val Pro Gly Ala
115 120 125
His Val Val Lys Ala Phe Asn Thr Ile Ser Ala Trp Ala Leu Gln Ser
130 135 140
Gly Ala Leu Asp Ala Ser Arg Gln Val Phe Val Cys Gly Asn Asp Ser
145 150 155 160
Lys Ala Lys Gln Arg Val Met Asp Ile Val Arg Asn Leu Gly Leu Thr
165 170 175
Pro Met Asp Gln Gly Ser Leu Met Ala Ala Lys Glu Ile Glu Lys Tyr
180 185 190
Pro Leu Gln Leu Phe Pro Met Trp Arg Phe Pro Phe Tyr Leu Ser Ala
195 200 205
Val Leu Cys Val Phe Leu Phe Tyr Cys Val Ile Arg Asp Val Ile
210 215 220
Tyr Pro Tyr Val Tyr Glu Lys Lys Asp Asn Thr Phe Arg Met Ala Ile
225 230 235 240
Ser Ile Pro Asn Arg Ile Phe Pro Ile Thr Ala Leu Thr Leu Leu Ala
245 250 255
Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Leu Gln Leu Tyr Arg
260 265 270
Gly Thr Lys Tyr Arg Arg Phe Pro Asp Trp Leu Asp His Trp Met Leu
275 280 285
Cys Arg Lys Gln Leu Gly Leu Val Ala Leu Gly Phe Ala Phe Leu His
290 295 300
Val Leu Tyr Thr Leu Val Ile Pro Ile Arg Tyr Tyr Val Arg Trp Arg
305 310 315 320
Leu Gly Asn Leu Thr Val Thr Gln Ala Ile Leu Lys Lys Glu Asn Pro

```

10

20

30

```

          325          330          335
Phe Ser Thr Ser Ser Ala Trp Leu Ser Asp Ser Tyr Val Ala Leu Gly
          340          345          350
Ile Leu Gly Phe Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Ile Thr Ser Leu Pro
          355          360          365
Ser Val Ser Asn Ala Val Asn Trp Arg Glu Phe Arg Phe Val Gln Ser
          370          375          380
Lys Leu Gly Tyr Leu Thr Leu Ile Leu Cys Thr Ala His Thr Leu Val
          385          390          395          400
Tyr Gly Gly Lys Arg Phe Leu Ser Pro Ser Asn Leu Arg Trp Tyr Leu
          405          410          415
Pro Ala Ala Tyr Val Leu Gly Leu Ile Ile Pro Cys Thr Ser Ser Leu
          420          425          430
Ser Ser Cys His Val Thr Thr Pro Leu Gln Gly Ser Ala Arg Ala Gly
          435          440          445
Lys Gly Thr Gln Asn Thr Arg Lys Ser Ile
          450          455

```

```

<210> 11
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 11
ggctcgacttt tcctttattc ctttgtcaga gatctgattc atccatatgc tagaaaccaa      60
cagagtgcact ttacaaaaat tcctatagag attgtgaata aaaccttacc tatagttgcc      120
attactttgc tctccctagt ataccttgca ggtcttctcg cagctgctta tcaactttat      180
tacggcacca agtataggag atttccacct tggttggaaa cctgggttaca gtgtagaaaa      240
cagcttgcat tactaagttg tttcttgcgt atggtccatg ttgcctacag cctctgctta      300
cggatgagaa ggtcagagag at                                     322

```

```

<210> 12
<211> 183
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 12
tttgcagctt tgcagatacc cagactgagc tggaaactgga atttgtcttc ctattgactc      60
tacttcttta aaagcggctg cccattacat tcctcagctg tccttgcagt taggtgtaca      120
tgtgactgag tgttggccag tgagatgaag tctcctcaaa ggaaggcagc atgtgtcctt      180
ttt                                     183

```

```

<210> 13
<211> 448
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 13
aagaaggaga atccatttag cacctcctca gcctggctca gtgattcata tgtggctttg      60
ggaatacttg ggttttttct gtttgtactc ttgggaatca cttctttgcc atctgttagc      120
aatgcagtc aactggagaga gttccgattt gtccagtc aactgggtta tttgacctg      180
atcttgtgta cagcccacac cctgggtgtac ggtgggaaga gattccctcag ccttcaaat      240
ctcagatggt atcttcctgc agcctacgtg ttagggctta tcattccttg cactgtgctg      300
gtgatcaagt ttgtccta atcatgccatgt gtagacaaca cccttacaag gatccgccag      360
ggctgggaaa ggaactcaaa acactagaaa aagcattgaa tggaaaatca atatttaaaa      420
caaagttcaa tttagctgga aaaaaaaaaa                                     448

```

```

<210> 14
<211> 401
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature

```

10

20

30

<222> 11, 56, 233, 250, 310, 326, 377, 398

<223> n = a, t, c, or g

<400> 14

```

ggccgcggca nccgctacga cctgggtcaac ctggcagtc aagcaggtctt ggccanacaa      60
gagccacctc tgggtgaagg aggaggtctg gcggatggag atctacctct ccctgggagt      120
gctggccctc ggacagttgt ccctgctggc cgtgacctca ctgccgtcca ttgcaaaactc      180
gtcgaactgg agggagttca gcttcgttca gtccctcactg ggctttgtgg cctcgtgct      240
gagcacactn cacacgtcca cctacggctg gaccgcgcgc ttcgaggaga gccgctacaa      300
gttctacctn cctccacact tcacgntcac gctgctgggt ccctgcttcc gttcatcctg      360
ggccaaagcc ctgtttntac tgccttgcac tcagccgnag a                          401

```

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<220>

<223> Xaa = Any amino acid

<400> 15

```

Ala Ala Ala Xaa Ala Thr Thr Trp Ser Thr Trp Gln Ser Ser Arg Ser
 1           5           10           15
Met Glu Ile Tyr Leu Ser Leu Gly Val Leu Ala Leu Gly Thr Leu Ser
 20           25           30
Leu Leu Ala Val Thr Ser Leu Pro Ser Ile Ala Asn Ser Leu Asn Trp
 35           40           45
Arg Glu Phe Ser Phe Val Gln Ser Ser Leu Gly Phe Val Ala Xaa Val
 50           55           60
Leu Ser Thr Leu His Thr Leu Thr Tyr Gly Trp Thr Arg Ala Phe Glu
 65           70           75           80
Glu Ser Arg Tyr Lys Phe Tyr Leu Pro Pro Thr Phe Thr Xaa Thr Leu
 85           90           95
Leu Val Pro Cys Val Arg Ser Ser Trp Ala Lys Ala Leu Phe Xaa Leu
100          105          110
Pro Cys Ile Gln Pro Xaa
115

```

20

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 16

```

ttaggacaac ttgatcacca gca      23

```

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> primer

<400> 17

```

tgtccagtc aaactggggtt attt      24

```

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

| | | |
|---|----|----|
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 18 | | |
| aggggagttca gcttcggttca gtc | 23 | |
| <210> 19 | | |
| <211> 24 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 19 | | |
| ggtagaactt gtagcggctc tcct | 24 | 10 |
| <210> 20 | | |
| <211> 24 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 20 | | |
| gactgagctg gaactggaat ttgt | 24 | |
| <210> 21 | | |
| <211> 24 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | 20 |
| <223> primer | | |
| <400> 21 | | |
| tttgaggaga cttcatctca ctgg | 24 | |
| <210> 22 | | |
| <211> 15 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Homo Sapiens | | |
| <400> 22 | | |
| Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu | | |
| 1 5 10 15 | | |
| <210> 23 | | |
| <211> 14 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | 30 |
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 23 | | |
| ttttgatcaa gctt | 14 | |
| <210> 24 | | |
| <211> 42 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |

| | | |
|--|----|----|
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 24 | | |
| ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc ag | 42 | |
| <210> 25 | | |
| <211> 12 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 25 | | |
| ggcccgtcct ag | 12 | 10 |
| <210> 26 | | |
| <211> 40 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 26 | | |
| gtaatacgac tcactatagg gcagcgtggt cgcggccgag | 40 | |
| <210> 27 | | |
| <211> 10 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | 20 |
| <223> primer | | |
| <400> 27 | | |
| cggctcctag | 10 | |
| <210> 28 | | |
| <211> 22 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 28 | | |
| ctaatacgac tcactatagg gc | 22 | |
| <210> 29 | | |
| <211> 22 | | 30 |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | |
| <223> primer | | |
| <400> 29 | | |
| tcgagcggcc gcccgggcag ga | 22 | |
| <210> 30 | | |
| <211> 20 | | |

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
agcgtggtcg eggccgagga 20

<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

10

<400> 31
atatcgccgc gctcgtcgtc gacaa 25

<210> 32
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
agccacacgc agtcattgt agaagg 26

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

20

<220>
<223> primer

<400> 33
Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His
1 5 10 15

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FLAG sequence

30

<400> 34
gattacaagg atgacgacga taag 24

<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 35
acaagagcca cctctgggtg aa 22

<210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 36
 agttgagcga gtttgcaatg gac 23

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IgA protease cleavage site 10

<400> 37
 cctcgacctc caacaccggg g 21

<210> 38
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 38
 Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr
 1 5 10 15
 Lys Ile Pro Ile Leu Val
 20

<210> 39
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens 20

<400> 39
 Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val
 1 5 10 15
 Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met
 20 25 30
 Glu Ile

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 40
 Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro Pro Thr Phe
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 41
 Tyr Ser Phe Val Arg Asp Val Ile His Pro Tyr Ala Arg Asn Gln Gln
 1 5 10 15

30

Ser Asp Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Glu Ile
 20 25

<210> 42
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 42
 Arg Arg Ser Glu Arg Tyr Leu Phe Leu Asn Met Ala Tyr Gln Gln Val
 1 5 10 15
 His Ala Asn Ile Glu Asn Ser Trp Asn Glu Glu Glu Val Trp Arg Ile
 20 25 30
 Glu

<210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 43
 Lys Arg Ala Phe Glu Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe Tyr
 1 5 10

<210> 44
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 44
 Tyr Pro Tyr Val Tyr Glu Lys Lys Asp Asn Thr Phe Arg Met Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Ile Pro Asn Arg Ile Phe Pro
 20

<210> 45
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 45
 Tyr Tyr Val Arg Trp Arg Leu Gly Asn Leu Thr Val Thr Gln Ala Ile
 1 5 10 15
 Leu Lys Lys Glu Asn Pro Phe Ser Thr Ser Ser Ala Trp Leu Ser Asp
 20 25 30
 Ser Tyr

<210> 46
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 46
 Ala Leu Gln Leu Gly Pro Lys Asp Ala Ser Arg Gln Val
 1 5 10

<210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 47
 Ile Glu Asn Ser Trp Asn Glu Glu Glu Val Trp Arg Ile Glu
 1 5 10

10

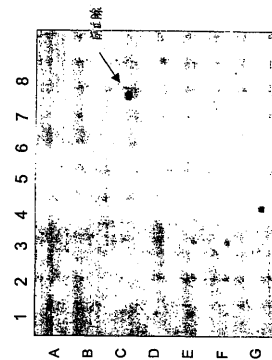
20

30

5' GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGG CGA GGG GCG GGG AGC GCC GCC TGG AGC GCG
GCA GGT CAT ATT GAA CAT TCC AGA TAC CTA TCA TTA CTC GAT GCT GTT GAT
AAC AGC AAG 3'

【 図 3 B 】

FIG. 3B



【 図 4 B 】

FIG. 4B

CTCCATCTCGAATAGTCACAGTGTGGCTAGAGTTGGTAGCAACTCTTCACAGAAATTTCTCAATTTTGTAGGTTCAAG
CTGCTAGAACCACTTGGAGCTTTTGGTGGCTCAATAAATAGTCTTTCACACAGTCTGTGCTGCTTACACATATATG
TGACACATGCTTTTGAGATCTCATTAGAGATTTAGAGATGGCTGACATGACATGAGGCTATTCTCATATGTGACAC
ATACCTAGCCGCTACAGTGTATACAAATACACATTTGGTAAACATTAATTTTCAACATGACATGATATTTTTCAACT
AGTACCTAGAAAGTGTTCCTACTTAAATCTGGAAGCTGGTAGACATCAAGGTACCTGGAGATTCATATAGTAA
AGGCAACTATGCTATTTGATTTGATTTGCTGAGCACTAAGAATGCGCTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG
GGCGAAGTCTGATTTTTCAGTAAGATGAGTAGAGAGTCAGAGTGTCTTAAAGAGGTGTGTGTGACAGCAAGCTGT
TGAGATTACATAGGTGAACCACTATTTTAAAGCACTCTTATTTGTGTAGTGACAAAGCCTCCCATGCAAGCTGAA
ATGTTTATCTGATTTCTGGATCTCTTATTTTGTGACGATCAAGAAAATTTGTCTATATTTTCCATGATGATCA
AGATATTTGATTTTAAAGATCAAGCGCAAGTTCTTCACTCTTATTTATCTTATTTATCTTAAAGATCAAGGTATCA
CATTTAGTCCCTTCCAACTGATTAAGATGACTCAGAGTCAATTTGATTTTGTCTATTTTCAATCTACCTATGATTT
TTAATTTGAGAACTTAAAGTGCAGATCTATGTTGTGATTTGCGAGTGATCTGCTATAGTAGACTCAGTCCCT
CATTTTGTGATCCCTGTGAAAGCAGATTTAGACAAATACAGAGCAGCAAGACAAAATAATATCATATAG
GGATTCAGCAAAAGTGTGAGAGGTGTAGCAAAATTTTGAACCTCTCTTCAAGAGAGTGTGAAATTTG
TTCTACTGACAGCACTGTGGACACAGAAATTTACCAAAATAGAGTGTGAGAGATGAGCAAAAGACAGAAAGATG
TGATAGGACATGTTGGAATTTGTATGGAGAAACATCAGATCAAAAGATTTCCAGGACACAGACATATCCAG
ATGAGATGAGATGGGATAAATCTTATTTAGACAGCTTCCCACTATTTTCTTTCTTTGACAGACAGCTAGGA
ATGTTGGTCTCTACTGGGACATACACAGCATGATTTTCTGTGGTAATGATGGATGATATAAATCAATTT
TATGTTATACACTCCAACTTTTATGATAGCTGTTTTCCTGCCAATGTTGTCTGATATTTTAAAGCATCATATT
CTGTGCACTGTGAGGAGAGATCATGAGATTTAGCATGGTGGGAGACATGACAAAATTAACAAAGCTGAG
ATCTGTCTCCGAGTTGTGATGATCTGTTTACACACATTTTGTTCATATGATATTTTACGACACATCTCA
AGTTGTTATTTGTTTAAATGATTTTATCAAGGAAAAAAAATAAAAAAAAAA

【 図 5 】

FIG. 5A

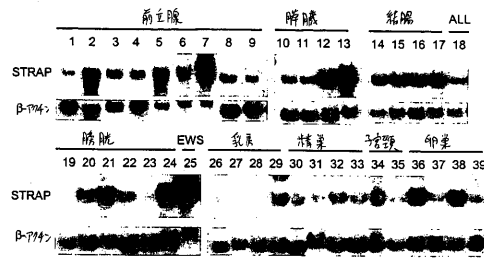
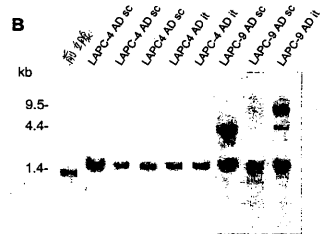


FIG. 5B



【 図 6 】

FIG. 6A

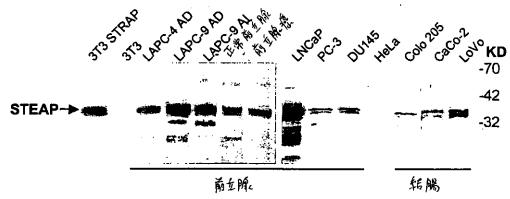
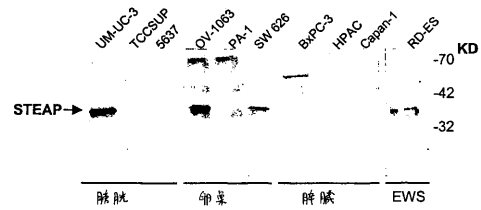


FIG. 6B



【圖 7】

FIG. 7A

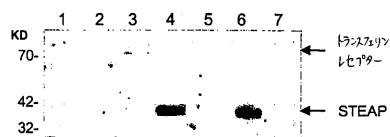
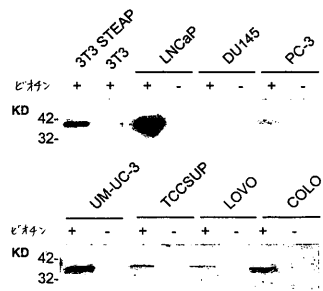


FIG. 7B



【 図 8 】

FIG. 8A

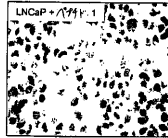


FIG. 8B

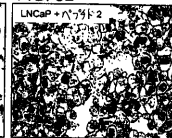


FIG. 8C



FIG. 8D



FIG. 8E

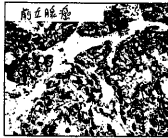


FIG. 8F

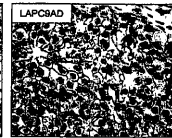


FIG. 8G

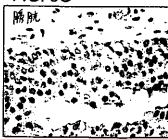
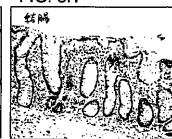


FIG. 8H



【図 9 A】

FIG. 9A

```
10      39      28      37      46      55
5' GGA CCG GTG GGC GGA GGC GTG GGT TCC TCG GGC CCG CCG CAC AAG CTG TCC
   ... 73      82      91      100      109
GGG CAC GCA GGC CCG ACG GGC GCG TCG TCG CCA AGC GCG CCG CCG CCG CCG TCC
   ... 118      127      136      145      154      163
CTC CTT CCT TCT CCC CTG GCT GTT CCG GAT CCA GCT TGG GTA GGC GGG GAA GCA
   ... 172      181      190      199      208      217
GCT GGA GTG CGA CGC CCA CGG CAG CCA CCC TGC AAC CCG CAG TCG GAG GTG CAG
   ... 226      235      244      253      262      271
TCC GTA GGC CCG GGC CCG GCG GTG GGC CCG TGG GGA GTC GGC GGC GCT CCG GAG
   ... 280      289      298      307      316      325
GAG CTG CAA GGC TCG CCC CTG CCG GGC GTG GAG GGC GCG GCG GCG GCG GAG GAT
   ... 334      343      352      361      370      379
ATT CTT GGT GAT CTT GGA AGT GTC CCG ATC ATG GGA TCA ATC TCT ATG ATG GGA
   ... 388      397      406      415      424      433
AGC CCT AAG ACG CTT AGT GAA ACT TGT TTA CCA AAT GGC ATA AAT GGT ATC AAA
   ... 442      451      460      469      478      487
GAT GCA ACG AAG GTC ACT GTC GAT GTG ATT GGA AGT GGA GAT TTT GGC AAA TCC
   ... 496      505      514      523      532      541
TTG ACC ATT GCA CTT ATT AGA TGC GGC TAT CAT GTG GTC ATA GGA AGT AGA AAT
   ... 550      559      568      577      586      595
CCT AAG TTT GCT TCT GAT TTT TTT CCG CAT GTG GTA GAT GTC ACT CAT CAT GAA
   ... 604      613      622      631      640      649
GAT GCT CTC ACA AAG ACA AAT ATA TTT GGT GCT ATA CAC ACA GAA CAT TAT
   ... 658      667      676      685      694      703
ACC TCC CTG TGG GAC CTG AGA CAT CTG CTT GTG GGT AAA ATC CTG ATT GAT GTG
   ... 712      721      730      739      748      757
AGC AAT AAC ATG AGG ATA AAC CAG TAC CCA GAA TCC AAT GCT GAA TAT TTG GCT
   ... 766      775      784      793      802      811
TCA TTA TTC CCA GAT TCT TTG ATT GTC AAA GGA TTT AAT GTT GTC TCA GCT TGG
   ... 820      829      838      847      856      865
GCA CTT CAG TTA GGA CCG AAG GAT GCG AGC CCG CAG GTT TAT ATA TCG AGC AAC
   ... 874      883      892      901      910      919
AAT ATT CAA CGC GCA CAA CAG GTT ATT GAA CTT GCG CCG CAG TTG AAT TTC ATT
   ... 928      937      946      955      964      973
CCC ATT GAC TTG GGA TCC TTA TCA TCA GCG AGA GAG ATT GAA AAT TTA CCG TTA
   ... 982      991      1000      1009      1018      1027
GGA CTC TTT ACT CTC TGG AGA GGG CCA GTG GTG GTA GCT ATA AGC TTG GCG ACA
   ... 1036      1045      1054      1063      1072      1081
TTT TTT TTT CTT TAT TAT TCC TTT GTC AGA GAT GTG ATT CAT CCA TAT GCT AGA AAC
   ... 1090      1099      1108      1117      1126      1135
CAA CAG AGT GAC TTT TAC AAA ATT CCT ATA GAG ATT GTG AAT AAA ACC TTA CCT
   ... 1144      1153      1162      1171      1180      1189
ATA GTT GCT ACT ACT TTG CTC TCC GTA TAC TAT CCA GGT CTT GTG GGA GCT
   ... 1198      1207      1216      1225      1234      1243
GCT TAT CAA CTT TAT TAC GCG ACC AAG TAT AGG AGA TTT CCA CCG TTG TTG GAA
   ... 1252      1261      1270      1279      1288      1297
ACC TGG TTA CAG TGT AGA AAA CAG CTT GGA TTA CTA AGT TTT TTC TTC GCT ATG
   ... 1306      1315      1324      1333      1342      1351
GTC CAT GTT GCG TAC AGC CTC TGC TTA CCG ATG AGA AGG TCA GAG AGA TAT TTG
   ... 1360      1369      1378      1387      1396      1405
TTT CTC AAC ATG GCT TAT CAG CAG GTT CAT CCA AAT AAT GAA AAC TCT TGG AAT
   ... 1414      1423      1432      1441      1450      1459
GAG GAA GAA GTT TGG AGA ATT GAA ATG TAT ATC TCC TTT GGC ATA ATG ACG CTT
   ... 1468      1477      1486      1495      1504      1513
GOC TTA CTT TCC CTC CTG GCA GTC ACT TCT ATC CCG TCA TCG AGC AAT GCT TTA
   ... 1522      1531      1540      1549      1558      1567
AAC TGG AGA GAA TTC AGT TTT ATT CAG TCT ACA CTT GGA TAT GTC GCT CTG CTC
   ... 1576      1585      1594      1603      1612      1621
ATA AGT ACT TTC CAT GTT TTA ATT TAT GGA TGG AAA CCA GCT TTT GAG GAA GAG
   ... 1630      1639      1648      1657      1666      1675
TAC TAC AGA TTT TAT ACA CCA AAC TTT GTT CTT GCT CTT GTT TTG CCC TCA
   ... 1684      1693      1702      1711      1720      1729
ATT GTA ATT CTG GAT CTT TTG CAG GTT TCC AGA TAC CCA GAC TGA GCT GGA ACT
   ... 1738      1747      1756      1765      1774      1783
GGA ATT TGT CTT CTT ATT GAC TCT ACT TCT TTA AAA GCG GCT GCG CAT TAC ATT
   ... 1792      1801      1810      1819      1828      1837
CCT CAG CTG TCC TTG CAG TTA GGT GTA CAT GTG ACT GAG TGT TGG CCA GTG AGA
   ... 1846      1855      1864      1873      1882      1891
TGA AGT CTC CTC AAA GGA AGG CAG CAT GTG TCC TTT TTT ATC CCG TCA TCT TCC
   ... 1900      1909      1918      1927      1936      1945
TGC TGG GAT TGT GGA TAT AAC AGG AGC CCG GGC AGC TGT CTC CAG AGG ATC AAA
   ... 1954      1963      1972      1981      1990      1999
GCC ACA CCC AAA GAG TAA GGC AGA TTA GAG ACC AGA AAG ACC TTG ACT ACT TCC
   ... 2008      2017      2026      2035      2044      2053
CTA CTT CCA CTG CTT TTG CCG CAT TTA AGC CAT TGT AAA TCT GGG TGT GTT ACA
   ... 2062      2071      2080      2089      2098      2107
TGA AGT GAA AAT TAA TTT CTT CTG CCC TCT AGT TCT TTA TCC TGA TAC CAT TTA
   ... 2116      2125      2134      2143      2152      2161
ACA CTG TCT GAA TTA ACT AGA CTG CAA TAA TCT TTT CTT TTG AAA GCT TTT AAA
```

【図 9 C】

FIG. 9C

```
1414      1423      1432      1441      1450      1459
GAG GAA GAA GTT TGG AGA ATT GAA ATG TAT ATC TCC TTT GGC ATA ATG ACG CTT
   ... 1468      1477      1486      1495      1504      1513
GOC TTA CTT TCC CTC CTG GCA GTC ACT TCT ATC CCG TCA TCG AGC AAT GCT TTA
   ... 1522      1531      1540      1549      1558      1567
AAC TGG AGA GAA TTC AGT TTT ATT CAG TCT ACA CTT GGA TAT GTC GCT CTG CTC
   ... 1576      1585      1594      1603      1612      1621
ATA AGT ACT TTC CAT GTT TTA ATT TAT GGA TGG AAA CCA GCT TTT GAG GAA GAG
   ... 1630      1639      1648      1657      1666      1675
TAC TAC AGA TTT TAT ACA CCA AAC TTT GTT CTT GCT CTT GTT TTG CCC TCA
   ... 1684      1693      1702      1711      1720      1729
ATT GTA ATT CTG GAT CTT TTG CAG GTT TCC AGA TAC CCA GAC TGA GCT GGA ACT
   ... 1738      1747      1756      1765      1774      1783
GGA ATT TGT CTT CTT ATT GAC TCT ACT TCT TTA AAA GCG GCT GCG CAT TAC ATT
   ... 1792      1801      1810      1819      1828      1837
CCT CAG CTG TCC TTG CAG TTA GGT GTA CAT GTG ACT GAG TGT TGG CCA GTG AGA
   ... 1846      1855      1864      1873      1882      1891
TGA AGT CTC CTC AAA GGA AGG CAG CAT GTG TCC TTT TTT ATC CCG TCA TCT TCC
   ... 1900      1909      1918      1927      1936      1945
TGC TGG GAT TGT GGA TAT AAC AGG AGC CCG GGC AGC TGT CTC CAG AGG ATC AAA
   ... 1954      1963      1972      1981      1990      1999
GCC ACA CCC AAA GAG TAA GGC AGA TTA GAG ACC AGA AAG ACC TTG ACT ACT TCC
   ... 2008      2017      2026      2035      2044      2053
CTA CTT CCA CTG CTT TTG CCG CAT TTA AGC CAT TGT AAA TCT GGG TGT GTT ACA
   ... 2062      2071      2080      2089      2098      2107
TGA AGT GAA AAT TAA TTT CTT CTG CCC TCT AGT TCT TTA TCC TGA TAC CAT TTA
   ... 2116      2125      2134      2143      2152      2161
ACA CTG TCT GAA TTA ACT AGA CTG CAA TAA TCT TTT CTT TTG AAA GCT TTT AAA
```

【図 9 B】

FIG. 9B

```
766      775      784      793      802      811
TCA TTA TTC CCA GAT TCT TTG ATT GTC AAA GGA TTT AAT GTT GTC TCA GCT TGG
   ... 820      829      838      847      856      865
GCA CTT CAG TTA GGA CCG AAG GAT GCG AGC CCG CAG GTT TAT ATA TCG AGC AAC
   ... 874      883      892      901      910      919
AAT ATT CAA CGC GCA CAA CAG GTT ATT GAA CTT GCG CCG CAG TTG AAT TTC ATT
   ... 928      937      946      955      964      973
CCC ATT GAC TTG GGA TCC TTA TCA TCA GCG AGA GAG ATT GAA AAT TTA CCG TTA
   ... 982      991      1000      1009      1018      1027
GGA CTC TTT ACT CTC TGG AGA GGG CCA GTG GTG GTA GCT ATA AGC TTG GCG ACA
   ... 1036      1045      1054      1063      1072      1081
TTT TTT TTT CTT TAT TAT TCC TTT GTC AGA GAT GTG ATT CAT CCA TAT GCT AGA AAC
   ... 1090      1099      1108      1117      1126      1135
CAA CAG AGT GAC TTT TAC AAA ATT CCT ATA GAG ATT GTG AAT AAA ACC TTA CCT
   ... 1144      1153      1162      1171      1180      1189
ATA GTT GCT ACT ACT TTG CTC TCC GTA TAC TAT CCA GGT CTT GTG GGA GCT
   ... 1198      1207      1216      1225      1234      1243
GCT TAT CAA CTT TAT TAC GCG ACC AAG TAT AGG AGA TTT CCA CCG TTG TTG GAA
   ... 1252      1261      1270      1279      1288      1297
ACC TGG TTA CAG TGT AGA AAA CAG CTT GGA TTA CTA AGT TTT TTC TTC GCT ATG
   ... 1306      1315      1324      1333      1342      1351
GTC CAT GTT GCG TAC AGC CTC TGC TTA CCG ATG AGA AGG TCA GAG AGA TAT TTG
   ... 1360      1369      1378      1387      1396      1405
TTT CTC AAC ATG GCT TAT CAG CAG GTT CAT CCA AAT AAT GAA AAC TCT TGG AAT
   ... 1414      1423      1432      1441      1450      1459
GAG GAA GAA GTT TGG AGA ATT GAA ATG TAT ATC TCC TTT GGC ATA ATG ACG CTT
   ... 1468      1477      1486      1495      1504      1513
GOC TTA CTT TCC CTC CTG GCA GTC ACT TCT ATC CCG TCA TCG AGC AAT GCT TTA
   ... 1522      1531      1540      1549      1558      1567
AAC TGG AGA GAA TTC AGT TTT ATT CAG TCT ACA CTT GGA TAT GTC GCT CTG CTC
   ... 1576      1585      1594      1603      1612      1621
ATA AGT ACT TTC CAT GTT TTA ATT TAT GGA TGG AAA CCA GCT TTT GAG GAA GAG
   ... 1630      1639      1648      1657      1666      1675
TAC TAC AGA TTT TAT ACA CCA AAC TTT GTT CTT GCT CTT GTT TTG CCC TCA
   ... 1684      1693      1702      1711      1720      1729
ATT GTA ATT CTG GAT CTT TTG CAG GTT TCC AGA TAC CCA GAC TGA GCT GGA ACT
   ... 1738      1747      1756      1765      1774      1783
GGA ATT TGT CTT CTT ATT GAC TCT ACT TCT TTA AAA GCG GCT GCG CAT TAC ATT
   ... 1792      1801      1810      1819      1828      1837
CCT CAG CTG TCC TTG CAG TTA GGT GTA CAT GTG ACT GAG TGT TGG CCA GTG AGA
   ... 1846      1855      1864      1873      1882      1891
TGA AGT CTC CTC AAA GGA AGG CAG CAT GTG TCC TTT TTT ATC CCG TCA TCT TCC
   ... 1900      1909      1918      1927      1936      1945
TGC TGG GAT TGT GGA TAT AAC AGG AGC CCG GGC AGC TGT CTC CAG AGG ATC AAA
   ... 1954      1963      1972      1981      1990      1999
GCC ACA CCC AAA GAG TAA GGC AGA TTA GAG ACC AGA AAG ACC TTG ACT ACT TCC
   ... 2008      2017      2026      2035      2044      2053
CTA CTT CCA CTG CTT TTG CCG CAT TTA AGC CAT TGT AAA TCT GGG TGT GTT ACA
   ... 2062      2071      2080      2089      2098      2107
TGA AGT GAA AAT TAA TTT CTT CTG CCC TCT AGT TCT TTA TCC TGA TAC CAT TTA
   ... 2116      2125      2134      2143      2152      2161
ACA CTG TCT GAA TTA ACT AGA CTG CAA TAA TCT TTT CTT TTG AAA GCT TTT AAA
```

【図 9 D】

FIG. 9D

```
2170      2179      2188      2197      2206      2215
GGA TAA TGT GCA ATT CAC ATT AAA ATT GAT TAT CCA TTG TCA ATT AGT TAT ACT
   ... 2224      2233      2242      2251      2260      2269
CAT TTT CCG GCG TTG ATC TTT CAT TAG ATA TTT TGT ATC TGC TTG GAA TAT ATT
   ... 2278      2287      2296      2305      2314      2323
ATC TTC TTT TTA ACT GTG TAA TTG GTA ATT ACT AAA ACT CTG TAA TCT CCA AAA
   ... 2332      2341      2350      2359      2368      2377
TAT TGC TAT CAA ATT ACA CAC CAT GTT TCC TAT CAT TCT CAT AGA TCT CCG TTA
   ... 2386      2395      2404      2413      2422      2431
TAA ACA TTT AAA TAA AAA GTA CTA TTT AAT GAT TTA AAA AAA AAC TCT TGG AAT
   ... 2440      2449
AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA 3'
```

【図 10 A】

FIG. 10A

1 CGAAACTTCC CTCTACCCGC CGGCGCCGCG GCGGCGCACC TTGGGCGCTG ACCTCTCTTC
GCTTTGAAGG GAGATGCGGCG GCGCGCGGCG GCGCGCGTGC AAGCCCGACC TCGGAGGGAG

M E K T C I D A L P L T

61 CTTGGAAGCG CCTCTCCCTC AGTTATGAGG AAAACTTGTA TAGATGCAT TCCTCTTACT
GAACCTTCGCG GGAGAGGGAG TCAATACCTC TTTTGAACAT ATCTACGTGA AGGAGAATGA

M N N S S E K Q E T V C I F G T G D F G R

121 ATGAATTCIT CAGAAAAGCA AGAGACTGTA TGTATTTTGG GAACCTGGTA TTTTGAAGA
TACTTAAGAA GTCTTTTGTG TCTCTGACAT ACATAAAAC CTTGACCATT AAAACCTTCT

S L G L K M L Q C G Y S V V F G S R N P

181 TCACCTGGAT TGAAATGCT CCAGTGTGTT TATCTGTGTT TTTTGGAG TCGAAACCC
AGTGACCTTA ACTTTTACGA GTCCACACCA ATAGACACAC AAAACCTTC AGCTTTGGG

Q K T T L L P S G A E V L S Y S E A A K

241 CAGAGAACCA CCTACTGCCC CAGTGTGCA GAAGTCTTGA OCTATTCAGA AGCAGCCAG
GTCTTCTGTT GGGATGACGG GTCCACAGCT CTTCAGAACT CGATAAGTCT TCGTGGTTC

K S G I I I I A I N R E H Y D P L T E L

301 AAGCTGGCA TCATAATCAT AGCAATCCAC AGAGAGCAAT ATGATTTTCT CACAGAATTA
TTCAGACCGT AGTATTAGTA TCGTGAAGTG TCTCTGTGTA TACTAAAAGA GTGTCTTAAT

T E V L N G K I L V D I S N N L K I N Q

361 ACTGAAGTTC TCAATGGAAA ATATTGGTA GACATCAGCA ACACCTTCAA AATCAATCAA
TGACTCCAAG AGTTACCTTT TTATAACCAT CTGTAGCTGT TGTGGAGTT TTAGTATGTT

Y P E S N A E Y L A H L V P G A H V V K

421 TATCCAGAAT CTAATGCGAG GTACCTTGCT CATTGTGTGC CAGGAGCCCA CTGTGGTAAA
ATAGGTCTTA GTTACTGCTT CATGGAACGA GTAAACGACG GTCTCTGGGT GCACCTTTT

A F N T I S A W A L Q S G A L D A S R Q

481 GCATTAAAC CCATCTCAGC CTGGGCTCTC CAGTCAAGAG CACTGGATGC AAGTGGCAG
CGTAAATGTT GGTAGAGTGC GACCCGAGCG GTACAGTCTC GTGACCTAGC TTCAGCCCTC

V P V C G N D S K A K Q R V M D I V R N

541 GTGTTGTGT GTGGAATACA CAGCAAGCC AGCAAGAGAG TGATGATAT TGTGTGTAAT
CACAAACACA CACCTTACT GTGCTTGGG TCTGTCTTC TACTAATAA ACAAGCAITA

L G L T P M D Q G S L M A A K E I E K Y

601 CTGAGCTTA TCCTCAATGA TCRAGATCA CTACATGCGAG CCAAGAAATC TGAAGAGTAC
GAACCTGAAT GAGGTACTCT AGTCTCTGTT GAGTACGTCT GCTTCTTTA ACTTTTCACTG

P L Q L P F M W R F P F Y L S A V L C V

661 CCCTGCGAG TATTTCATAT GTGAGGTTTC CCTCTTATTT TGTCTGCTGT GCTGTGTGT
GGGAGCTGC ATAAAGTTTA CACCTCCAGG GGGAGATATA ACAGACAGCA CGACACACAG

F L F F Y C V I R D V I Y P Y V Y E K K

721 TCTTCTGTT TCTATGTGT TATAAGAGC GTAATCTACCT CTATGTGTTA TGAAGAAGAA
AAGAACAATA AGATAACACA ATATTCTCTG CATTAGATGG GAATACAAAT ACTTTTCTTT

【図 10 B】

FIG. 10B

D N T F R M A I S I P N R I F P I T A L

781 GATAATACAT TTGATATGCG TATTTCCATT CCAATCGTA TCTTTCCAAAT AACAGCACTT
CTATTATGTA AAGCATACCG ATAAAGGTAA GOTTAGCAT AGAAGGTTA TTTGCTGAA

T L L A L L V Y L P G V I A A I L O L Y R

841 ACACCTGCTTG CTTTGGTTTA CCTCCCTGGT GTTATGCTG CATTCTACCA ACTGATCCGA
TGTGACGAAC GAAACCAAT GGAAGGACCA CAATAACGAC GGTATGATGT TGACATGGCT

G T K Y R R F P D W L D H W M L C R K Q

901 GGCACAAAAT ACCCTCGATT CCCAGACTGG CTTGACCAT GGTGCTTTTG CGAAGACGAG
CCGTGTTTTA TGGACGTAA GGGCTGACG GAACCTGTGA CCTACGAAC GGCCTTCCTC

L G L V A L G P A F L H V L T L V I P

961 CTTGGCTGG TAGCTCTGG AITTCCTTC CTTCATGTC TCTACACAT TGTGATTCCT
GAACCGAACC ATCGAGACCC TAAACGGAG GAGTACAGG AGATGTGTGA ACACTAAGGA

I R Y Y V R W R L G N L T V T Q A I L K

1021 ATTGATATT ATGTACGATG GAGATTGGGA AACTTAACCG TTACCCAGCG AATACTCAAG
TAAGCTATAA TACATGCTAC CTCTAACCTT TTGAATGGC AATGGGTCCG TTATGAGTTC

K E N P F S T S S A W L S D S Y V A L G

1081 AAGGAGAATC CATTTAGCAC CTCTCAGCC TGCTCAGTG ACTCATATGT GCTTTGGGA
TTCTCTTAGG GTAAATCTGT GAGGAGTGG ACCGATGAC TAAGTATACA CGAAGACCTT

I L G F F L P V L L G I T S L P S V S N

1141 ATACTGGGT TTTTCTGTT TGTACTCTTG GGAATCACTT CTTTGCCATC TGTATGCAAT
TATGAACCA AAAAAGACAA ACATGAGAAC CCTTAGTGAA GAAACGGTAG ACATCTGTTA

A V N W R E P R F V Q S K L G Y L T L I

1201 GCGATCACT GGAGAGATT CCGATTGTC CAGTCCAAAC TGGGTTATTT GACCTGATC
CCTCAGTTGA CCTCTCTCAA GGCTAACAG GTCAAGTTTG ACCCAATAAA CTGGGACTAG

L C T A H T L V Y G G K R F L S P S N L

1261 TTGTGTACAG CCCACACCTT GGTGTACGT GGAAGAGAT TCTTCAGCC TTCAATCTC
AACACATGTC GGTGTGGA CAACATGCC CCTTCTCTA AGGAGTCCG AAGTTTAGAG

R W Y L P A A Y V L G L I I P C T V L V

1321 AGATGGTAT TTCTTGACAG CTACGTGTTA GGGCTATCA TTCTTGACAG TGTGCTGGT
TCTACATAG AAGGACGTG GATGCAAT CCGAATATG AAGGAGCTG ACACAGCCAC

I K F V L I M P C V D N T L T R I R Q G

1381 ATCAAGTTTG TCTATCATC GCCATGTGA GACAACACCC TTACAGGAT CCGCAGGCG
TAGTTCAAC AGGATATGTA CGGTACACAT CTGTTGTGG AATGTTCTTA GCGGTCCCG

W E R N S K H

1441 TGGGAAGGA ACTCAACGA CTGAAAGAG CATGGAATG AAAATCAATA TTTAAACAA
ACCTTTCTCT TGAGTTTGT GATCTTTTC GTAACCTTAC TTTTAGTTAT AAATTTTGT

【図 10 C】

FIG. 10C

1501 AGTTCAATTT ACCTGGATT CTGACATG CTGTTGAATG TTTAAAGAG AATGATGGT
TCAAGTTAAA TCGACCTAAA GACTGTATAC CAAACTCTAC AAATTTCTTC TTACTACCCA

1561 ACAGTTAGGA AAGTTTTTTT CTTACACCGT GACTGAGGGA AACATTCGTT GTCTTTGAGA
TGCTAATCTC TTCAAAGAAA GAATGTGGCA GACTGCTCCT TTGTAAACGA CAGAACTCT

1621 AATTGACTGA CATACTGGA GAGAACCA TTTTATCTCA GGTATGTA GAATCAGTGC
TTAATGACT CTATGACTT CTCTGTGTG AAATAGAGT CCAATCACTT CTATGCTAGC

1681 AGGTCCCTGA CTCTTATTTT CCGAGAGGCC ATGAGAGCTGA GATTGAGACT AGCCTTGTGG
TCCAGGGACT GAGATATAAA GGTCTCCGCG TACTCTGACT CTAACCTGTA TCGGAACACC

1741 TTTCACACTA AAGAGTTTCC TTGTATGGG CAACATGCT GACCTAATGT CTGCAAAAT
AAAGTGTGAT TTCTCAAAGG ACAATACCC GTTGTACGTA CTGGATTACA GAACGTTTTA

1801 CCAATAGAAG TATTGCACT TCTCTCTGCT GCTCAAGGCC TGAAGTTAAG GAAAGGAAAA
GGTATCTTC ATAACTGCGA AGGAGAGAC CGAGTTCGCG ACTCAATTCA CTTCCTTTT

1861 ACACACAAT GTGACCACT GATAAAGCTT TTATTAGTA TATCTGAAGA AGTGGTCAAC
TGTGTTGTA CCATGTGTA CTAITTTCCGA AATAATCAT ATAGACTCTC TCACCCAGTG

1921 ATGAATGTA AAAAGGGAAT GAGGTTTTTG TTGTTTTTTG GAAGTAAAG CAAACATAAA
TACTTTACAT TTTTCCCTTA CTCCAAAAC AACAAAAC CTTCATTTCC GTTGTATTT

1981 TATTACCATG ATGAATCTTA GTGAATGAC CCTCTGACTT TCTTTTCTTT ANTACAGATA
ATAATGTAC TACTTAAGAT CACTTTACTG GGAACACTGA ACGAAAAGAA TTATGTCTAT

2041 TTTACTGAGA GGAATATTT TTATAACCA AGAAAATTT ACAATTGAT AAAAGTATCC
AAATGACTCT CCTGATATA AATATTTGTG TCTTTTTAAA TGTTAACATA TTTTCATAGG

2101 ATGTCTTGA TACATACGTA TCTATAGAG TGGCATGTAA TCTTCTCTCT ATAAAGATA
TACAGAACCT ATGTATGCT ATGATCTCTG ACCGTACATT AAGAAGGAGA TATTCTTAT

2161 GGTATAGAA AGACTGAATA AAAATGGAG GATATCCCTT TGGATTTCAC TTGCAATGTG
CCATATCTCT TCTGACTTAT TTTTACTCCT CTATAGGGGA ACCTAAAGTG AAGTAAAC

2221 CAATAAGCAA AGAAGGTTG ATAAAGTTC TTGATCAAAA AGTTCAAAAG AACAGAAAT
GTATTTGTT TCTTCCCAAC TAITTTCAAG AACTGTTT TCAAGTTTCT TGTGCTTAA

2281 TTAGACAGCA AGCTAAATAA ATATGTGAAA ATTGCACTAT ATTAGGTTAA GTATTATTA
AATCTGTGT TCGATTATTT TATAACATTT TAAGTGATA TATTCGAAT CATAATAAAT

2341 GGTATTATA TATGCTTTTG AAATTTTATA TTCAAAAT TGTCTCAAT TTTTCACTTA
CCATAATATT ATACGAACA TTTAAATAT AAGGTTTATA ACGAGTTATA AAAAGTAGAT

2401 TTAATTAAT TTTAGTGA ATAAAGTAG TCTATATCT GTCTTAGTCT ATTATAATGT
AATTTAATA AAGATCAAT TTAATCATG AAGATAAGA CAGAACTGA TAATATTAC

【図 10 D】

FIG. 10D

2461 TAAGGAGTAA AATTAAATGA ATAGTCTGCA GGTATAAAT TGAAACATGC ATAGATGATC
ATTTCTCAT TTAAATTTACT TATCAGAGT CCATATTAAT ACTTGTAGG TATCTACTAG

2521 GAAATTTAGC GAAATCATGA GGGCAGAGAG GTGTGAAGAT TCATCATATT GTGAAATTTG
CTTTTATGCT CTTTAGTAT CCCCTCTCTC CACACTTCTA AGAGTAACTA CACTTAAAC

2581 GATCTTTTCT AAATCCTTGC TGAAATTTAG GATGCTTCTC ACTGTTTTCT TGTGCTGATA
TCAGAAAGAG TTTAGGAAGC ACTTTAAATC CTACCAAGAG TGAACAAAG ACAGGCTAT

2641 GTACCCCTTC CAAGGTGACC TTAGGGGGA TTAACTTCTC TACTCAGG AATGAGCTAA
CATGGGAAG GTTCAACTG AAGTCCCTCT AATTGGAAG ATCGAGTTGC TTACTGATT

2701 AAGAGGCTTT ATGCAATGATC TTCCACATA TCAAAATTAAC TAAAGGACAC TGAGTTTGGC
TTCTCTGGA TAOSTACTAG AAGGTGTAT AGTTTATTG ATTTTCTGCT ACTCAAGCC

2761 ATTTTCTGCT CTGCTCTGCT AAGACCTTTT TTTTTTTTTT ACTTTCATTA TAACATATTA
TAAAGAGCG GACGAGACGA TTCTGAAAA AAAAAAATAA TGAAGTAAAT ATTGTATAAT

2821 TACATGACAT TATACAAAA TGATTAAAT ATATTAAAC AACATCAACA ATCCAGATA
ATGTACTGTA ATATGTTTTT ACTAATTTTA TATAATTTTG TTGAGTTTGT TAGTCTCTAT

2881 TTTTCTATA AAATTTTTTA AAATAAATG TAICTATATA TCAATTTTTA CATCTTTTT
AAAAAGATAT TTTGAAAAAT TTTTATTAAC ATAGATATAT AAGTTAAAT GTAGGAAAAA

2941 CAAAGGCTTT GTTTTCTTAA AGGCTTGTGT TCTCTTTTFA TTTTTTTTTT CTTTTTATT
GTTTCCGAAA CAAAAGATT TCCGAACAA AAGGAAATAT AATAAAAAAA GAAAAATAA

3001 TTTTGTAGAC AGTCTTCTC TGTCTCTG GCTGAGTGC AGTGGCAGCA TCTAGCTCA
AAAAACTCTG TCAGAACGAG ACAGCGAGTC CGACCTCAGC TACCGTGTCT AGAGTCGAGT

3061 CTGCAACCTC CTCTCCCGAG GTTCAAGTGA TCTTTGTGA TCAAGCTCCC GAGTACCTGG
GAGCTTGGAG GAGGAGGCTC CAACTTCACT AAGAACAAAT AGTCCGAGGG CTATCCAGCC

3121 GACTACAGCG ATGTGCCACT ATGCCAGCT ATTTTGTGA CTTTATAGT AGACAGGGT
CTGATGTCG TACACGTTGA TACGGTGA TTAACAACT GAAATCATC TCTGTCCAAA

3181 TCACACACTT GGTCAAGCTG GTCTGAAAT GCTGGGCTA AGTGTCTGCT CGCTCCCGC
AGTGGTGTAA CAGTCCGAG CAGAACTTTA GACCCGAGT TCACTAGAG GAGCGAGCG

3241 CTTAGCTAAT ATATTTCTT AATGCTGCA TAATATCACA TCAATAGGC ATTTTCAA
GAATGCTATA TATAAAGAA TTACCGAGT ATATAGTGT AGTTATCTG TAAAGATTT

3301 CCTCTTCTCT TATTAAACT GTAGACTATA TCCATTTTPT ACTAAATAA ATACATTTTC
GGAGAAAGGA ATATTTGTA CATCTGATAT AAGTAAAAA TGAITTTAT TATTGTAAAG

3361 AGATAATATC TTGCACTGA TATGTTGCC AAGCACTTTC TAAAGTACCC TTATCAATTT
TCTATTAGG AAGCTGACT ATACACAGG TTGAGTAAG ACTGCTGCT AATAGTTAAA

【図 1 1 C】

FIG. 11C

```

STEAP-1 67 LFFQWHLPIKIAAIIASLTFLYLLREVHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPVMSITLL
STEAP-2 208 LFLINRGPPVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPIYARNOQSDPYKIPILVINKVLPVVAITLL
          * * * * *
STEAP-1 127 ALVYLPGVIAAIVQLINGTKYKFFHMLDKWMLTRKQGLLSFFFAVLHAIYSLSPMR
STEAP-2 268 SLVYLAGLAAAYQLYGTGYKRRFPMWLTWLCRQGLLSFFFAVMHVAYSCLPMR
          * * * * *
STEAP-1 187 SYRYKLANWAYQQVQNKEDAMIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSL
STEAP-2 328 SERYLFLNWAYQQVQNHANIEHSEVWRIMEIYFQIMSLGLSLAVTSIPSVSNALN
          * * * * *
STEAP-1 247 NREFTYIQSLGIVALLGTHALIFAWNKWDIKQFVMTPTFPMIAVFLVIL
STEAP-2 388 NREFSFQSLGIVALLGTHALIFAWNKWDIKQFVMTPTFPMIAVFLVIL
          * * * * *

```

【図 1 1 D】

FIG. 11D

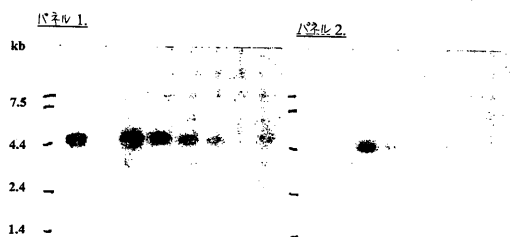
```

STEAP1 66 ELFFQWHLPIKIAAIIASLTFLYLLREVHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPVMSITLL
STEAP3 195 QLFFPMNRPFFYLSAVLCVLFPPYCVIRDIYPIYVEKDNTPRMAISIPNRIFFTALTL
          * * * * *
STEAP1 126 LALVYLPQVIAAIVQLINGTKYKFFHMLDKWMLTRKQGLLSFFFAVLHAIYSLSPMR
STEAP3 255 LALVYLPQVIAAIIQLYRGTGYKRRFPMWLDHWMCRKQGLLVALGFALHVLVLTLPVIR
          * * * * *
STEAP1 186 RSVRYKLANWAYQQVQNKEDAMIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSL
STEAP3 315 YVWRMLGNLTVTQAILKENPFTSSAWLSDSVVALGILGFFLVLLGITSLSVSNV
          * * * * *
STEAP1 246 TWREPHYQSLGIVSLLGTHALIFAWNKWDIKQFVMTPTFPMIAVFLVIL
STEAP3 375 NWRERFVQSLGIVLTLICTAHTLVYGGKFLSPSNRWLYLPAAYVLGLIIPCTVLV
          * * * * *
STEAP1 306 SILFLPCLRKILKIRGHEDVTK
STEAP3 435 FVLIMPVDVNTLTKIRKQWERNK
          * * * * *

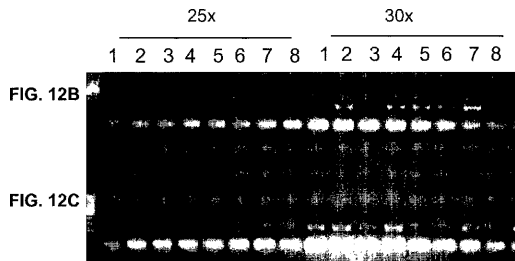
```

【図 1 2 A】

FIG. 12A



【図 1 2 B - C】



【図 1 1 E】

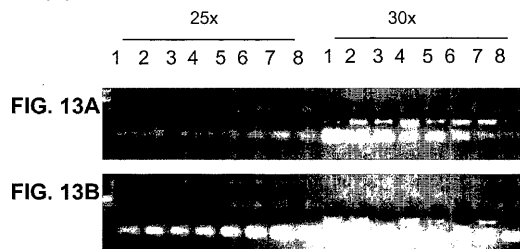
FIG. 11E

```

STEAP2 29 RKVITGVIGSDPAKSLTIRLIRCGYHVIGSRNPKFASFFPHVDVTHREDALTKNTI
STEAP3 18 KQETVCIFGTQDFGRSLKMLQCOYSVFGSENPO-KTTLPSQAEVLVSAAKSOI
          * * * * *
STEAP2 89 IFVATHREHYTSLWDLRHLVKGILIDVSNMIRINQYPSNAEYLASLPDLSLVKGMV
STEAP3 77 IIAIHREHYDFTLSEVLNGKILVDISNNKINQYPSNAEYLAHLVPGAHVVKAFNT
          * * * * *
STEAP2 149 VSAWALQGLPKDASRQVYICSNNTQARQVILARQLNFIPIDLGSLSSARETENLPLRL
STEAP3 137 ISAWALQSGALDASRQVFCGNDKAKQRMVDIVRNGLTMDQGSMAAKBIERYPLQL
          * * * * *
STEAP2 209 FTLNRGPPVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPIYARNOQSDPYKIPILVINKVLPVVAITLLS
STEAP3 197 FPMNRPFFYLSAVLCVLFPPYCVIRDIYPIYVEKDNTPRMAISIPNRIFFTALTLA
          * * * * *
STEAP2 269 LVYLAGLAAAYQLYGTGYKRRFPMWLTWLCRQGLLSFFFAVMHVAYSCLPMR
STEAP3 257 LVYLPQVIAAIIQLYRGTGYKRRFPMWLDHWMCRKQGLLVALGFALHVLVLTLPVIRY
          * * * * *
STEAP2 329 ERYLFLNWAYQQVQNHANIEHSEVWRIMEIYFQIMSLGLSLAVTSIPSVSNALN
STEAP3 317 VRWRLGNLTVTQAILKENPFTSSAWLSDSVVALGILGFFLVLLGITSLSVSNV
          * * * * *
STEAP2 389 REFSFIQSLGIVALLGTHALIFAWNKWDIKQFVMTPTFPMIAVFLVIL
STEAP3 377 REFRFVQSLGIVLTLICTAHTLVYGGKFLSPSNRWLYLPAAYVLGLIIPCTVLV
          * * * * *

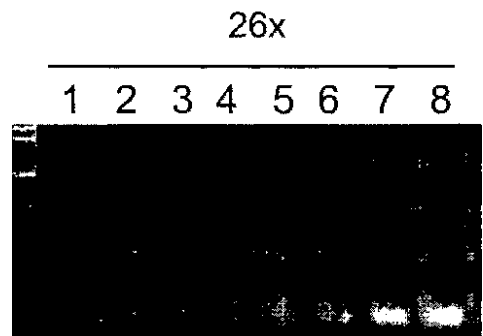
```

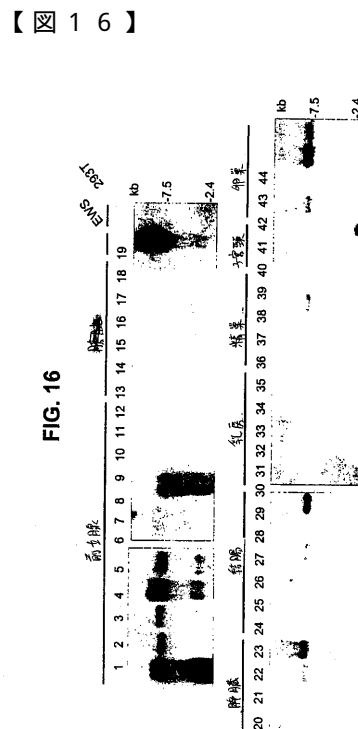
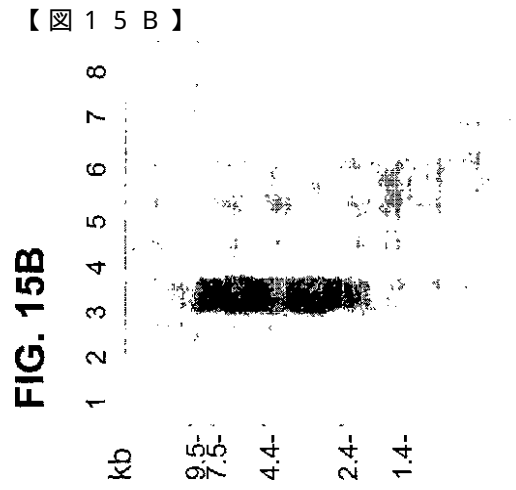
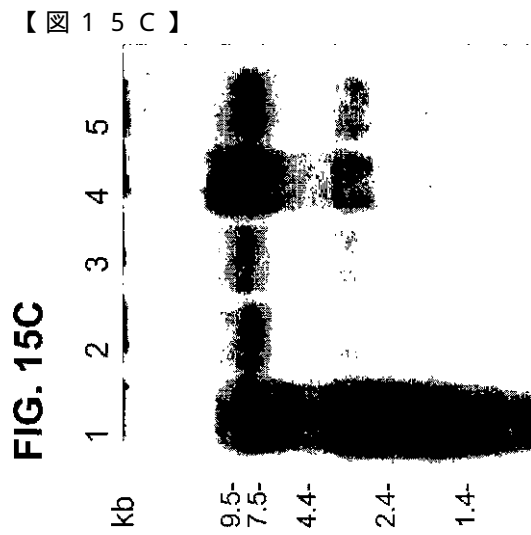
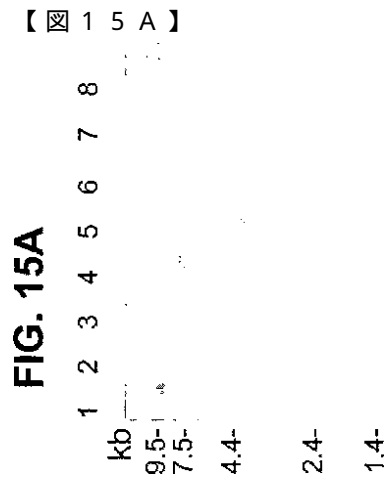
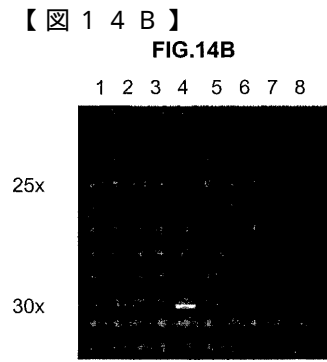
【図 1 3 A - B】



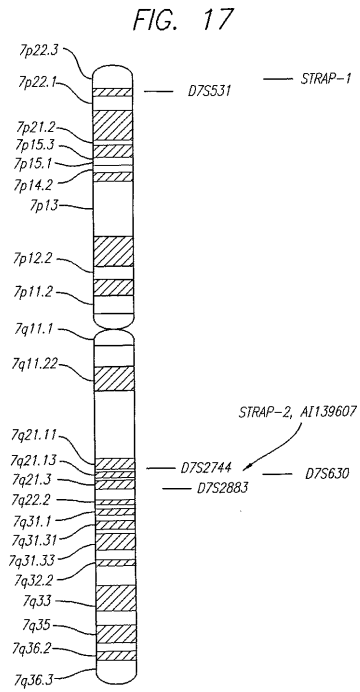
【図 1 4 A】

FIG. 14A



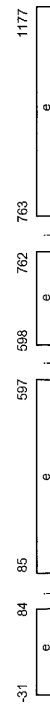


【図 17】



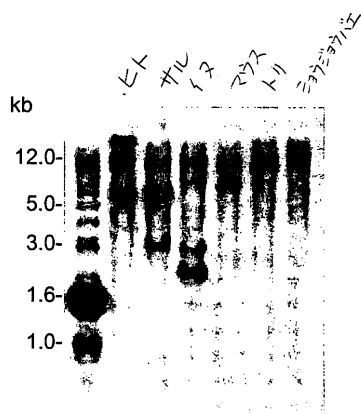
【図 18】

FIG. 18



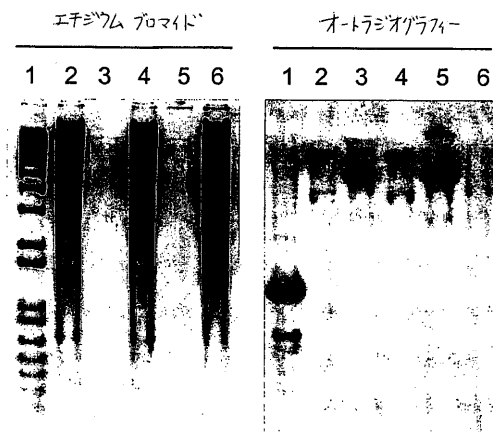
【図 19】

FIG. 19



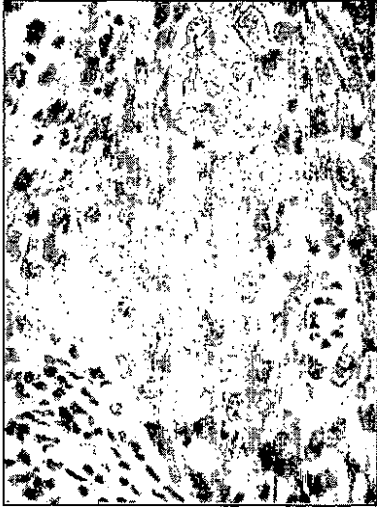
【図 20】

FIG. 20



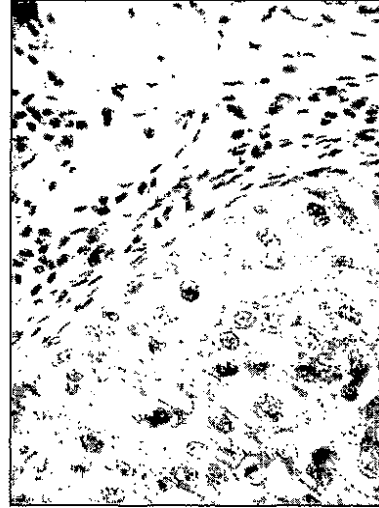
【図 21 A】

Fig. 21A



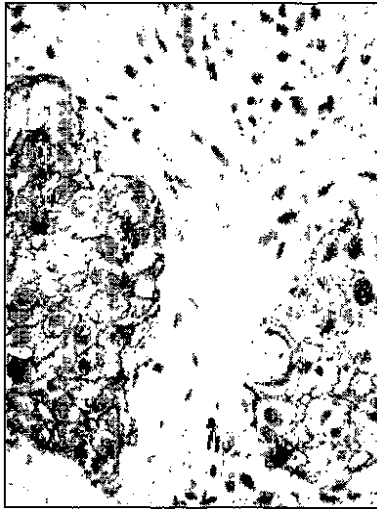
【図 21 B】

Fig. 21B



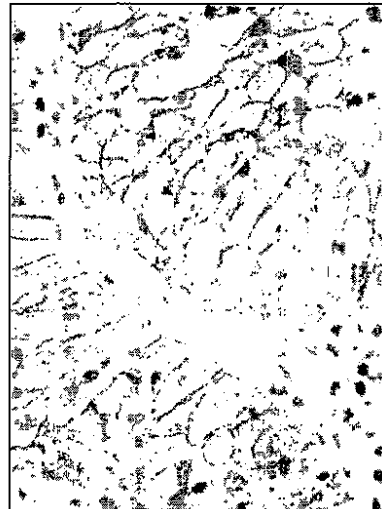
【図 21 C】

Fig. 21C



【図 21 D】

Fig. 21D



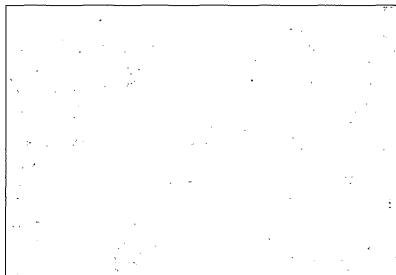
【図 22 A】

Fig. 22A



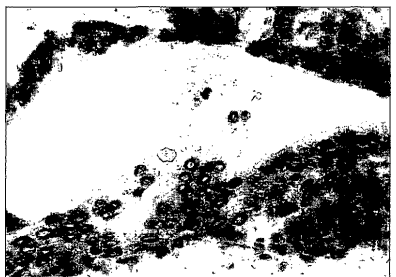
【図 22 B】

Fig. 22B



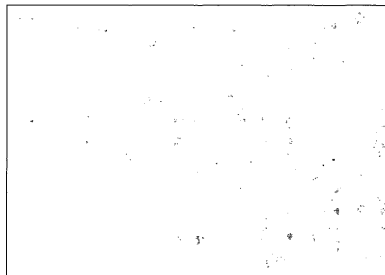
【図 23 A】

Fig. 23A



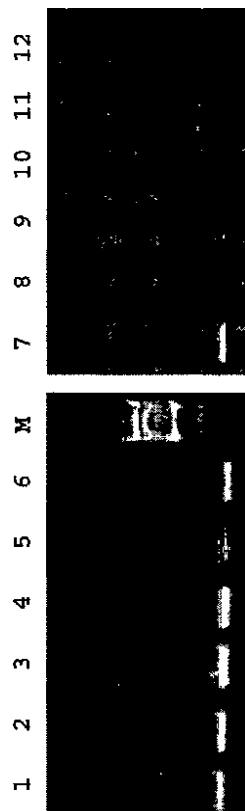
【図 23 B】

Fig. 23B



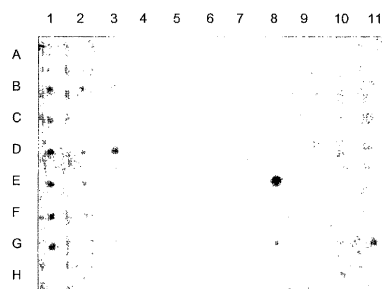
【図 24】

Fig. 24

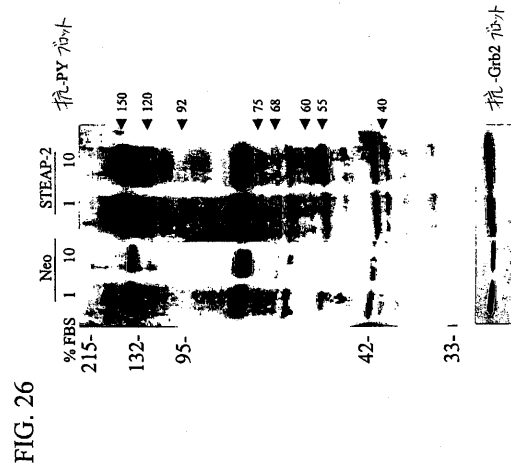


【図 25】

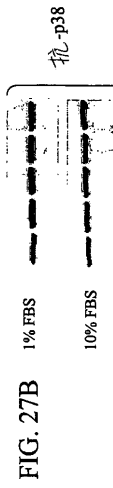
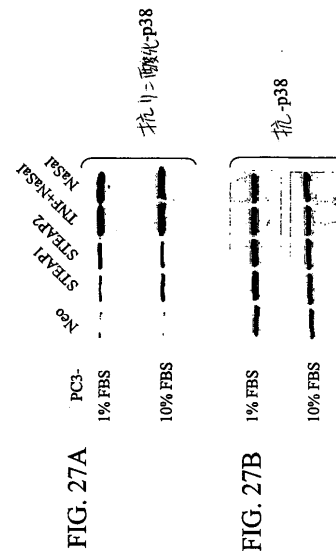
Fig. 25



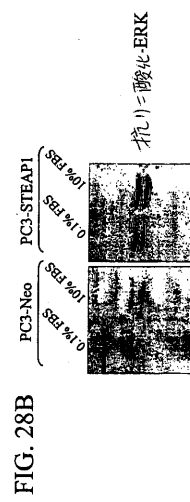
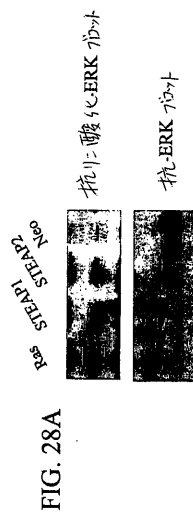
【 図 2 6 】



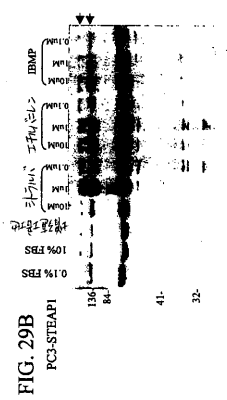
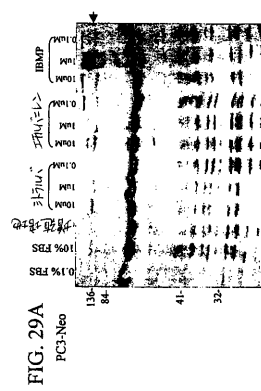
【圖 27】



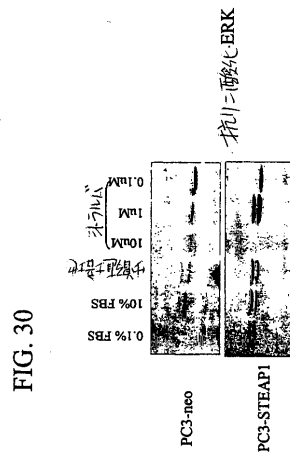
【 図 2 8 】



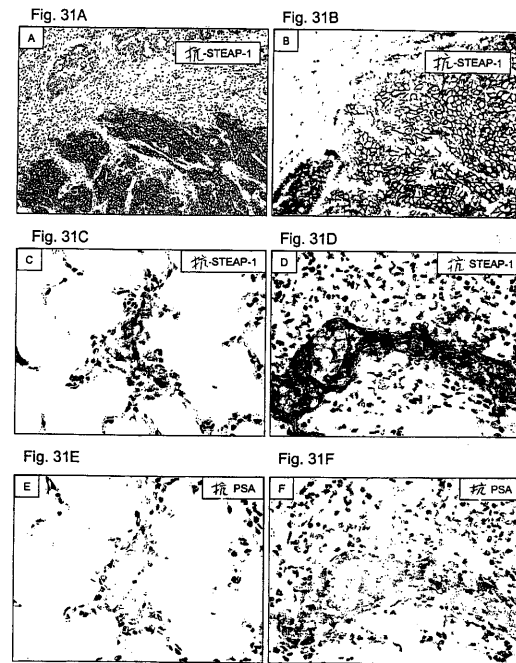
【 図 2 9 】



【図 30】

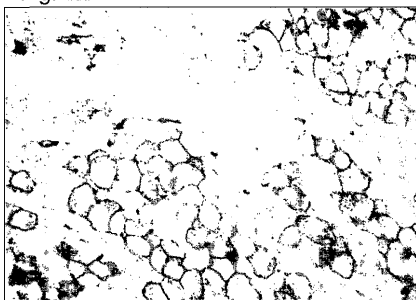


【図 31】



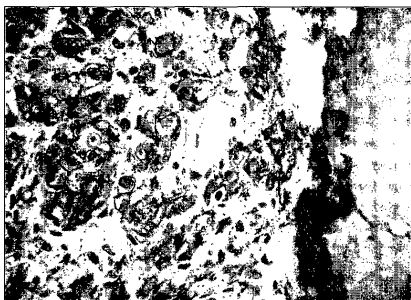
【図 32 A】

Fig. 32A



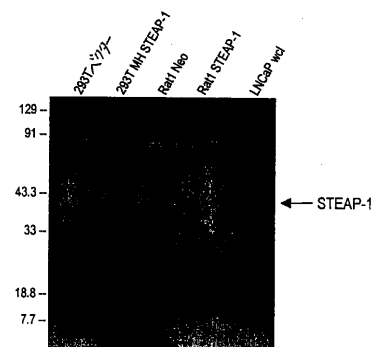
【図 32 B】

Fig. 32B



【図 33】

FIG. 33



フロントページの続き

| | | | |
|--------------------------|----------------|-----|--|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| C 0 7 K 14/82 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | T | |
| C 0 7 K 16/30 (2006.01) | C 0 7 K 14/82 | | |
| C 0 7 K 19/00 (2006.01) | C 0 7 K 16/30 | | |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 0 7 K 19/00 | | |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | | |
| C 1 2 N 15/02 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | | |
| A 6 1 K 51/00 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | C | |
| A 6 1 K 38/00 (2006.01) | A 6 1 K 43/00 | | |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | A 6 1 K 37/02 | | |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 | C | |
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 | A | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | G 0 1 N 33/574 | A | |
| | G 0 1 N 33/574 | Z | |
| | C 1 2 P 21/08 | | |

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 アファー, ダニエル イー. エイチ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 5, ブリスベン, ヴィジタシオン アベニュー
4 3 5

(72)発明者 ハバート, レネ エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 2 6, ロス アンジェルス, ノース オクシデンタル
ブルバード 1 6 4 4

(72)発明者 ライタノ, アーサー ピー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 6 4, ロス アンジェルス, カシュダン アベニュー
1 0 8 0 7

(72)発明者 サフラン, ダグラス シー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 4 9, ロス アンジェルス, ナンバー 2 0 4,
ベラジオ ロード 1 1 7 2 0

(72)発明者 ミッチェル, スティーブ チャップル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 4 0 5, サンタ モニカ, 1 / 2 4 ティーエイチ
ストリート 2 4 1 7

(72)発明者 ファリス, メアリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 7 7, ロス アンジェルス, アルマデン コート
2 5 3 8

(72)発明者 ジャコボビッツ, アヤ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 2 1 0, ビバリー ヒルズ, ハットン ドライブ 3
1 3 5

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 6 1 4 6 9 (WO, A 1)

国際公開第 9 9 / 0 6 2 9 4 1 (WO, A 1)

国際公開第 9 4 / 0 0 9 1 5 0 (WO, A 1)

国際公開第 9 8 / 0 1 8 4 8 9 (WO, A 1)

Proc Natl Acad Sci U S A., 95[4] (1998) p.1735-1740

Proc Natl Acad Sci U S A., 96[25] (1999 Dec 7) p.14523-14528

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

BIOSIS/WPI(DIALOG)