申請日期： 92-9-15	IPC分類
申請案號： 92125320	C12Q 1/68 , C12N 15/11

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書 200413539

一、發明名稱	中文	攝護腺癌相關基因與多胜肽
	英文	GENES AND POLYPEPTIDES RELATING TO PROSTATE CANCERS
二、發明人(共4人)	姓名(中文)	1. 中村祐輔 2. 片桐豊雅 3. 中川英刀
	姓名(英文)	1. NAKAMURA, Yusuke 2. KATAGIRI, Toyomasa 3. NAKAGAWA, Hidewaki
	國籍(中英文)	1. 日本 JP 2. 日本 JP 3. 日本 JP
	住居所(中文)	1. 日本國神奈川縣橫濱市青葉區藪野1丁目17番33號 2. 日本國東京都品川區東五反田2-10-11-305 3. 日本國東京都品川區上大崎3丁目36-11-103
	住居所(英文)	1. 2. 3.
三、申請人(共2人)	名稱或姓名(中文)	1. 腫瘤療法・科學股份有限公司 2. 東京大學總長代表日本國
	名稱或姓名(英文)	1. ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. 2. JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF THE UNIVERSITY OF TOKYO
	國籍(中英文)	1. 日本 JP 2. 日本 JP
	住居所(營業所)(中文)	1. 日本國東京都港區白金台3-16-13 (本地址與前向貴局申請者相同) 2. 日本國東京都文京區本鄉7丁目3番1號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所(營業所)(英文)	1. 2.
	代表人(中文)	1. 冨田憲介 2. 佐佐木毅
	代表人(英文)	1. Tomita Kensuke 2. Sasaki Takeshi

申請日期：	IPC分類
申請案號： 92125320	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	
	英 文	
二、發明人（共4人）	姓 名（中文）	4. 中鶴修一
	姓 名（英文）	4. NAKATSURU, Shuichi
	國 籍（中英文）	4. 日本 JP
	住居所（中 文）	4. 日本國埼玉縣埼玉市中央區下落合2丁目6番2號
	住居所（英 文）	4.
三、申請人（共2人）	名稱或姓 名（中文）	
	名稱或姓 名（英文）	
	國 籍（中英文）	
	住居所（營業所）（中 文）	
	住居所（營業所）（英 文）	
	代表人（中文）	
	代表人（英文）	

一、本案已向

國家(地區)申請專利	申請日期	案號	主張專利法第二十四條第一項優先權
美國 US	2002/09/30	60/414,873	有

二、□主張專利法第二十五條之一第一項優先權:

申請案號:

無

日期:

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項□第一款但書或□第二款但書規定之期間

日期:

四、□有關微生物已寄存於國外:

寄存國家:

寄存機構:

無

寄存日期:

寄存號碼:

□有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構):

寄存機構:

寄存日期:

無

寄存號碼:

□熟習該項技術者易於獲得,不須寄存。

五、發明說明 (1)

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於生物科學範疇，特別相關於癌症研究。本發明特別關於攝護腺癌相關新穎基因A5736 (*D4493*) 及基因D4493 (*PCOTH*) 所編碼之新穎多胜肽。本發明更進一步相關於新穎基因A5736 (*A5736*)。本發明之基因及多胜肽可使用於攝護腺癌診斷中，作為目標分子以使藥物對抗該疾病及減緩攝護腺癌細胞生長。

【先前技術】

攝護腺癌為西方國家男性最普遍罹患的癌症之一(Gronberg, Lancet 361: 859-64(2003))。由於西方飲食模式及逐次增加的老年人口，發展中國家的攝護腺癌罹患率正穩定地增加中。經由攝護腺特定抗原(prostate specific antigen; PSA)血清測試的早期診斷使治療性的外科手術可及早實施，該早期診斷並顯著改善攝護腺癌的預測。然而，高至30%接受放射性攝護腺切除的病人復發該癌症(Han et al., J Urol 166: 416-9 (2001))。多數復發或病情加重的癌症與腎上腺分泌的雄性素脫離治療法有關，因為攝護腺癌細胞的生長在起始階段是依賴雄性素的濃度。但是多數經此治療法治療的病人最終發展為與雄性素無關的疾病，因此他們不再與該治療法相關。攝護腺癌最嚴重的臨床問題在於與雄性素無關的攝護腺癌沒有任何治療法可治癒(Gronberg, Lancet 361: 859-64 (2003))。因此，在攝護腺癌的處理上，有別於雄性素脫

五、發明說明 (2)

離治療法的新療法之建立有急切的需要。

cDNA微陣列晶片技術已經能了解正常細胞與腫瘤細胞基因表現的輪廓，並能夠比較腫瘤細胞與相對正常細胞的基因表現(Okabe et al., Cancer Res 61:2129-37 (2001); Kitahara et al., Cancer Res 61: 3544-9 (2001); Lin et al., Oncogene 21:4120-8 (2002); Hasegawa et al., Cancer Res 62:7012-7 (2002))。該方法能揭露癌症細胞的複雜本質，而且有助於了解致癌作用的機制。破壞腫瘤規律的基因確認可使個別癌症的診斷更精準及正確，而且可發展新的治療目標(Bienz and Clevers, Cell 103: 311-20 (2000))。為了由整組基因觀點揭示腫瘤形成的機制及發現新治療藥物發展及診斷的目標分子，本發明者以23040基因的cDNA微陣列晶片分析腫瘤細胞表現情形(Okabe et al., Cancer Res 61:2129-37 (2001); Kitahara et al., Cancer Res 61: 3544-9 (2001); Lin et al., Oncogene 21:4120-8 (2002); Hasegawa et al., Cancer Res 62:7012-7 (2002))。

揭示致癌作用機制的研究已便利抗腫瘤劑的目標分子鑑定。例如原本抑制與Ras相關生長訊號路徑的法呢基轉移酶(farnexyltransferase; FTIs)抑制物，在動物實驗中有效治療依賴Ras量的癌症，該抑制物的活性與後轉譯Farnesylation有關(He et al., Cell 99: 335-45 (1999))。人體臨床試驗使用混合藥物或抗癌藥物與抗

五、發明說明 (3)

HER-2單株抗體-特拉卒蘇馬柏(trastuzumab)，已被引導為對抗原始致癌基因受體HER2/neu，並在乳癌中達到改善的臨床反應及整體存活率(Lin et al., Cancer Res 61:6345-9 (2001))。STI-571，一種可選擇性去活化bcr-abl融合蛋白質之酪胺酸激酶抑制物，STI-571，已被發展治療慢性骨髓白血病，在慢性骨髓白血病中bcr-abl酪胺酸激酶的結構性活化在白血球變形過程中佔有重要角色。此類藥劑被設計為抑制特定基因產物的致癌活性(Fujita et al., Cancer Res 61: 7722-6 (2001))。因此，在腫瘤細胞中一般更新的基因產物可能可作為具潛力的目標以發展新穎抗癌藥劑。事實上，針對導致癌症細胞生長及進行的不正常表現分子的新藥已被證實對某些癌症有效。這種藥包含治療乳癌的赫塞普庭(Herceptin)、慢性骨髓白血病的吉利費克(Glivec(STI571))、及非小細胞肺癌的伊瑞莎(Iressa(ZD1839))。

已知多種分子在攝護腺癌中過度表現，該分子被認定為攝護腺癌的治療目標或指標(Xu *MICAL2-PV* Cancer Res 60: 6568-72 (2000); Luo *MICAL2-PV* Cancer Res 62: 2220-6 (2002))。然而，多數該分子也高度表現於其他主要器官。因此，針對該分子的藥劑可能對腫瘤細胞有毒但亦對其他器官正常生長的細胞有負面影響。

$CD8^+$細胞毒性T淋巴球(CTLs)已被證實可認定來自腫瘤相關抗原(TAAs)的抗原決定部位胜肽，並溶解腫瘤細胞，腫瘤相關抗原(TAAs)經MHC一型分子表現。自從MAGE族為

五、發明說明 (4)

第一個被發現的TAAs，多數其他TAAs被發現用於免疫方法(Boon, Int J Cancer 54: 177-80 (1993); Boon and van der Bruggen, J Exp Med 183: 725-9 (1996); van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991); Brichard et al., J Exp Med 178: 489-95 (1993); Kawakami et al., J Exp Med 180: 347-52 (1994))。有些發現的TAAs現在臨床發展階段上作為免疫治療的標的物。目前為止，被發現的TAAs有MAGE (van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991))、gp100 (Kawakami et al., J Exp Med 180: 347-52 (1994))、SART (Shichijo et al., J Exp Med 187: 277-88 (1998))、及NY-ESO-1 (Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997))。另一方面，已被聲稱專一性過度表現於腫瘤細胞中的基因產物，已知被認為誘導細胞免疫反應的標的物。該基因產物包含p53 (Umano et al., Brit J Cancer 84: 1052-7 (2001))、HER2/neu (Tanaka et al., Brit J Cancer 84: 94-9 (2001))、CEA (Nukaya et al., Int J Cancer 80: 92-7 (1999))等。

TAAs除了在基本及臨床研究有顯著進展(Rosenbeg et al., Nature Med 4: 321-7 (1998); Mukherji et al., Proc Natl Acad Sci USA 92: 8078-82 (1995); Hu et al., Cancer Res 56: 2479-83 (1996))，在腺瘤性癌治療上，如直腸癌，僅有有限的可能TAAs。TAAs大量表現於

五、發明說明 (5)

癌症細胞，同時限於癌症細胞的該表現也可能為免疫治療的標的物。誘導具潛力及專一抗腫瘤免疫反應的新TAAs鑑定被認為可激勵在不同癌症領域的胜肽疫苗策略臨床使用(Boon and can der Bruggen, J Exp Med 183: 725-9 (1996); van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991); Brichard et al., J Exp Med 178: 489-95 (1993); Kawakami et al., J Exp Med 180: 347-52 (1994); Shichijo et al., J Exp Med 187: 277-88 (1998); Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997); Harris, J Natl Cancer Inst 88: 1442-5 (1996); Butterfield et al., Cancer Res 59: 3134-42 (1999); Vissers et al., Cancer Res 59: 5554-9 (1999); van der Burg et al., J Immunol 156: 3308-14 (1996); Tanaka et al., Cancer Res 57: 4465-8 (1997); Fujie et al., Int J Cancer 80: 169-72 (1999); Kikuchi et al., Int J Cancer 81: 459-66 (1999); Oiso et al., Int J Cancer 81: 387-94 (1999))。

來自健康捐贈者的胜肽刺激週邊血液單核細胞(peptide-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBNCs))經多次報導其產生明顯程度的IFN-γ以反應該胜肽，但在HLA-A24或-A0201限制的^{51}Cr-釋放分析中，極少對腫瘤細胞產生細胞毒性(Kawano et al., Cancer Res 60: 3550-8 (2000); Nishizaka et al.,

五、發明說明 (6)

Cancer Res 60: 4830-7 (2000); Tamura et al., Jpn J Cancer Res 92: 762-7 (2001))。然而，HLA-A24及HLA-A0201在日本人及高加索人種中皆為HLA對偶基因之一(Date et al., Tissue Antigens 47: 93-101 (1996); Kondo et al., J Immunol 155: 4307-12 (1995); Kubo et al., J Immunol 152: 3913-24 (1994); Imanishi et al., Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press, Oxford, 1065 (1992); Williams et al., Tissue Antigen 49: 129 (1997))。因此，由此HLAs表現的癌症抗原胜肽可能特別有效於日本人及高加所人種的癌症治療。低親和性CTL的誘導在人體外試驗更已知一般歸因於使用高濃度胜肽，在抗原表現細胞(APCs)上產生高濃度的專一胜肽-MHC複合物，而有效活化該CTL(Alexander-Miller et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 4102-7 (1996))。

【發明說明】

為揭示攝護腺癌的機制及確認新穎診斷用指標及/或藥物目的物以治療該癌症，本發明人等使用整組基因範疇cDNA微陣列晶片(microarray)與雷射微光束微切割術，分析攝護腺癌基因表現的情形。由藥學觀點，抑制致癌基因訊號實質上較易於活化腫瘤抑制效力。因此，本發明人尋找在攝護腺癌細胞中過度表現的基因。

因此，鑑定出在攝護腺癌細胞中過度表現的*MICAL2*與

五、發明說明 (7)

MICAL2 二基因。而且，經小干擾RNAs(siRNAs)轉移感染減緩 *KIAA0750* (攝護腺膠原三級螺旋體基因；*MICAL2-PV* *MICAL2*)與 *KIAA0750* 的分子交互作用攝護腺癌變異體基因； *MICAL2-PV* *MICAL2-PV* 的表現會抑制攝護腺癌細胞的生長。

PCOTH 編碼有100個胺基酸蛋白質，包含一個膠原三級螺旋體重複組，其基因外產物位於細胞膜上。根據北方點漬法，*PCOTH* 的表現僅限於睪丸及攝護腺中。

此外，*PCOTH* 的表現亦限於睪丸中。*PCOTH* 編碼的蛋白質具有一同質於卡波寧區域(calponin domain)的區域，以及含有迪斯托芬(dystrophin)與α-輔肌動蛋白的一肌動蛋白融合區域，該肌動蛋白融合區域在類似斯貝克特林(spectrin)蛋白的氮端以雙融合形式存在。因此，由 *PCOTH* 編碼的蛋白質被預期可與肌動蛋白或其他微管相互作用。該等區域連結肌動蛋白纖維成為肌絲束及肌絲網路。其他該家族成員，如 *PCOTH* 被報導與費曼廷(vimentin) (Suzuki et al., J Biol Chem 277: 14933-41(2002))及rab1 (Weide et al., Biochem Biophys Res Commun 306: 79-86 (2003))相關，費曼廷(vimentin)及rab1為中間媒介絲及細胞骨架的主要物質，在細胞中功能如連結不同組成的絞型蛋白質(scaffold protein)。 *MICAL2-PV* 編碼的蛋白質被預期與攝護腺癌細胞中細胞骨架的架構及細胞形態有關。

五、發明說明（8）

許多抗癌藥物不僅對腫瘤細胞有毒，也毒害正常生長細胞。然而，抑制 *MICAL2-PV* 或*PCOTH* 表現的藥劑可能不會對其他器官產生副作用，因為 *MICAL2-PV* 的正常表現僅限於睪丸而*PCOTH* 的表現限於睪丸及攝護腺，因此，此藥劑可能在治療或預防攝護腺癌中極為重要。

本發明提供 *MICAL2-PV* 與*PCOTH* 的單獨基因，作為攝護腺癌的可能診斷指標及具潛力的標的物，以發展新診斷方法及有效的抗癌藥劑。本發明更進一步提供由該等基因編碼的多胜肽及其產生過程與使用。更特別地說，本發明提供如下數點：

本發明提供新穎人類多胜肽MICAL2-PV與PCOTH或其功能上相同物，其在攝護腺癌細胞中的表現升高。

較佳實體上，MICAL2-PV多胜肽包含序列識別號：3開放讀碼區所編碼的假設編號976胺基酸蛋白質，或序列識別號：5開放讀碼區所編碼的假設編號955胺基酸蛋白質。MICAL2-PV多胜肽較佳包含序列識別號：4或6所編碼的胺基酸序列。本申請案亦提供一分離蛋白質，由至少一部分的 *MICAL2-PV* 多核苷酸序列所編碼，或者由至少15%，更佳為至少25%多核苷酸序列互補於序列識別號：3或5所編碼者。

較佳實體上，PCOTH多胜肽包含100個假設編號胺基酸序列編碼於序列識別號：2（基因銀行登錄號AB113650）。PCOTH由序列識別號：1開放讀碼區所編碼，含有一膠原三級螺旋體重複組（第1圖C）。本申請案亦提供一分離蛋白

五、發明說明 (9)

質，由至少一部分的*PCOTH* 多核苷酸序列所編碼，或者由至少30%，更佳為至少40%多核苷酸序列互補於序列識別號：1所編碼者(*LOC221179* (XP_167955))。

本發明更提供一種新穎人類基因*MICAL2-PV* ，其表現在絕大多數攝護腺癌中有顯著的升高，相較於對應的非癌症攝護腺管道上皮細胞。該*MICAL2-PV* 分離基因包含序列識別號：3或5所編碼的多核苷酸序列。特別是*MICAL2-PV* cDNA包含6805個核苷酸，其中有2928個核苷酸的開放讀碼區(序列識別號：3)，或該cDNA包含6742個核苷酸，其中有2865個核苷酸的開放讀碼區(序列識別號：5)。本發明更涵蓋多種多胜肽，其可雜交及至少有30%，更佳為至少40%多核苷酸序列互補於序列識別號：3或5所編碼者，達到其可編碼MICAL2-PV蛋白質或其功能上相同物。該多核苷酸會衰敗，成為由序列識別號：3或5所編碼的MICAL2-PV對偶突變物。

本發明提供一分離多核苷酸，其編碼新穎人類蛋白質PCOTH，PCOTH的表現亦顯著升高於絕大多數攝護腺癌中，相較於對應的非癌症攝護腺管道上皮細胞。該分離的多核苷酸編碼由序列識別號：2的100個胺基酸所組成之多胜肽。更專一地說，該分離的多核苷酸包含序列識別號：1的第332個至第631個核苷酸序列。本發明更包含多種多胜肽，其可雜交及至少有30%，更佳為至少40%多核苷酸序列互補於序列識別號：1所編碼者，達到其可編碼PCOTH蛋白質或其功能上相同物。該多核苷酸會衰敗，成為由序列識

五、發明說明（10）

別號：1所編碼的PCOTH對偶突變物。

在此所使用的分離基因為多核苷酸，其於結構上不同於任何自然生成的多核苷酸或自然生成的基因多核苷酸的任何跨越多於三個個別基因部分結構。因此，其包含如：(a) 一DNA，其具有在自然生成有機物的整組基因中的部分自然生成的基因組DNA分子序列；(b) 一多核苷酸，併入載體或原核或真核生物的基因組DNA，以使併入後所得分子不同於任何自然生成的載體或基因組DNA；(c) 一分離分子，如cDNA，一基因片段，由聚合酶鏈反應(PCR)生成的片段，或一限制酶片段；及(d) 一重組核苷酸序列，其為雜交基因的一部分，即編碼融合多胜肽的基因。

一方面，本發明提供一分離多核苷酸，其編碼本案所述的多胜肽或其片段。該分離多胜肽較佳包含一核苷酸序列，其為至少60%相同於序列識別號：1，3或5的核苷酸序列。該分離核酸分子更佳為至少65%，70%，75%，80%，85%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%或更高相同於序列識別號：1，3或5的核苷酸序列。如果一分離多核苷酸較長於或相等於參照的序列，如序列識別號：1，3或5，以該參照序列的全長作為比較。如果該分離多核苷酸較短於參照的序列，如短於序列識別號：1，3或5，以該參照序列的相等長度部分作為比較(同質性計算所需的環狀部分除外)。

本發明亦提供一製造蛋白質的方法，藉由編碼MICAL2-PV或PCOTH蛋白質的多核苷酸序列轉感染或轉形寄

主細胞，然後表現該多核苷酸序列。本發明還提供含有編碼MICAL2-PV或PCOTH蛋白質之核苷酸序列的載體，及使編碼MICAL2-PV或PCOTH蛋白質之核苷酸序列表現的寄主細胞。該載體及寄主細胞可使用於製造MICAL2-PV或PCOTH蛋白質。

本發明亦提供一辨別MICAL2-PV蛋白質的抗體。本發明還提供 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的反義股多核苷酸(如反義股DNA)、核酶及siRNA(小干擾RNA)。

本發明更進一步提供攝護腺癌診斷方法，其包含由個體中確認生物樣本的表現程度，比照正常樣本中 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的表現程度，及定義出 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的高表現程度顯示該個體正發展攝護腺癌或為其危險群。

本發明亦提供一化合物篩選方法，以治療或預防攝護腺癌，該方法包含使MICAL2-PV或PCOTH多胜肽接觸測試化合物，選出融合於MICAL2-PV或PCOTH多胜肽、或改變MICAL2-PV或PCOTH多胜肽的生物活性的測試化合物。

本發明亦進一步提供一化合物篩選方法，以治療或預防攝護腺癌，該方法包含使表現MICAL2-PV或PCOTH多胜肽的細胞接觸測試化合物，或導入含有 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 上游基因轉錄調節區域之報告基因的載體，然後選出抑制MICAL2-PV或PCOTH多胜肽表現程度的測試化合物。

另外，本發明提供一化合物篩選方法，以治療或預防攝護腺癌，該方法包含在測試化合物存在下，使

五、發明說明 (12)

MICAL2-PV與肌動蛋白接觸，選出抑制MICAL2-PV與肌動蛋白融合的測試化合物。

本申請案亦提供一治療或預防攝護腺癌的醫藥組合物，該醫藥組合物可為抗癌藥劑。該醫藥組合物可有反義股硫寡核苷酸的至少一部分、siRNA、或對序列識別號: 3, 5或1所示之MICAL2-PV或PCOTH多胜肽序列的核酶。適當的siRNA為選自序列識別號: 23及27的序列。*MICAL2-PV* siRNA的目標序列包含序列識別號: 27核苷酸序列，*PCOTH* siRNA的目標序列包含序列識別號: 23核苷酸序列。根據本發明，兩者皆可較佳選為目標物，以治療或預防攝護腺癌。該醫藥組合物亦可包含選自該化合物篩選方法，以治療或預防如攝護腺癌的細胞增殖疾病。

該醫藥組合物的作用過程期望能抑制如攝護腺癌細胞的癌症細胞增長。該醫藥組合物可提供給如人類及家畜哺乳動物的哺乳類動物。

本發明更提供治療或預防攝護腺癌的方法，係使用本發明所提供之醫藥組合物。

本發明還提供治療或預防癌症的方法，其包含投予MICAL2-PV或PCOTH多胜肽的步驟。投予MICAL2-PV或PCOTH多胜肽預期可誘導抗腫瘤免疫反應。因此，本發明亦提供誘導抗腫瘤免疫反應的方法，及治療或預防癌症的醫藥組合物，其含有MICAL2-PV或PCOTH多胜肽。

上述之本發明及下列詳述之說明皆為本發明之較佳實施例，但本發明並非限制於此或限制本發明之其他實施

五、發明說明（13）

例。

【實施方式】

本文中使用之'一'、'該'意指'至少一個(種)'，除非有特明指出者。

為揭示攝護腺癌的機制及確認新穎診斷用指標及/或藥物目的物以治療該癌症，本發明人等使用整組基因範疇cDNA微陣列晶片與雷射微光束微切割術，分析攝護腺癌基因表現的情形。因此，鑑定出特定在攝護腺癌細胞中過度表現的*PCOTH*與*MICAL2-PV*二基因。而且，小干擾RNAs(siRNAs)抑制*PCOTH*或*MICAL2-PV*基因表現導致癌症細胞顯著的生長抑制。此等發現顯示PCOTH與MICAL2-PV使癌症細胞具有致癌活性，而且抑制該蛋白質活性可作為治療及預防如攝護腺癌的增殖型疾病的策略。

MICAL2-PV

根據本發明，具有相似序列的二基因為相同者，並認為編碼具有1124個胺基酸的MICAL2相異體。相較於非癌症攝護腺管道上皮細胞，該二基因的表現在攝護腺癌中有顯著的升高。該定義的相異體與MICAL2在3'端編碼區相異。因此，該二新穎人類基因稱為'*MICAL2*攝護腺癌變異體(*MICAL2-PV*)'。該長型變異體的cDNA含有6805個核苷酸，具有一2928個核苷酸的開放讀碼區(序列識別號:3)，該短型變異體含有6742個核苷酸，具有一2865個核苷酸的開放讀碼區(序列識別號:5)。該開放讀碼區各自編碼推測為976胺基酸蛋白質及推測為955胺基酸蛋白質。編

五、發明說明 (14)

碼 *MICAL2-PV* 的蛋白質具有一同質於卡波寧區域(calponin domain)的區域，以及含有迪斯托芬(dystrophin)與α-輔肌動蛋白的一肌動蛋白融合區域，該肌動蛋白融合區域在類似斯貝克特林(spectrin)蛋白的氮端以雙融合形式存在。因此，由 *MICAL2-PV* 編碼的蛋白質被預期可與肌動蛋白或其他微管相互作用。該等區域連結肌動蛋白纖維成為肌絲束及肌絲網路。

因此，本發明實質上提供編碼該等基因的純多胜肽，包含具有序列識別號: 4或6之胺基酸序列的多胜肽，及其功能上相等物，其需編有MICAL2-PV蛋白質。MICAL2-PV多胜肽功能上相同物包含如對應人類MICAL2-PV蛋白質的其他有機體的同質性蛋白質及人類MICAL2-PV蛋白質的突變體。

本發明中，'功能上相同物' 意指該多胜肽具有促進細胞增殖能力，如MICAL2-PV蛋白質，及使癌症細胞形成致癌活性。該多胜肽是否具有細胞增殖活性，可以導入編碼該多胜肽的DNA至細胞中，以表現該多胜肽及偵測該細胞增殖是否提升或菌群形成活性增加來判斷。該細胞包含如LNCaP、PC3及DU145。另外，該多胜肽是否功能上相同於MICAL2-PV，可自偵測其連結肌動蛋白的活性來判斷。

製備功能上相同於特定蛋白質的方法係熟知於該技藝之人士，包含將突變體導入該蛋白質的已知方法。例如製備功能上相同於人類MICAL2-PV蛋白質，已知可導入經位置導向突變(site-directed mutagenesis)的該蛋白質適

五、發明說明 (15)

當突變的胺基酸序列(Hashimoto-Gotoh et al., Gene 152:271-5 (1995); Zoller and Smith, Methods Enzymol 100: 468-500 (1983); Kramer et al., Nucleic Acids Res. 12:9441-9456 (1984); Kramer and Fritz, Methods Enzymol 154: 350-67 (1987); Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82: 488-92 (1985); Kunkel, Methods Enzymol 85: 2763-6 (1988))。胺基酸突變體也可自然產生。本發明的多胜肽包含具有人類MICAL2-PV蛋白質的胺基酸序列，其中一或多個胺基酸突變，但前提為所得突變多胜肽為功能上相同於人類MICAL2-PV蛋白質。該突變胺基酸的數目一般為10個胺基酸或更多，較佳為6個胺基酸或更多，更佳為3個胺基酸或更多。

突變或修飾的蛋白質，某一胺基酸序列經取代、缺失、插入及/或加入一或多個胺基酸所修飾的胺基酸序列的蛋白質皆已知保留原始生物活性(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81: 5662-6 (1984); Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 10:6487-500 (1982); Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 79: 6409-13 (1982))。

突變的胺基酸較佳為突變為不同胺基酸，但仍被保留該胺基酸側鏈的性質(該過程已知為保留型胺基酸取代)。該胺基酸側鏈的性質如斥水性胺基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)，親水性胺基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)，及一般具有下列官能基或特性者：脂族側鏈

五、發明說明 (16)

(G、A、V、L、I、P)；含氫氧基的側鏈(S、T、Y)；含硫原子的側鏈(C、M)；含羧基及醯胺基的側鏈(D、N、E、Q)；含鹼基的側鏈(R、K、H)；及含芳香族的側鏈(H、F、Y、W)。該單字母為胺基酸的字母代碼。

加至人類MICAL2-PV蛋白質胺基酸序列的一或多個胺基酸的多胜肽例，為具有人類MICAL2-PV蛋白質的融合蛋白。融合蛋白為融合人類MICAL2-PV蛋白質及其他多胜肽或蛋白質，涵蓋於本發明中。融合蛋白可由熟知該項技藝者所製造，如經由連結編碼本發明人類MICAL2-PV蛋白質的DNA與編碼其他其他多胜肽或蛋白質的DNA，因此其結構吻合，將該融合DNA插入表現載體並在寄主中表現。本發明蛋白質所連結的胜肽或蛋白質沒有限制。

可連結於本發明蛋白質的已知胜肽如FLAG (Hopp et al., Biotechnology 6: 1204-10 (1988))、含有六個組織胺酸體的6xHis、10xHis、流行性感冒凝集素(HA)、人類c-myc片段、VSP-GP片段、p18HIV片段、T7-標記、HSV-標記、E-標記、SV40T抗原片段、lck標記、α-微管蛋白片段、B-標記、蛋白質C片段等。可能連結於本發明蛋白質的蛋白質如GST(穀胱甘肽-硫-轉移酶)、流行性感冒凝集素(HA)、免疫球蛋白固定區域、β-半乳糖苷酶、MBP(麥芽糖連結蛋白質)等。

融合蛋白質可由商業上可獲得DNA、上述編碼融合胜肽或蛋白質，與編碼本發明多胜肽的DNA融合所製得，再表現製得的融合DNA。

五、發明說明 (17)

另一習知方法分離功能上相同的多胜肽，如使用雜交技術的方法(Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989))。一習知技術可迅速分離具高同質性的DNA與編碼人類MICAL2-PV蛋白質的全部或部分DNA序列(序列識別號:3或5)，及可自分離的DNA中分離功能上相同於人類MICAL2-PV蛋白質的多胜肽。本發明的多胜肽包含與人類MICAL2-PV蛋白質的全部或部分DNA雜交的DNA所編碼的多胜肽，及功能上相同於人類MICAL2-PV蛋白質的多胜肽。該多胜肽包含對應於人類蛋白質的哺乳類同質體(如由猴、鼠、兔及牛基因所編碼的多胜肽)。在分離一動物cDNA高度同質於人類MICAL2-PV蛋白質所編碼的DNA，較佳使用睪丸組織。

在分離一編碼功能上相同於人類MICAL2-PV蛋白質的多胜肽的DNA時，其雜交條件可由熟知該項技藝者例行選擇。例如，雜交可使用快速雜交緩衝液(Amersham LIFE SCIENCE)在68℃進行預雜交30分鐘或更長，加入標記的探針，在68℃下進行1小時或更長。接下來的清洗步驟可在低嚴謹條件下進行。低嚴謹條件如42℃、2X SSC、0.1% SDS，或較佳50℃、2X SSC、0.1% SDS。使用高嚴謹條件更佳。高嚴謹條件如室溫下以2X SSC、0.01% SDS清洗3遍20分鐘，然後37℃以1X SSC、0.1% SDS清洗3遍20分鐘，再50℃以1X SSC、0.1% SDS清洗2遍20分鐘。然而，多種因素會影響雜交的嚴謹度，如溫度與鹽度，熟知該項技藝

五、發明說明 (18)

者可適當選擇該因素以達到所需嚴謹度。

雜交時，可使用基因放大法如聚合酶鏈反應(PCR)以分離編碼功能上相同於人類MICAL2-PV蛋白質的多胜肽的DNA，其中使用的引子為由編碼DNA(序列識別號: 3或5)的蛋白質序列所合成。

經上述雜交技術或基因放大技術分離的DNA所編碼的功能上相同於人類MICAL2-PV蛋白質的多胜肽，一般具有與人類MICAL2-PV蛋白質的胺基酸序列的高同質性。'高同質性'典型為40%或更高的同質性，較佳為60%或更高的同質性，更佳為80%或更高的同質性，甚至更佳為95%或更高的同質性。多胜肽的同質性可依據'Wilbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30 (1983)'的規則系統鑑定。

本發明的多胜肽在胺基酸序列上、分子量、等電位點、有無糖鏈、或型式上可具有變異性，根據生成該多胜肽的細胞或寄主或所使用的純化方法。然而，只要其功能上相同於本發明之人類MICAL2-PV蛋白質，即在本發明範圍內。

本發明的多胜肽可由熟知該項技藝者製成重組蛋白質或自然蛋白質。重組蛋白質可經由將一編碼本發明多胜肽的DNA(如具有序列識別號: 3或5核苷酸序列的DNA)插入適當的表現載體，將該載體導入適當寄主細胞，獲取萃取液，及將該萃取液注入層析法以純化該多胜肽，如離子交換層析法、反向層析法、使用管柱含有對抗本發明蛋白質

五、發明說明 (19)

的抗體或結合一種以上上述管柱層的膠質過濾或親和性層析法。

當本發明多胜肽在寄主細胞(如動物細胞及大腸桿菌)中表現與穀胱甘肽-硫-轉移酶為融合蛋白質或為多個組織胺酸加入的重組蛋白質，該表現的重組蛋白質可以穀胱甘肽管柱或鎳管柱純化。或當本發明多胜肽以c-myc、多個組織胺酸或FLAG標記的蛋白質表現時，可使用C-MYC、His或FLAG偵測及純化。

該融合蛋白質被純化後，亦可以所需的凝血酶或Xa因子切割以排除除目的多胜肽以外的區域。

自然蛋白質可由熟知該技藝者所純化，如使含有抗體連結如下所述的MICAL2-PV蛋白質的親和性管柱，與本發明多胜肽所表現的組織或細胞萃取物接觸。該抗體可為多株抗體或單株抗體。

本發明亦包含本發明多胜肽的部分胜肽。該部分胜肽為本發明多胜肽的特定胺基酸序列，包含至少7個胺基酸，較佳為8個或更多胺基酸，更佳為9個或更多胺基酸。該部分胜肽可使用於如製備對抗本發明多胜肽的抗體，篩選連結於本發明多胜肽的化合物，及篩選本發明多胜肽的加速物或抑制物。

本發明的部分胜肽可由基因工程製造，胜肽合成已知方法製造，或由適當肽酶分解本發明多胜肽所製得。胜肽的製造可使用固體合成或液體合成。

本發明更進一步提供編碼如上述MICAL2-PV蛋白質的

五、發明說明（20）

多核苷酸。本發明多核苷酸可用於生體內或試管內製造上述的本發明多胜肽，或可用於因編碼本發明蛋白質的基因不正常所導致之疾病的基因治療。任何本發明多核苷酸的型態皆可使用，只要其編碼本發明多胜肽，包括mRNA、RNA、cDNA、基因組DNA、化學合成的多核苷酸。本發明多核苷酸包含一特定核苷酸序列及分解序列的DNA，只要所得DNA編碼本發明MICAL2-PV多胜肽。

本發明多核苷酸可以熟知該技藝人士所知方法製得。如本發明多核苷酸可由表現本發明多胜肽的細胞獲得cDNA基因庫，以本發明DNA部分序列（如序列識別號：3或5）為探針雜交，獲得該多核苷酸。cDNA基因庫可以Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)所述方法製得。亦可使用商業上可獲得的cDNA基因庫。cDNA基因庫亦可由表現本發明多胜肽的細胞萃取RNA，以本發明該DNA序列（如序列識別號：3或5）合成寡DNA，以該寡DNA為探針進行PCR，放大編碼本發明蛋白質的cDNA。

經由序列分析所得cDNA的核苷酸，由該cDNA編碼區域的轉譯作用可例行性確認，本發明多胜肽的胺基酸序列可容易獲得。而且經由該所得cDNA或其部分做為探針而篩選基因組DNA基因庫，該基因組DNA可被分離。

本發明目的多胜肽表現時，mRNA可能是第一個由細胞、組織或器官（如睪丸）所獲得者。mRNA可以習知方法分離，例如整段RNA以胍超離心法(Chirgwin et al.,

五、發明說明 (21)

Biochemistry 18: 5294-9 (1979))或AGPC方法(Chromczynski and Sacchi, Anal Biochem 162: 156-9 (1987))取得。mRNA可使用mRNA純化套組(Pharmacia)等由整段mRNA中純化。或者mRNA可由快速製備mRNA純化套組(Pharmacia)直接純化。

所得mRNA使用於反轉錄酶合成cDNA。CDNA可由商業套組所合成，如AMV反轉錄酶第一股cDNA合成套組(Seikagaku Kogyo)。或者cDNA由5'-RACE方法(Frohman et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 8998-9002 (1988); Belyavsky et al., Nucleic Acids Res 17: 2919-32 (1989))合成及放大，其使用引子及如此所述的5'-Ampli FINDER RACE 套組(Clontech)及聚合酶鏈反應(PCR)。

所欲DNA片段由PCR產物所獲得，並與載體DNA黏結。該重組載體用於轉形大腸桿菌等，所欲重組載體由選擇的菌群中獲得。該所欲DNA的核苷酸序列可由習知方法驗證，如雙去氧核苷酸鏈終止作用。

本發明多胜肽的核苷酸序列可考慮表現的寄主的密碼子使用量頻率，以使其有效率地表現(Grantham et al., Nucleic Acids Res 9: 43-74 (1981))。本發明多核苷酸序列可經商業套組或習知方法改變。例如，可經限制酶分解改變該序列，插入一合成寡核苷酸或一適當多核苷酸片段，加入一連接物，或插入起始密碼子(ATG)及/或終止密碼子(TAA、TGA、TAG)。

五、發明說明（22）

本發明多胜肽特別包含具序列識別號：3或5核苷酸序列的DNA。

本發明更提供一多核苷酸，其在嚴謹條件下與具有序列識別號：3或5核苷酸序列的多核苷酸雜交，並編碼有功能上相同於本發明上述MICAL2-PV蛋白質的多胜肽。熟知該技藝者可適當選擇該嚴謹條件。例如可使用低嚴謹條件。較佳使用高嚴謹條件。該條件如上述。上述雜交DNA較佳為cDNA或染色體DNA。

本發明亦提供一多核苷酸，其互補於編碼人類MICAL2-PV蛋白質的多核苷酸（序列識別號：3或5）或其互補股，其包含至少15個核苷酸。本發明多核苷酸較佳為專一性與編碼本發明MICAL2-PV多胜肽的DNA雜交。該'專一性雜交'指在一般雜交環境下，不明顯與編碼其他蛋白質的DNA相互雜交，較佳在嚴謹雜交環境下。該多核苷酸包含探針、引子、核苷酸及核苷酸衍生物（如反義股寡核苷酸及核酶），此等與編碼本發明多胜肽或其互補股的DNA專一性雜交。該多核苷酸可使用於DNA晶片的製造。

PCOTH

本發明的另一基因，*PCOTH*，已知特定表現於攝護腺癌細胞，相較於非癌症細胞。該基因為*LOC221179*（XP_167955）。然而，*PCOTH*編碼序列識別號：2（GenBank Accession No. AB113650）中的100個胺基酸蛋白質，該序列識別號：2編碼於序列識別號：1的開放閱讀架構中300個核苷酸，而該序列識別號：1並不相同於已知

五、發明說明 (23)

LOC221179 (XP_167955)。PCOTH包含一膠原三級螺旋體重複組，其外基因產物在細胞膜上(第1圖)。因此該基因被稱為'攝護腺膠原三級螺旋體'。

本發明提供實質上由基因編碼的純多胜肽及其功能上相同物，包含序列識別號: 2之胺基酸序列的多胜肽，其編碼PCOTH蛋白質及其功能上相同物應短於 *LOC221179* (XP_167955)編碼的整段胺基酸序列。PCOTH功能上相同物如對應人類PCOTH蛋白質的其他有機體的同質蛋白質及人類PCOTH蛋白質的突變體。較佳人類PCOTH蛋白質的突變體為含有序列識別號: 2之胺基酸序列的蛋白質，其中一或多個胺基酸被取代及/或缺失。

本發明中，'功能上相同物' 意指該多胜肽具有促進細胞增殖能力，如PCOTH蛋白質，及使癌症細胞形成致癌活性。該多胜肽是否具有細胞增殖活性，可以導入編碼該多胜肽的DNA至細胞中，以表現該多胜肽及偵測該細胞增殖是否提升或菌群形成活性增加來判斷。該細胞包含如LNCaP、PC3及DU145。

在上述'MICAL2-PV'的相同方法可用於製備該PCOTH蛋白質及其功能上相同物，使用序列識別號: 1及2的序列資訊。

本發明更提供編碼上述PCOTH多胜肽的多核苷酸。本發明多核苷酸可用於生體內或試管內製造上述的本發明多胜肽，或可用於因編碼本發明蛋白質的基因不正常所導致之疾病的基因治療。任何本發明多核苷酸的型態皆可使

五、發明說明 (24)

用，只要其編碼本發明多胜肽，包括mRNA、RNA、cDNA、基因組DNA、化學合成的多核苷酸。本發明多核苷酸包含一特定核苷酸序列及分解序列的DNA，只要所得DNA編碼本發明PCOTH多胜肽。該多核苷酸可根據上述' MICAL2-PV'相似方法及使用序列識別號: 1及2的序列資訊製得。

相異於MICAL2-PV，PCOTH的正常表現可在睪丸及攝護腺中發現。因此為製得PCOTH或其功能上相同物，或PCOTH的mRNA，除睪丸組織外，亦可使用攝護腺組織。

載體及寄主細胞

本發明亦提供本發明多核苷酸所導入的載體及寄主細胞。本發明載體有效於使寄主細胞中的本發明多核苷酸，如DNA，表現本發明多胜肽，或在基因治療中使用本發明多核苷酸。

當大腸桿菌為寄主細胞，而載體在大腸桿菌中放大及大量製造(如JM109、DH5α、HB101、或XL1Blue)，該載體應具有'ori'基因區域使在大腸桿菌中放大，及標誌基因(marker gene)以篩選大腸桿菌(如抗藥性基因，可以安比西林、四環黴素、康納黴素、氯黴素等篩選)。例如M13-系載體、pUC-系載體、pBR322、pBluescript等。pGEM-T、pDIRECT及pT7亦可使用於傳代無性繁殖(subcloning)及萃取cDNA與上述載體。用於製造本發明蛋白質的載體，以表現型載體特別有用。例如表現於大腸桿菌的表現型載體，應具有上述特徵於大腸桿菌中放大。當如JM109、DH5α、HB101、或XL1Blue為寄主細胞時，該載

五、發明說明 (25)

體應具有啟動子，如lacZ啟動子(Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989)；FASEB J 6: 2422-7 (1992))、araB啟動子(Better et al., Science 240: 1041-3 (1988))、T7啟動子等，可在大腸桿菌中有效表現所欲的基因。因此，上述載體可取代如Pgex-5X-1 (Pharmacia)、'QIAexpress system' (Qiagen)、pEGFP及pET (在此情況下，寄主較佳為表現T7 RNA聚合酶的BL21)。而且該載體亦可包含多胜肽分泌的訊號序列。引導多胜肽分泌於大腸桿菌核外漿的典型訊號序列為pelB訊號序列(Lei et al., Bacteriol 169: 4379 (1987))。使載體導入目標寄主細胞的方法包含如氯化鈣方法及電極穿孔法。

除大腸桿菌，其他表現型載體亦可使用於引導本發明多胜肽，如衍生自哺乳類的表現型載體(如pcDNA3 (Invitrogen)及pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18 (17): 5322 (1990))、pEF、pCDM8)；衍生自昆蟲細胞的表現型載體(如'Bac-to-BAC桿狀病毒表現系統'(GIBCO BRL)、pBacPAK8)；衍生自植物的表現型載體(如pMH1、pMH2)；衍生自動物病毒的表現型載體(如pHSV、pMV、pAdexLcw)；衍生自反轉錄病毒的表現型載體(如pZIpneo)；衍生自酵母菌的表現型載體(如'Pichia 表現套組' (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)；及衍生自枯草桿菌的表現型載體(如pPL608、pKTH50)。

為在動物細胞(如CHO、COS或NIH3T3)中表現載體，該

五、發明說明 (26)

載體應具有必須載該細胞中表現的啟動子，如SV40啟動子(Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979))、MMLV-LTR啟動子、EF1α啟動子(Mizushima et al., Nucleic Acid Res 18: 5322 (1990))、CMV啟動子等，較佳有篩選轉形體的指標基因(如藥物篩選的抗藥基因(如新黴素、G418))。已知具有該特徵的載體如pMAM、pDR2、pBR-RSV、pBK-CMV、pOPRSV及pOP13。

製造多胜肽

本發明還提供製造本發明多胜肽的方法。該多胜肽可由培養含有編碼該多胜肽的基因的表現型載體的寄主細胞所獲得。依據所需，可使用穩定表現基因，同時放大細胞中該基因的複製數目的方法。例如，可將含有互補DHFR(如pCHO I)的載體導入缺少核酸合成路徑的CHO細胞中，然後以胺甲喋呤(methotrexate: MTX)放大。如果為使基因短暫表現，可將含有SV40 (pcD等)複製原始區的載體轉形至染色體上含有SV40 T抗原表現基因的COS細胞中。

上述所得的本發明多胜肽可自寄主細胞內或外(如培養基)中分離純化，為實質上純化同質性多胜肽。在此所使用的'實質上純化'對特定多胜肽而言，意指該多胜肽實質上沒有其他生物大分子。該實質上純化多胜肽為至少75%(至少80、85、95、或99%)純化乾重。純化可以任何適當標準方法測量，如管柱層析法、聚乙醯胺膠電泳法、或HPLC分析。多胜肽分離及純化法不限於任何特定方法。事

五、發明說明 (27)

實上，任何標準方法皆可使用。

可適當選擇組合如管柱層析法、過濾、超微過濾法、鹽沉析法、溶劑層析法、蒸餾法、免疫沉析法、SDS-聚乙醯胺膠電泳法、等電位點電泳法、透析法、及再結晶法，以分離純化該多胜肽。

層析法如親和性層析法、離子交換層析法、斥水性層析法、膠過濾法、反向層析法、吸收層析法等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。該層析法可為液態層析法，如HPLC及FPLC。因此，本發明提供由上述方法製得的高度純化多胜肽。

在純化前或後經由適當蛋白質修飾酵素處理，本發明多胜肽可選擇性修飾或部分缺失。有用蛋白質修飾酵素包含胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、賴胺醯內胜肽酶、蛋白激酶、配醣酶等，但不限於此。

抗體

本發明提供一種連接於本發明多胜肽的抗體。本發明抗體可以任何形式使用，如單株抗體或多株抗體，包含由免疫動物而來的抗血清，如注射本發明多胜肽的兔、各種多株及單株抗體、人類抗體及基因重組而成的人化抗體。

將本發明多胜肽作為抗原以獲得抗體，可來自各種動物，但較佳來自哺乳類，如人、鼠、大鼠，較佳為人。人

五、發明說明（28）

衍生的多胜肽可獲自此處揭示的核苷酸或胺基酸。根據本發明，作為免疫抗原的該多胜肽可為完整蛋白質或蛋白質中的部分胜肽。部分胜肽可包含本發明多胜肽的氮端或碳端。

此處抗體定義為與本發明全長或片段多胜肽反應的蛋白質。

編碼本發明多胜肽或其片段的基因可插入已知表現型載體，然後該表現型載體轉形至此述的寄主細胞中。所欲多胜肽或其片段可經由標準方法自寄主細胞外或內復原，隨後可作為抗原。或者整段細胞表現該多胜肽或其溶體或化學合成多胜肽可作為抗原。

任何哺乳動物可以該抗原免疫，但較佳考慮與細胞融合的母細胞相容者。一般使用嚙齒類、兔類、或靈長類動物。齧齒類包含如鼠、兔、倉鼠。兔類包含如兔。靈長類包含如狹鼻猴（舊大陸猴），如狐猴（*Macaca fascicularis*）、恆河猴、狒狒、及黑猩猩。

以抗原免疫動物為習知方法。腹膜間注射或皮下注射抗原為標準免疫動物的方法。抗原可被稀釋及懸浮於適量磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)、物理性生理食鹽水等。如果需要，該抗原懸浮物可與適量標準佐劑混合，如Freud's完整佐劑，作成乳液，再投予哺乳動物。較佳每隔4至21天多次投予混有適量Freud's非完整佐劑。適當載體可能需要。免疫後，以標準方法測量血清中所欲抗體是否增

五、發明說明（29）

加。

抗本發明多胜肽的多株抗體可獲自血清中檢測出所欲抗體增加的免疫動物的血液收集，及以任何習知方法自血液中分離血漿。多株抗體包含含有多株抗體的血清，及可自血清中分離、含有多株抗體的分層。免疫球蛋白G或M可獲自辨識本發明多胜肽的分層，使用如親和性管柱與本發明多胜肽，再以蛋白質A或G管柱進一步純化該分層。

為製備單株抗體，自以抗原免疫的哺乳動物中收集免疫細胞，如上述檢查血清中所欲抗體的增加程度，然後注入細胞融合。用於細胞融合的免疫細胞較佳為來自脾臟。其他較佳用於與免疫細胞融合的母細胞，包含如哺乳動物的骨髓瘤細胞，較佳為具有藥物篩選融合細胞的後天特性的骨髓瘤細胞。

上述免疫細胞及骨髓瘤細胞可依習知方法融合，如Milstein等人的方法(Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))。

獲自該細胞融合的融合瘤可由培養其餘標準篩選培養基中篩選，如HAT培養基(含有次黃鹼、胺基喋呤及胸腺核苷的培養基)。該細胞培養典型在HAT培養基中持續培養數天到數星期，使足以使其他細胞死亡，除所欲融合瘤以外(非融合細胞)。標準的限制稀釋用以篩選及選殖生產所欲抗體的融合瘤細胞。

除上述方法外，將非人的動物以抗原免疫製造融合瘤，人類淋巴球如以EB病毒感染者，可於試管內以多胜

五、發明說明（30）

肽、多胜肽表現細胞或其溶體免疫。其後，該免疫淋巴球與可無限期分裂的人衍生骨髓瘤細胞融合，如U266，以產生生產所欲人類抗體的融合瘤，該融合瘤可連接於該多胜肽（未公開日本專利申請案(JP-A) Sho 63-17688）。

所得融合瘤隨後移植到鼠腹腔，收取腹水。所得單株抗體可以如硫酸銨沉澱法、蛋白質A或蛋白質G管柱、DEAE離子交換層析法或具有本發明多胜肽的親和性管柱而純化。本發明抗體可用於純化及偵測本發明多胜肽，及可能為本發明多胜肽的促效藥與對抗藥。該抗體可用於抗體治療，以治療本發明多胜肽相關疾病。當該抗體投予人體（抗體治療）時，較佳使用人類抗體或人型化抗體，可降低免疫反應的發生。

例如具有人抗體基因的轉殖動物可以選自多胜肽、多胜肽表現細胞或其溶體免疫。抗體製造細胞隨後自動物中收集，與骨髓瘤細胞融合為融合瘤，從中可獲得抗該多胜肽的人類抗體（見WO92-03918、WO93-2227、WO94-02602、WO94-25585、WO96-33735、WO96-34096）。

或者如免疫淋巴球製造抗體的免疫細胞可能因致癌基因而不朽，而用於製造單株抗體。

因此所得單株抗體亦可以基因工程技術（如Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, Published in the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)）重組製得。如編碼抗體的DNA可自免疫細胞中選殖，如製造抗體的融合瘤或免

五、發明說明 (31)

疫淋巴球，將該DNA插入適當載體，導入寄主細胞，製備重組抗體。本發明亦提供如上製備的重組抗體。

本發明抗體可為抗體的一部分或修飾抗體，只要該抗體可連接於一或多個本發明多胜肽。例如，該抗體片段可為Fab、F(ab')2、Fv或單鏈Fv (scFv)，其中來自重鏈與輕鏈的Fv片段由適當連接物連接(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。將抗體以酵素處理可產生抗體片段，如木瓜酵素或胃蛋白酶。或者建構編碼該抗體片段的基因，將其插入一表現型載體，在適當寄主細胞中表現(如Co et al., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, METHODS Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991))。

抗體可連接不同分子而修飾，如聚乙烯甘油(PEG)。本發明提供該修飾抗體。該修飾抗體可為化學修飾。該修飾方法為習知。

或者，本發明抗體可為鑲嵌型抗體，如來自非人類抗體的變異區域及來自人類抗體的恆定區，或可為人化抗體，包含來自非人類抗體的互補確定區域(CDR)、來自人類抗體的架構工作區域(FR)及恆定區。該抗體可以已知方法製得。

五、發明說明 (32)

上述所得抗體可純化至同質狀態。例如該抗體的分離及純化可依據分離及純化一般蛋白質的方法。該抗體可經由適當選擇與混合使用的管柱層析法而分離，如親和性層析法、過濾、超微過濾層析法、鹽析、透析、SDS聚乙醯氨膠電泳及等電位焦距(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))，但不限於此。蛋白質A管柱及蛋白質G管柱可使用於親和性管柱。蛋白質A管柱可用於如Hyper D、POROS及Sepharose F.F. (Pharmacia)。

除親和性層析法外，層析法可使用如離子交換層析法、斥水性層析法、膠過濾法、反向層析法、吸收層析法等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。該層析法可為液態層析法，如HPLC及FPLC。

吸收性的測量可使用如酵素連結免疫吸收分析法(ELISA)、酵素免疫分析法(EIA)、輻射免疫分析法(RIA)及/或免疫螢光法，以測量本發明抗體的抗體連接活性。使用ELISA時，本發明抗體固定於盤中，將本發明多胜肽置入該盤，然後加入含有所欲抗體的樣本，如抗體製造細胞的培養懸浮液或純化抗體。然後，加入以酵素標記可辨識第一抗體的第二抗體，如磷酸鹽，培養該盤。清洗後，加入酵素基質，如磷酸鄰硝基苯，測量其吸光度以預測該

五、發明說明 (33)

樣本的抗體連接活性。該多胜肽片段，如碳端或氮端，可作為抗體以預測該抗體連接活性。本發明可使用BIAcore (Pharmacia)預測該抗體連接活性。

上述方法經由暴露本發明抗體於假設含有本發明多胜肽的樣本中，偵測或測量由該抗體及多胜肽組成的免疫複合體，可偵測或測量本發明多胜肽。

由於本發明的多胜肽偵測或測量方法可特定地偵測或測量一多胜肽，該方法可能有效於使用該多胜肽的各種試驗中。

反義股多核苷酸、小干擾RNAs及核酶

本發明包含一反義股寡核苷酸，其與序列識別號: 1、3及5核苷酸序列內任一部分雜交。該反義股寡核苷酸較佳為反序列識別號: 1、3及5核苷酸序列的至少15個連續核苷酸。更佳為在上述至少15個連續核苷酸中包含起始密碼子的上述反義股寡核苷酸。

反義股寡核苷酸的衍生物或修飾產物亦可作為反義股寡核苷酸。該修飾產物包含如甲基磷酸型或乙基磷酸型的低烷基磷酸修飾物、硫化磷修飾物及醯氨磷修飾物。

該'反義股寡核苷酸'意指對應於其所形成的DNA或mRNA特定區域的核苷酸為完全互補的反義股寡核苷酸，其亦可有一或多個核苷酸不吻合，但該DNA或mRNA及該反義股寡核苷酸可專一性地與序列識別號: 1、3及5核苷酸序列雜交即可。

該' 至少15個連續核苷酸序列區域'的多核苷酸包含

五、發明說明 (34)

至少70%或更高的同質性，宜為至少80%或更高的同質性，較佳為至少90%或更高的同質性，更佳為至少95%或更高的同質性。此處所述可用於鑑定同質性。本文中已知可用於鑑定同質性。該反義股寡核苷酸的衍生物或修飾產物亦可作為本發明反義股寡核苷酸。該修飾產物包含如甲基磷酸型或乙基磷酸型的低烷基磷酸修飾物、硫化磷修飾物及醯氨磷修飾物。

該反義股多核苷酸有用為探針，以分離或偵測編碼本發明多胜肽的DNA，或作為引子用於放大。

本發明的反義股寡核苷酸衍生物與生產本發明多胜肽的細胞作用，經結合編碼該多胜肽的DNA或mRNA，抑制其轉錄或轉譯，促進該mRNA分解作用及抑制本發明多胜肽的表現，因而抑制該多胜肽功能。

本發明亦包含小干擾RNAs(siRNA)，其包含序列識別號：1、3及5核苷酸序列的一順義股核酸及一反義股核酸的混和物。該抑制MICAL2-PV表現的siRNA包含目標序列識別號：27核苷酸序列的siRNA。該抑制PCOTH表現的siRNA包含目標序列識別號：23核苷酸序列的siRNA。

該’siRNA’指防止目標mRNA轉譯的雙股RNA分子。標準技術為引導siRNA進入細胞，包含DNA作為鑄模以轉錄RNA的siRNA。該siRNA包含編碼人MICAL2-PV或PCOTH蛋白質的多核苷酸(序列識別號：1、3及5)的一順義股核酸及一反義股核酸。該siRNA為單一轉錄本(雙股RNA)具有目標基因的順義股及互補的反義股，如髮夾型。

五、發明說明 (35)

該siRNA的核苷酸序列可使用Ambion網站的siRNA設計電腦軟體製成(http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)。選自該電腦軟體的該siRNA核苷酸序列為基於下列原則：

siRNA目標區域的篩選：

1. 始自該目標轉錄本的起始密碼子AUG，向下掃描AA雙核苷酸序列。紀錄每個AA及其3'端連接的19個核苷酸作為可能siRNA目標位。Tuschl等人建議反針對5'及3'未轉譯區域(UTRs)所設計的siRNA及靠近起始密碼子的區域(75個鹼基以內)可能在調節蛋白質結合位較為豐富。UTR-結合蛋白質及/或轉譯起始複合物可能干擾siRNA內核酶複合物的連接。

2. 比較可能目標位與人類整組基因庫，避免考慮任何目標序列與其他編碼序列的明顯同質性。該同質性搜尋可使用BLAST，可在NCBI網站上找到(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)。

3. 選擇有品質的目標序列予以合成。在Ambion，較佳為依演化的基因長度選擇數個目標序列。

本發明的反義股多核苷酸或siRNA抑制本發明多胜肽，因而有效為抑制本發明多胜肽的生物活性。該反義股多核苷酸與siRNA的長度至少為10個核苷酸，可與自然的轉錄本等長。該反義股多核苷酸與siRNA較佳具有19-25個核苷酸。該反義股多核苷酸與siRNA更佳具有少於75，

五、發明說明 (36)

50，25個核苷酸長度。

含有本發明反義股多核苷酸或siRNA的表現型抑制物，有效於抑制本發明多胜肽的生物活性。因此，一含有本發明反義股多核苷酸或siRNA的組成物有效於治療細胞增殖疾病，如攝護腺癌。

本發明更提供抑制本發明多胜肽的MICAL2-PV或PCOTH表現的核酶。

一般而言，核酶分為大核酶及小核酶。大核酶已知為切斷核酸磷酸酯鍵的酵素。與大核酶反應後，該反應位為一5'-磷酸根及3'-羥基根。大核酶更分為(1) I群插入序列RNA催化轉酯作用，在5'-切割位的鳥嘌呤核苷；(2) II群插入序列RNA催化自體切割，以索套結構的兩步反應；(3) 核糖核酸酶P的RNA，期經由水解切斷tRNA前驅物的5'位。另外，小核酶為約40bp的較小型態，切割RNA以產生5'-羥基及2'-3'環磷酸。榔頭型核酶(Koizumi et al., FEBS Lerr 228: 225 (1988))及髮夾型核酶(Buzayan, Nature 323: 349 (1986); Kikuchi and Sasaki, Nucleic Acids Res 19: 6751 (1992))皆包含於小核酶。設計及建構小核酶的方法皆為習知技藝((Koizumi et al., FEBS Lerr 228: 225 (1988); Koizumi et al., Nucleic Acids Res 17: 7059 (1989); Kikuchi and Sasaki, Nucleic Acids Res 19: 6751 (1992))。因此，抑制本發明多胜肽表現的核酶亦可基於其序列資訊(序列識別號: 1、3或5)及習知方法架構。

五、發明說明（37）

反 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的核酶抑制過度表現MICAL2-PV或PCOTH蛋白質的表現，因此有效於抑制本發明生物活性。因此，該核酶有效於治療或預防攝護腺癌。

診斷攝護腺癌

本發明更提供一診斷細胞增殖疾病如攝護腺癌的方法，使用本發明多胜肽的表現程度為診斷指標。

該診斷方法包含下列步驟：(a)檢查本發明 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的表現程度；及(b)該表現程度升高與攝護腺癌有關。

生物樣本中 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的表現程度可經由定質相關於 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的mRNA或由 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因編碼的蛋白質所預測。mRNA的定質方法為習知技術。例如相關於 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的mRNA量可以北方點漬法或RT-PCR預測。由於 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因全長核苷酸序列顯示於序列識別號：1、3或5，任何熟知該技藝者可設計探針或引子的核苷酸序列以定質 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因。

MICAL2-PV 或 *PCOTH* 基因的表現程度亦可以該基因編碼的蛋白質活性或量分析。確認MICAL2-PV或PCOTH蛋白質量的方法如下。例如免疫分析法有效於確認生物材料的該蛋白質。任何生物材料可作為生物樣本，以確認該蛋白質或其活性，但前提為該指標基因（ *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因）在攝護腺癌病人樣本中表現。例如，攝護腺管道上皮細胞可為該生物樣本。然而，如血液及尿液的體液亦可分

五、發明說明（38）

析。另外，根據分析的任一蛋白質活性，確認由 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因編碼的蛋白質活性可選擇適當方法為之。

生物樣本中 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的表現程度可與正常樣本（來自非疾病體的樣本）比較、預測。當該比較顯示目標基因表現程度較高於正常樣本時，該生物體被認為感染攝護腺癌。正常的生物樣本中 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的表現程度及診斷可同時進行。或者，表現程度的正常範圍可基於分析先前於控制組中收集的樣本中該基因表現程度所得結果，以統計方法確認。比較該樣本體所得結果與正常範圍，當該結果未落於正常範圍內，該樣本體被預測為感染攝護腺癌或在危險群中。

本發明中亦提供診斷如攝護腺癌的細胞增殖疾病的診斷劑。本發明診斷劑包含連接本發明多核苷酸或多胜肽的化合物。與本發明多核苷酸雜交的寡核苷酸或連接本發明多胜肽的抗體較佳作為該化合物。

本診斷攝護腺癌的方法可用於評估一生物體的攝護腺治療效益。根據該方法，一生物樣本，如一測試細胞族群，獲自正在攝護腺癌治療中的生物體。該評估方法可根據習知診斷攝護腺癌方法使用。

如有所需，生物樣本獲自不同時期的生物體，如治療前、中或後。該生物樣本中 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的表現程度隨後被確認，並比較如衍生自含有已知攝護腺癌狀態（如癌症細胞或非癌症細胞）的相關細胞族群。該控制程

五、發明說明（39）

度為未經治療的生物樣本。

如果該控制程度衍生自含有非癌症細胞的生物樣本，該生物體的生物樣本的表現程度與控制程度相似，表示該治療有效。該生物樣本的 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的表現程度與控制程度相異則表示不佳的臨床結果或預期。

'有效'一詞意指該治療導致病理上向上調節基因（*MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因）的表現降低或該生物體的攝護腺癌細胞規模大小、廣泛度或增殖潛能降低。當該治療為預防性施予時，'有效'一詞意指妨礙或預防攝護腺癌的發生。該攝護腺癌的評估有標準臨床步驟。治療的效益更可以習知診斷或治療攝護腺癌的已知方法確認。

本發明診斷攝護腺癌的方法亦可用於評估攝護腺癌生物體的預期，藉由比較病人生物樣本的 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因表現程度，如測試族群，與控制程度。或者來自病人生物樣本的 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因的表現程度可由疾病等級譜測量，以評估該病人的疾病預兆。

MICAL2-PV 或 *PCOTH* 基因表現程度比較正常控制程度的增加表示不樂觀預兆。*MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因表現程度的降低為較佳的預兆。

篩選化合物

使用 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因、該基因編碼的蛋白質或該基因的轉錄調節區域，經由該基因的表現及該基因編碼的多胜肽的生物活性的改變，可篩選該化合物。該化合物被期待作為醫藥以治療或預防攝護腺癌。

五、發明說明 (40)

因此，本發明提供一篩選化合物的方法，使用本發明多胜肽以治療或預防攝護腺癌。該篩選方法的實體包含下列步驟：(a)使測試化合物與本發明多胜肽接觸；(b)偵測測試化合物與本發明多胜肽的結合活性；及(c)篩選連接於本發明多胜肽的化合物。

用於篩選的本發明多胜肽可為重組多胜肽或衍生自自然或其部分胜肽的蛋白質。與測試蛋白質接觸的本發明多胜肽可如純化多胜肽、可溶性多胜肽、連接載體形式或與其他多胜肽融合的融合蛋白質。

如使用本發明多胜肽連接本發明多胜肽的蛋白質篩選方法，可使用多種習知方法。該篩選可特別為如下的免疫沉澱法。編碼本發明多胜肽的基因經插入於表現型載體為外來基因，如pSV2neo、pcDNA I、pCAGGS及pCD8，而在動物細胞中表現。該表現使用的啟動子可為任何一般使用的啟動子，如SV40早期啟動子(Rigby in Williamson (ed.), Genetic Engineering, vol.3 Academic Press, London, 83-141 (1982))、EF-α啟動子(Kim et al., Gene 91: 217-23 (1990))、CAG啟動子(Niwa et al., Gene 108: 193-200 (1991))、RSV LTR啟動子(Cullen, Methods in Enzymology 152: 684-704 (1987))、SRα啟動子(Takebe et al., Mol Cell Biol 8: 466 (1988))、CMV立即早期啟動子(Seed and Aruffo, Proc Natl Acad Sci USA 84: 3365-9 (1987))、SV40晚期啟動子(Gheysen and Fiers, J Mol Appl Genet 1: 385-94 (1982))、腺

五、發明說明 (41)

病毒晚期啟動子(Kaufman et al., Mol Cell Biol 9: 946 (1989))、HSV TK啟動子等。將該基因導入動物細胞以表現外來基因的方法，如電穿孔法(Chu et al., Nucleic Acids Res 15: 1311-26 (1987))、磷酸鈣法(Chen and OKAYAMA, Mol Cell Biol 7: 2745-52 (1987))、DEAE葡聚醣法(Lopata et al., Nucleic Acids Res 12:5707-17 (1984); Sussman and Milman, Mol Cell Biol 4: 1642-3 (1985))、脂費廷法(Lipfectin)(Derijard, B Cell 7: 1025-37 (1994); Lamb et al., Nature Genetics 5: 22-30 (1993); Rabindian et al., Science 259:230-4 (1993))等。本發明多胜肽可表現為融合蛋白，包含一單株抗體的辨識位(epitope)，將具有特定性的單株抗體辨識位導入本發明多胜肽的氮端或碳端。可使用商業上可獲得辨識位抗體系統(Experimental Medicine 13: 85-90 (1995))。可表現融合蛋白質的載體，如β-半乳糖苷酶、麥芽糖酶連接蛋白、穀胱苷酸硫轉移酶、綠螢光蛋白(GFP)等，由於其多選殖位的使用可使用商業上製品。

亦可使用由導入僅含數至12個胺基酸的小辨識位所製得的融合蛋白，但在融合中本發明多胜肽的性質未被改變。辨識位，如聚組織胺酸(His-tag)、流行性感冒凝集HA、人類c-myc、FLAG、胞囊胃炎病毒糖蛋白(VSV-GP)、T7基因10胺基酸(T7-tag)、人類簡單疱疹糖蛋白(HSV-tag)、E-標記(單株期的辨識位)等，與辨識其的單

五、發明說明 (42)

株抗體可作為辨識位-抗體系統，以篩選連接於本發明多胜肽的蛋白質(Experimental Medicine 13: 85-90 (1995))。

在免疫沉澱法中，將該抗體加入經適當清潔劑處理的細胞溶菌產物中，可製得免疫複合物。該免疫複合物包含本發明多胜肽、具有與該多胜肽結合能力的多胜肽、及抗體。免疫沉澱法亦可使用如上述製備的抗本發明多胜肽的抗體，但使用抗上述辨識位的抗體除外。

免疫複合物可經如蛋白質A 瓊脂糖(sepharose)或蛋白質G瓊脂糖沉澱，當該抗體為鼠IgG抗體。如果本發明多胜肽為一具有辨識位的融合蛋白，如GST，免疫複合物可以相同方法使用抗本發明多胜肽的抗體形成，其中使用專一性結合於該辨識位的物質，如穀胱甘肽-瓊脂糖4B。

免疫沉澱法可如下方法或依文獻方法(Harlow and Lane, Antibodies, 511-52, Cold Spring Harbor Laboratory publication, New York (1988))製得。

一般使用SDS-PAGE分析免疫沉澱蛋白質，該連接蛋白質可使用適當濃度膠分析蛋白質分子量。由於該連接本發明多胜肽的蛋白質難以一般染色法偵測，如考馬斯染色法(Coomassie stainning)或銀染法，該蛋白質敏感度的偵測由培養該細胞於含有輻射同位素的培養基中，標記細胞中的蛋白質及偵測該蛋白質，該輻射同位素如硫35甲硫胺酸或硫35半胱胺酸。當清楚蛋白質分子量時，該目標蛋白質可直接自SDS-聚乙醯氨膠中純化並確認其序列。

五、發明說明 (43)

使用多胜肽篩選連接本發明多胜肽的蛋白質的方法，可使用西方點漬法(Skolnik et al., Cell 65: 83-0 (1991))。連接本發明多胜肽的蛋白質可獲自來自細胞、組織、器官的cDNA基因庫(如MICAL2-PV來自睪丸組織，PCOTH來自睪丸或攝護腺)、或期待表現連接於本發明多胜肽的蛋白質的培養的細胞(如LNCaP、PC3、DU145)，其使用噬菌體載體(如ZAP)，而後在LB洋膠上表現該蛋白質，固定表現於濾器上的蛋白質，使上述濾器與純化及標記的本發明多胜肽反應，根據標記偵測該菌斑表現連接於本發明多胜肽的蛋白質。可連接生物素與抗生物素蛋白、特異性連接本發明多胜肽的抗體、或融合於本發明多胜肽的胜肽或多胜肽(如GST)，標記本發明多胜肽。亦可使用輻射線同位素或螢光標記。

或者，本發明的另一篩選方法實體使用雙雜交系統使用細胞('MATCHMAKER Two-Hybrid system', 'Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit', 'MATCHMAKER one-Hybrid system' (clontech); 'HybriZAP Two-Hybrid Vector System' (Stratagene); 參考文獻'Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)','Fields and Stenglanz, Trend Genet 10: 286-92 (1994)')。

在雙雜交系統中，本發明多胜肽與SRF-連接區域或GAL-4連接區域融合，並表現在酵母菌細胞中。一cDNA基因庫由表現連接本發明多胜肽的蛋白質的細胞所製得，因

五、發明說明 (44)

此當表現時，該基因庫與VP16或GAL4轉錄活化區域融合。該cDNA基因庫隨後導入上述酵母菌細胞中，衍生自基因庫的cDNA由偵測的正選殖細胞中分離(當連接本發明多胜肽的蛋白質表現於酵母菌時，該二蛋白質的連接活化報導基因，使正選殖細胞可被偵測)。由該cDNA編碼的蛋白質可將上述分離cDNA導入大腸桿菌並表現該蛋白質。

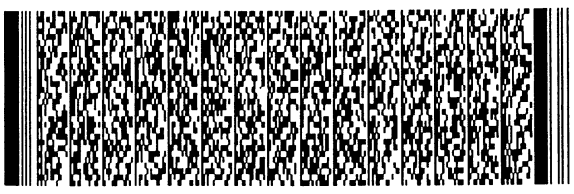
如Ade2基因、lacZ基因、CAT基因、蟲螢光素酶基因等加上HIS3基因，可作為報導基因。

連接本發明多胜肽的化合物亦可經親和性層析法被篩選。例如，本發明多胜肽可能在親和性管柱載體中不移動，將含有可連接於本發明多胜肽的蛋白質的測試化合物加入該管柱。此處的測試化合物可如細胞萃取物、細胞溶菌產物等。在加入該測試化合物後，清洗該管柱，製備連接於本發明多胜肽的化合物。

當該測試化合物為蛋白質時，分析所得蛋白質的胺基酸序列，基於該序列合成寡DNA，將該寡DNA作為探針，篩選cDNA基因庫，以獲得DNA編碼蛋白質。

使用表面胞質遺傳因子聲納現象的生物感應器可使用於偵測或定性本發明的連接化合物。當使用該生物感應器時，本發明多胜肽與測試化合物的交互作用可以表面胞質遺傳因子聲納訊號在真實時間觀察到，僅使用少量多胜肽且無須標記(如BIAcore, Pharmacia)。因此，可使用生物感應器如BIAcore，評估本發明多胜肽與測試化合物的連結。





五、發明說明 (45)

當不移動的本發明多胜肽暴露於合成化合物、或自然物質庫或自由噬菌體胜肽展示庫的篩選分子法，及以結合化學科技使用高通過率的篩選方法(Wrighton et al., Science 273: 458-64 (1996); Verdine, Nature 384: 11-13 (1996); Hogan, Nature 384:17-9 (1996))，以分離連結於本發明多胜肽的蛋白質及化學化合物(包含促效藥及對抗藥)，為習知方法。

本發明另提供一種治療或預防攝護腺癌的化合物的篩選方法，其中使用本發明多胜肽，包含下列步驟：

(a)使該測試化合物與本發明多胜肽接觸；

(b)偵測步驟(a)的多胜肽的生物活性；

(c)比較無該測試化合物的生物活性，篩選抑制該多胜肽生物活性的化合物。

由於本發明MICAL2-PV或PCOTH蛋白質具有促進攝護腺癌細胞增殖活性，可以該活性為指標篩選促進或抑制本發明多胜肽之一生物活性的化合物。

任和多胜肽皆可用於篩選，只要其包含MICAL2-PV或PCOTH蛋白質的生物活性。該生物活性包含人類MICAL2-PV或PCOTH蛋白質細胞增殖活性，及MICAL2-PV連接肌動蛋白的活性。例如，可使用人類MICAL2-PV或PCOTH蛋白質及功能上相同於該蛋白質的多胜肽。該多胜肽可在細胞內或外表現。

由該篩選方法分離的化合物可為本發明多胜肽的促進藥或對抗藥。'激動藥'指經連接而活化本發明多胜肽功能

五、發明說明（46）

的分子。同樣地，'對抗藥'指經連接而抑制本發明多胜肽功能的分子（包含DNA及蛋白質）。

當以本方法得知生物活性為細胞增殖時，可經如製備表現本發明多胜肽的細胞，將該細胞培養於測試蛋白質中，確認細胞增殖速度，測量細胞週期等，並測量如實施例中所述的菌群形成活性。

本發明在進一步實體中提供治療或預防攝護腺癌的化合物的篩選方法。如上所述，經由控制MICAL2-PV或PCOTH的表現，可控制攝護腺癌的發病與進展。因此，可使用於此治療或預防攝護腺癌的化合物可經由MICAL2-PV或PCOTH的表現程度為指標篩選而確認。本發明內容中，該篩選包含如下步驟：

a）使該測試化合物與表現MICAL2-PV或PCOTH的細胞接觸；

b）比較無該測試化合物的表現程度，篩選MICAL2-PV或PCOTH表現降低的的化合物。

表現MICAL2-PV或PCOTH至少一種的細胞包含如攝護腺癌細胞株，該細胞可用於上述本發明篩選方法（如LNCaP、PC3、DU145）。該表現程度可以習知方法估計。在該篩選方法中，該MICAL2-PV或PCOTH至少一種表現降低的的化合物可選為可能藥劑以治療或預防攝護腺癌。

本發明篩選方法還可包含下列步驟：

a）使測試化合物與一細胞接觸，該細胞曾由含有一或多個指標基因的轉錄調節區域及在該轉錄調節區域控制

五、發明說明（47）

下表現的報導基因的載體所導入，其中該一或多個指標基因為MICAL2-PV或PCOTH；

b）測量該報導基因的活性；

c）比較控制組，篩選使該報導基因表現程度降低的化合物。

適當的報導基因及寄主細胞為習知。該篩選方法所需的該報導基因可由指標基因的轉錄調節區域所製得。當指標基因的轉錄調節區域為已知時，報導基因可由先前序列資訊製得。當指標基因的轉錄調節區域為未知時，包含該轉錄調節區域的核苷酸片段可自該指標基因的核苷酸序列資訊中整組基因庫中分離。

在本發明治療或預防攝護腺癌化合物的篩選方法的進一步實施例中，該方法使用MICAL2-PV連接肌動蛋白的連接活性。本發明MICAL2-PV蛋白質顯示含有同質於卡波寧區域(calponin domain)的區域為肌動蛋白的連接區域。因此，*MICAL2-PV* 編碼的蛋白質預期與肌動蛋白或其他微管作用。該等區域連接肌動蛋白成束及網。此發現認為本發明MICAL2-PV蛋白質經由連接至分子，如肌動蛋白或其他微管，而有細胞增殖功能。因此，預期抑制MICAL2-PV與肌動蛋白或其他微管導致細胞增殖的抑制，而抑制該連接的化合物可作為治療或預防攝護腺癌的醫藥。

該篩選方法包括步驟：(a) 在測試化合物存在下，使本發明MICAL2-PV多胜肽與肌動蛋白接觸；(b) 偵測MICAL2-PV與肌動蛋白的連接；及(c)篩選抑制該多胜肽與

五、發明說明（48）

肌動蛋白連接的化合物。

用於該篩選方法的本發明MICAL2-PV多胜肽與肌動蛋白可為重組多胜肽或蛋白質，該多胜肽或蛋白質來自自然物，或亦可為其部分胜肽，只要其保留彼此連接的能力。用於該篩選方法的該MICAL2-PV多胜肽與肌動蛋白可如純化多胜肽、可溶性蛋白質、連接載體的形式、或與其他多胜肽融合的融合蛋白質。

如上述抑制MICAL2-PV多胜肽與肌動蛋白連接的化合物篩選方法，可使用許多習知方法。該篩選方法可在試管內分析系統進行，如細胞系統。更專一地說，首先，MICAL2-PV多胜肽或肌動蛋白連接於支持體，加入其他蛋白質與測試化合物。然後培養該混和物，清洗、偵測及/或測量連接該支持體的該其他蛋白質。

用於連接蛋白質的支持體例，包含不可溶多糖，如洋菜膠、纖維素及葡聚糖；合成樹脂，如聚乙醯氨、聚乙烯及二氧化矽；較佳為由上述材料所製得、商業可獲得的珠及盤（如多位盤、生物感應晶片等）。使用珠時，可將其填充至管柱中。

支持體的蛋白質連接為例行工作，如化學鍵結及物理吸附。或者蛋白質可經由專一辨識該蛋白質的抗體，連接至支持體。或者支持體的蛋白質連接可使用抗生物素蛋白與生物素。

蛋白質間的連接發生於緩衝液中，如磷酸緩衝液及Tris緩衝液，但不限於此，只要該緩衝液不抑制蛋白質間

五、發明說明（49）

的連接即可。

本發明中，使用表面胞質遺傳因子聲納現象的生物感應器可作為偵測或定質該連接蛋白質。當使用生物感應器時，蛋白質間的作用在真實時間內觀察，作為表面胞質遺傳因子聲納訊號，僅使用少量多胜肽且無須標記（如BIAcore, Pharmacia）。因此，可使用生物感應器如BIAcore，預估MICAL2-PV多胜肽與肌動蛋白的連接。

或標記MICAL2-PV多胜肽或肌動蛋白，該連接蛋白質的標記可用於偵測或測離該連接蛋白質。在預標記的蛋白質中，該標記蛋白質在測試蛋白質存在下與其他蛋白質連接，然後根據清洗後的標記偵測或測量該連接蛋白質。

標記物質如放射性同位素（如^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{33}P、^{35}S、^{125}I、^{131}I）、酵素（如鹼基磷酸酶、焊菜過氧化酶、β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖酶）、螢光物質（如螢光異硫氰酸（FITC）、rhodamine色素）、與生物素/抗生物素蛋白，可在本方法中作為蛋白質標記。當該蛋白質以放射線同位素標記時，該偵測或測量可發生於液態閃爍器。或以酵素標記的蛋白質可以加入該酵素的受質，偵測該受質的酵素變化，如以吸光儀偵測顏色的生成，而偵測或測量該蛋白質。假如使用螢光物質為標記，該連接蛋白質可以螢光照相器偵測或測量。

MICAL2-PV多胜肽與肌動蛋白的連接亦可以MICAL2-PV多胜肽與肌動蛋白的抗體偵測或測量。例如，在固定於支持體的MICAL2-PV多胜肽與測試化合物及肌動蛋白接觸

五、發明說明（50）

後，培養該混合物、清洗，以抗肌動蛋白的抗體偵測或測量。或可使肌動蛋白固定於支持體，以抗MICAL2-PV的抗體為抗體。

若本發明篩選方法使用抗體，該抗體較佳以上述一種標記物質所標記，基於該標記物質而偵測或測量。或使用抗MICAL2-PV多胜肽或肌動蛋白的抗體為初級抗體，由標記一標記物質的二級抗體所偵測。本發明篩選方法中連接該蛋白質的抗體可以蛋白質G或蛋白質A管柱偵測或測量。

本發明篩選方法的另一實體，可使用雙雜交系統使用細胞('MATCHMAKER Two-Hybrid system', 'Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit', 'MATCHMAKER one-Hybrid system' (clontech); 'HybriZAP Two-Hybrid Vector System' (Stratagene); 參考文獻 'Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)','Fields and Stenglanz, Trend Genet 10: 286-92 (1994)')。

在雙雜交系統中，本發明多胜肽MICAL2-PV與SRF-連接區域或GAL-4連接區域融合，並表現在酵母菌細胞中。連接本發明多胜肽MICAL2-PV的肌動蛋白與SRF-連接區域或GAL-4連接區域融合，在測試化合物存在下，亦表現在酵母菌細胞中。當該測試化合物不抑制MICAL2-PV多胜肽與肌動蛋白的連接時，該連接活化報導基因，使正級選殖體可被偵測。

除HIS3基因外，如Ade2基因、lacZ基因、CAT基因、

五、發明說明 (51)

蟲螢光素酶基因等可作為報導基因。

任何測試化合物皆可用於本發明篩選方法，如細胞萃取物、細胞培養上清液、醱酵微生物產物、海洋有機體萃取物、植物萃取物、純化或原始蛋白質、胜肽、非胜肽化合物、合成微分子化合物及自然化合物。本發明測試蛋白質亦可獲自多種已知方法的組合庫，包含(1) 生物庫、(2) 空間上可放置的平行固態或可溶性態庫、(3) 需要開捲的合成庫、(4) '一珠一化合物'庫法、及(5) 使用親和性層析法篩選的合成庫法。使用親和性層析法篩選的生物庫法限於胜肽庫，然而其他四種方法亦可用於胜肽、非胜肽寡體或化合物的小分子庫(Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12: 145)。分子庫合成方法例為習知(DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678; Cho et al. (1993) Science 261: 1303; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 1233)。化合物庫可表現於溶液中(Houghten (1992) Bio/Techniques 13: 412)或珠上(Lam (1991) Nature 354:82)、晶片上(Fodor (1993) Nature 364: 555)、細菌(US Pat. No. 5,223,409)、孢子(US Pat. No. 5,571,698; 5,403,484; 5,223,409)、質體(Cull et al.

五、發明說明 (52)

(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865)或噬菌體(Scott and Smith (1990) Science 249: 386; Delvin (1990) Science 249: 404; Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222: 301; US Pat. Application 2002103360)。

由本發明篩選方法分離的化合物，可為促進或抑制本發明多胜肽活性的藥劑，以治療或預防如細胞增殖疾病引起的疾病，如攝護腺癌。本發明篩選方法所得化合物包含因增加、缺失及/或取代所轉變的經本發明篩選方法所得的部分結構化合物。

治療或預防攝護腺癌的醫藥組合物

本發明提供治療或預防攝護腺癌的醫藥組合物，其包含經本發明篩選方法所選的任何化合物。

當本發明篩選方法所分離的化合物作為醫藥投予人或其他哺乳類，如小鼠、大鼠、實驗豬、兔、貓、狗、羊、豬、牛、猴、狒狒、黑猩猩，以治療細胞增殖疾病(如攝護腺癌)，該分離化合物可直接投予或可以習知醫藥製備方法劑量形式，做為配方。如依據所需，該藥可為口服、如糖衣錠、膠囊、酏劑及微膠囊；或非口服，以無菌液體注射形式或水中懸浮液或任何醫藥可接受液體之形式。例如，該化合物可與醫藥可接受載體或媒體混和，如無菌水、生理食鹽水、植物油、乳化劑、懸浮劑、界面活性劑、穩定劑、香料、佐劑、載體、防腐劑、黏著劑等，以

五、發明說明 (53)

一般使用藥劑方法所需之單位劑量存在。該製備中活性組成物量為指定製藥標準中的適當量。

可與錠及膠囊混和的添加物，如黏著劑，如明膠、玉米澱粉、崔可坎膠(tragacanth gum)及阿拉伯膠；輔藥如結晶纖維素；膨脹劑如玉米澱粉、明膠及藻酸；潤滑油如硬脂酸鎂；甜劑如蔗糖、乳糖或糖精；香料如薄荷、冬綠樹艾單諾斯瑞克斯油(Gaultheria adenothrix oil)及櫻桃。當單位劑量為膠囊、液體載體如油更可包含上述成分。注射用無菌組成物可根據一般製藥配方，以如蒸餾水為載體注射。

生理食鹽水、葡萄糖及其他等張液體包含輔藥，如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇及氯化鈉，皆可作為注射用水溶液。可與適當溶劑結合，如酒精、非離子界面活性劑，如聚山梨糖80 (TM)及HCO-50。

芝麻油或豆油可作為油狀液體，可與二苯甲酸或苯乙醇結合為溶劑，可與緩衝液作成配方，如磷酸緩衝液及乙酸鈉緩衝液；可作為止痛劑，如鹽酸普魯卡因(procaine hydrochloride)；穩定劑，如苯乙醇、酚；及抗氧化劑。該注射劑可填充於適當安瓶。

將發明醫藥組合物投予病人可使用於習知方法，如動脈間、靜脈間、皮下注射，鼻間、氣管間、肌肉間、或口服。根據病人體重、年齡及投藥方法決定投藥劑量與方法，但熟知該技藝者可例行性選擇。如該化合物可由DNA編碼，則該DNA可插入載體中進行基因治療，投予該載體

五、發明說明（54）

以進行治療。根據病人體重、年齡及症狀決定投藥劑量與方法，但熟知該技藝者可適當選擇。

例如，雖然症狀不同而異，但連接本發明多胜肽的化合物劑量及調節其活性，正常成人（體重60kg）口服每日約0.1mg-約100mg，較佳為約1.0mg-約50mg，更佳為約1.0mg-約20mg。

非經腸投予時，雖根據病人、目標器官、症狀及投藥方法而異，但方便地靜脈注射正常成人（體重60kg）每日約0.01mg-約30mg，較佳為約0.1mg-約20mg，更佳為約0.1mg-約10mg。 在其他動物亦同，可依60kg體重轉換投藥。

本發明提供治療或預防攝護腺癌的醫藥組合物，其包含抑制 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因表現的成分。該成分包含抗 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因或衍生物的反義股多核苷酸、siRNA或核酶，如反義股多核苷酸、siRNA或核酶的表現載體。

此等活性成分可製成外用，如擦劑或糊劑，經混合對該衍生物非活化的適當基質物質。如有需要，可作成錠劑、粉末、顆粒、膠囊、微脂體膠囊、注射劑、溶液、滴鼻劑及冷凍乾燥劑，經由添加佐劑、等張劑、溶劑、穩定劑、防腐劑、止痛劑等。可以習知方法製備。

該活性成份直接投予病人疼痛部位，或注射血管以到達該部位。亦可使用鑲嵌培養基以增加耐用度及膜穿透性。鑲嵌培養基例，如微脂體、聚左旋離胺酸、膽固醇、

五、發明說明（55）

蟲螢光素酶或該等衍生物。

本發明組成物的劑量可根據病人狀況及所需量適當調整。例如投予0.1-100mg/kg劑量，較佳投予0.1-50mg/kg劑量。

本發明另一實體為治療或預防攝護腺癌的醫藥組合物，其包含抗 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因編碼多胜肽的抗體，或連接該多胜肽的抗體片段。

雖然症狀不同而異，但該治療或預防攝護腺癌的抗體或其片段為正常成人（體重60kg）口服每日約0.1mg-約100mg，較佳為約1.0mg-約50mg，更佳為約1.0mg-約20mg。

非經腸投予時，雖根據病人、目標器官、症狀及投藥方法而異，但方便地靜脈注射正常成人（體重60kg）每日約0.01mg-約30mg，較佳為約0.1mg-約20mg，更佳為約0.1mg-約10mg。在其他動物亦同，可依60kg體重轉換投藥。

治療或預防攝護腺癌的方法

本發明提供治療或預防攝護腺癌的方法。治療化合物預先或在治療中投予遭受攝護腺癌或為危險群（或懷疑為）。該治療體以標準臨床方法鑑定或以MICAL2-PV或PCOTH不正常表現程度偵測。預先投藥在該疾病臨床症狀發病前投藥，因此避免疾病或延緩其發展。

該治療方法包含減少 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因或兩者的表現或功能。在此方法中，該治療體以有效量化合物治

五、發明說明（56）

療，減少該治療體中一或二個過度表現的基因（*MICAL2-PV* 或*PCOTH* 基因）。可系統投藥或局部投藥。治療化合物包含使攝護腺癌細胞外該基因表現程度降低的化合物（如使該過度表現基因的表現向下調節的化合物）。該治療化合物的投藥反抗治療細胞中不正常過度表現的效應，預期改善該治療體的臨床症狀。該化合物可以上述本發明篩選方法獲得。

MICAL2-PV 或*PCOTH* 基因表現亦可以數種已知方式抑制，包含投予抑制或對抗該基因表現的核酸。可破壞該基因表現的反義股寡核苷酸、siRNA、或核酶可用於抑制該基因表現。

如上，可使用對應於*MICAL2-PV* 或*PCOTH* 基因核苷酸序列的反義股寡核苷酸，以降低*MICAL2-PV* 或*PCOTH* 基因表現。本發明反義股寡核苷酸可連接*MICAL2-PV* 或*PCOTH* 基因編碼的任何多胜肽或對應的mRNA，因此抑制該基因轉錄或轉譯、促進該mRNA分解、及/或抑制該基因編碼的蛋白質表現，最後抑制MICAL2-PV或PCOTH蛋白質的功能。

反義股寡核苷酸及其衍生物可製成外用，如擦劑或糊劑，經混合對該衍生物非活化的適當基質物質，且可使用於本發明治療或預防攝護腺癌的方法。

抑制一或多個過度表現基因的基因產物的核酸亦包含小干擾RNA（siRNA），包含*MICAL2-PV* 或*PCOTH* 基因編碼的順義股核酸與反義股核酸的混合物。將siRNA導入細胞的標準方法可用於本發明的治療或預防，包含以來自轉錄

五、發明說明（57）

RNA的DNA為鑄模的方法。該siRNA建構成具有來自目標基因的順義股核酸與反義股核酸的單一轉錄本，如髮夾型。

該方法用於抑制 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因表現升高的細胞的基因表現。該siRNA連接至目標細胞的 *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因轉錄本導致細胞中MICAL2-PV或PCOTH蛋白質產量的降低。

抑制一或多個過度表現基因的基因產物的核酸亦包含抗該過度表現基因（ *MICAL2-PV* 或 *PCOTH* 基因）的核糖體。本發明更提供治療或預防細胞增殖疾病的方法，如攝護腺癌，使用抗本發明多胜肽的抗體。根據該方法，投予抗本發明多胜肽的抗體的醫藥有效量。由於MICAL2-PV或PCOTH蛋白質的表現在攝護腺癌細胞中升高，而該蛋白質表現的抑制導致細胞增殖活性降低，細胞增殖疾病可經由連接該抗體及該蛋白質而予以治療或預防。因此，投予抗本發明多胜肽的抗體劑量足以降低本發明蛋白質活性，該劑量為每日0.1-約250mg/kg。成人劑量一般為每日約5mg-約17.5mg，較佳為約5mg-約10g，更佳為約100mg-約3g。

或者，以連接至對腫瘤細胞專一的細胞表面指標的抗體作為工具傳送藥物。如投予足量的與細胞毒素劑鍵結的抗體，以對抗腫瘤細胞。

本發明亦關於誘導抗腫瘤免疫方法，包含投予MICAL2-PV或PCOTH蛋白質的步驟或投予其免疫活性片段，或編碼該蛋白質或其片段的多胜肽。該MICAL2-PV或PCOTH蛋白質或其免疫活性片段有效為疫苗，抗細胞增殖疾病，

五、發明說明 (58)

如攝護腺癌。某些情況下，該蛋白質或其片段可以連接T細胞受體(TCR)形式投予，或由抗原表現細胞(APC)表現，如巨噬細胞、樹突細胞(DC)或B細胞。由於DC的強烈抗原表現能力，DC較佳與APC一同使用。

本發明中，抗細胞增殖疾病的疫苗指接種動物時，具有誘導抗腫瘤免疫能力的物質。一般而言，抗腫瘤免疫亦包含如下的免疫反應，

- 抗腫瘤的細胞毒性淋巴球的誘導；
- 辨識腫瘤的抗體誘導；
- 抗腫瘤細胞激素生成的誘導。

因此，當某蛋白質在接種動物時誘導任一種該免疫反應，該蛋白質為具有抗腫瘤免疫誘導效應。由蛋白質誘導的該抗腫瘤免疫誘導可由寄主的免疫系統對該蛋白質的生體內或試管內反應觀察得知。

例如，習知偵測細胞毒素T細胞誘導的方法。進入生物體的外來物質經抗原表現細胞(APCs)作用表現於T細胞及B細胞。對APC表現的抗原反應、具抗原專一性的T細胞，因抗原刺激分化為細胞毒素T細胞(或細胞毒素T淋巴球；CTLs)，然後增殖(稱為T細胞活化)。因此，由某胜肽誘導的CTL可由APC呈現該胜肽於T細胞而估計，及偵測CTL的誘導。而且，APC具有活化CD4+T細胞、CD8+T細胞、巨噬細胞、曙紅性球、及NK細胞的效果。CD4+T細胞及CD8+T細胞在抗腫瘤免疫中非常重要，該多胜肽的抗腫瘤免疫誘導反應可以該細胞的活性效應為指標而預估。

五、發明說明 (59)

以樹突細胞(DC)為APC估計CTL誘導活性的方法為習知。DC為代表具有最強CTL誘導活性的APC。此方法中，該測試多胜肽最先接觸DC，然後該DC與T細胞接觸。在接觸DC後，具有抗該目標細胞的細胞毒性效應的T細胞的偵測顯示該測試多胜肽具有誘導該細胞毒素T細胞的活性。抗腫瘤的CTL活性可由如^{51}Cr標記的腫瘤細胞作為指標而偵測。或者，使用^{3}H胸苷獲取活性或LDH(乳糖去氫酶)-釋放為指標，預估腫瘤細胞損害的程度的方法亦為習知。

除DC外，可使用周邊血單核球細胞(PBMCs)作為APC。已知在GM-CSF及IL-4存在下培養PBMC可促進CTL的誘導。同樣地，已知在洞穴帽貝血清素(keyhole limpet hemocyanin；KLH)存在下培養PBMC可促進CTL的誘導。

在此方法下確定具有CTL誘導活性的測試多胜肽為具有DC活化效應及隨後具有CTL誘導活性的多胜肽。因此，誘導CTL抗腫瘤細胞的多胜肽有效作為抗腫瘤的疫苗。而且，APC在接觸該此多胜肽而獲得誘導CTL抗腫瘤活性，亦有效為抗腫瘤的疫苗。因APC呈現該多胜肽抗原而獲得細胞毒性的CTL亦可作為抗腫瘤的疫苗。該使用APC及CTL抗腫瘤免疫的治療腫瘤方法為細胞免疫治療法。

一般而言，當使用細胞免疫治療法的多胜肽時，已知由結合具不同結構的多種多胜肽與DC接觸，可增加CTL誘導的效率。因此，當以蛋白質片段刺激DC時，較佳使用多種片段混和物。

或者，經多胜肽誘導抗腫瘤免疫可以觀察抗腫瘤抗體

五、發明說明（60）

生成的誘導而確認。例如當抗多胜肽的抗體在經該多胜肽免疫的實驗動物中被誘導，且腫瘤細胞的生長受該抗體抑制時，該多胜肽可確定具有誘導抗腫瘤免疫的能力。

經施與本發明疫苗可誘導抗腫瘤免疫，抗腫瘤免疫的誘導可治療及預防細胞增殖疾病，如攝護腺癌。抗癌療法或預防癌症出現涵蓋任一層面，如抑制癌症細胞生長、癌症衰退及癌症再發的抑制。癌症死亡率的降低、血液內癌症指標的減少、伴隨癌症出現可察覺症狀的減輕等亦為治療效應或癌症預防。該治療及預防效應較佳為統計上顯著差異者。例如，比較抗細胞增殖疾病的疫苗治療或預防效應與無施予疫苗的控制組，其顯著差異為5%或更低。例如可使用統計學的史氏T測試(student's t-test)、曼懷尼U測試(Mann-Whitney U-test)或ANOVA。

具有免疫活性的上述蛋白質或編碼該蛋白質的載體可與佐劑結合。佐劑為一化合物促進抗蛋白質免疫反應，當其與具免疫活性的蛋白質同時(或隨後)投予。佐劑例如霍亂毒素、沙門桿菌毒素、明礬等，但不限於此。本發明疫苗可與醫藥可接受載體適當結合。該載體例如無菌水、生理食鹽水、磷酸緩衝液、培養液等。如需要，該疫苗可進一步包含穩定劑、懸浮劑、防腐劑、界面活性劑等。該疫苗可系統性或局部性施予。疫苗可經單一或多次施予。

使用APC或CTL作為本發明疫苗時，腫瘤在生體外(*ex vivo*)治療或預防。收集接受治療法或預防法個體的PBMC，使該細胞與該多胜肽生體外(*ex vivo*)接觸，然後誘導APC

五、發明說明（61）

或CTL，再將該細胞投予該個體。將編碼該多胜肽的載體生體外（*ex vivo*）導入PBMC亦可誘導APC。試管內誘導APC或CTL可在投藥前選殖。對於具有受損目標細胞高活性的細胞選殖及生長，細胞免疫治療可更加有效。由此分離的APC及CTL可用於抗來自該細胞的個體及抗來自其他個體的類似型態腫瘤的細胞免疫抑制療法。

本發明亦提供治療或預防細胞增殖疾病，如攝護腺癌，包含醫藥有效量的MICAL2-PV或PCOTH多胜肽。該醫藥組合物可用於提高抗腫瘤免疫。MICAL2-PV正常表現限於睪丸，PCOTH限於睪丸與攝護腺。因此，抑制此等基因對其他器官無副作用。MICAL2-PV或PCOTH多胜肽較佳用於治療或預防細胞增殖疾病，尤其為攝護腺癌。因為特定表現於癌症細胞蛋白質片段已知誘導抗該癌症的免疫反應，MICAL2-PV或PCOTH的胜肽片段亦可作為治療或預防細胞增殖疾病的醫藥組合物，如攝護腺癌。本發明中，該多胜肽或其片段以足量誘導抗腫瘤免疫量投予，範圍在0.1mg-10mg，較佳為0.3mg-5mg，更佳為0.8mg-1.5mg。重複該投藥。例如1mg該多胜肽或其片段可每兩星期投予4次，以誘導抗腫瘤免疫。

而且，編碼MICAL2-PV或PCOTH多核苷酸或其片段可提高抗腫瘤免疫。該多核苷酸可與表現載體作用，在治療體內表現MICAL2-PV或PCOTH或其片段。因此，本發明包含誘導抗腫瘤免疫方法，其中投與遭受發展中細胞增殖免疫疾病，如攝護腺癌，或為危險群的個體編碼MICAL2-PV或

五、發明說明（62）

PCOTH的核苷酸或其片段。

以下實施例為說明本發明及協助習知此項技藝者製造及使用。但實施例並非限制本發明範圍。

除特別定義外，此處使用的所有科技及科學名稱與習知本發明範圍的技藝相同。雖有類似或相同此處的方法及材料可實施或測試於本發明，以下說明適當方法及材料。此處引用的任何專利、專利申請案及公開刊物為參考資料。

本發明最佳態樣

本發明由以下實施例詳細說明，但本發明不限於此。

1. 材料及方法

（1）細胞株及臨床材料

人類攝護腺癌細胞LNCaP、PC3及DU145購自美國型培養收集組(ATCC, Rockville, MD)。LNCaP細胞培養於RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO)，DU145細胞培養於Dulbecco's修飾Eagle's培養基(Invitrogen, Carsbad, CA)，PC3細胞培養於F12營養混和物(Invitrogen, Carsbad, CA)，每一培養基添加10%胎牛血清及1%抗生素/抗黴素溶液(Sigma)。

（2）用cDNA微陣列晶片排列分離二新穎人類基因

製造cDNA微陣列晶片玻片(Ono et al., Cancer Res 60: 5007-11 (2000))。對每一表現情形的分析，本發明者準備具有23,040 cDNA點的cDNA微陣列晶片複製組，以減少實驗數據波動。簡單地說，所有RNA純化自20個攝護

五、發明說明（63）

腺癌組織微切片後的攝護腺癌細胞及正常攝護腺管道上皮細胞。進行具T7的RNA放大以獲得適當RNA，用於微陣列晶片試驗中。來自攝護腺癌細胞及正常攝護腺管道上皮細胞的放大RNA等量稀釋液個別以Cy5-dCTP及Cy3-dCTP反轉錄標記(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)。進行如上所述的雜交、清洗及偵測(Ono et al., Cancer Res 60: 5007-11 (2000))。隨後，根據先前得知的29個正常人類組織的基因表現，目標向上調節基因中，具標示號D4493及A5736的二基因，其中該二基因表現在50%以上已知攝護腺癌與相較較低地在正常主要器官的表現程度比例大於5.0者(Saito-Hisaminato et al., DNA Res 9: 35-45 (2002))。

(3)北方點漬法分析

使人類多重組織北方點漬(Clontech, Palo Alto, CA)與D4493與A5736的[α-^{32}P]dCTP標記PCR產物雜交。PCR產物以下列引子經RT-PCR製成：

D4493使用5'-CCGACACTCTGGGTAGGAGA-3'(SEQ.ID.NO.7)及5'-TACGTGAGCTCTGAGGACCA-3'(SEQ.ID.NO.8)；

A5736使用5'-TGAAGCAACAAAGAGAGGAGGAG-3'(SEQ.ID.NO.9)及

5'-CCGTGTGGCACTGTAAATGATTA-3'(SEQ.ID.NO.10)。

預雜交、雜交及清洗皆根據購買說明使用。該點漬在-80℃加強銀幕輻射照相7天。

(4)半量化RT-PCR分析

五、發明說明 (64)

根據操作手冊，所有RNA皆以TRIzol試劑(Invitrogen)自培養細胞及臨床樣本中萃取。萃取的RNA以DNA分解酶I(Roche)處理，以寡$(dT)_{16}$引子及Superscript II反轉錄酶(Roche)反轉錄為單股cDNA。PCR放大後，任一單股cDNA適當稀釋，監視β-肌動蛋白(*ACTB*)為定量控制組。該引子為

ACTB 使用5'-CATCCACGAAACTACCTTCAACT-3'(SEQ. ID. NO. 11) 及 5'-TCTCCTTAGAGAGAAGTGGGGTG-3'(SEQ. ID. NO. 12)；

D4493使用5'-CCGACACTCTGGGTAGGAGA-3'(SEQ. ID. NO. 13)及 5'-TACGTGAGCTCTGAGGACCA-3'(SEQ. ID. NO. 14)；

A5736使用5'-GCAGGGATATCTTTGAGAAA-3'(SEQ. ID. NO. 15) 及 5'-CCAGGATCTGCACAAATACA-3'(SEQ. ID. NO. 16)。

所有反應在GeneAmp PCR系統9700 (PE Applied Biosystems)以94℃、2分鐘進行起始分解，隨後以94℃、30秒；58℃、30秒；72℃、1分鐘進行21次循環(對*ACTB*)或35次循環(對D4493及A5736)。

(5)表現載體的建構

整段D4493 cDNA編碼序列以引子經RT-PCR放大；

5'-CGTGGATCCC AGACCGTGCA TCATGGGCAC ATCTGAAGAA GGAAACTTGC-3'(SEQ. ID. NO. 17) (D4493-順向) 及

5'-AATCTCGAGT CAGGGGCAGA AGGGGAATAA GG-3'(SEQ. ID. NO. 18) (D4493-反向)。

在鈍端處理(blutting treatment)後，將該產物插入

五、發明說明 (65)

pCAGGS新載體的EcoRI位。為偵測D4493蛋白質表現，將HA標籤融合於D4493蛋白質的NH2或COOH端。

整段A5736 cDNA編碼序列亦可以引子經RT-PCR放大；

5'-CCCAAGCTTA TGGGGGAAAA CGAGGATGA-3' (SEQ. ID. NO. 19) (A5736-順向) 及

5'-TTTTCCTTTT GCGGCCGCGC GGAGCTTGAC TGGGAAGC-3' (SEQ. ID. NO. 20) (D5736-反向)。

該產物插入pcDNA3.1(+)/myc-His的Hind III位及Not I位(Invitrogen)。該建構物以DNA序列編排予以確認。

(6)免疫細胞化學染色

依據使用方法，使用FuGENE 6 (Roche)將COS7細胞短暫轉感染pCAGGS新-D4493及pcDNA3.1(-)-A5736-myc-His，隨後以4%偏甲醛固定，PBS溶液的0.2% Triton X-100在室溫下穿透3分鐘。然後，室溫下以封阻溶液(含0.2% Triton X-100的3% BSA/PBS)覆蓋30分鐘，室溫下以鼠抗HA抗體(Roche)或鼠抗-myc抗體(Sigma)在封阻溶液中培養60分鐘。以PBS清洗後，室溫下以FITC-鍵結的抗鼠二級抗體(Organon teknika)及Rhodamine-鍵結的抗小鼠二級抗體(ICN Biomedicals)染色60分鐘。樣本以含有4', 6'-二米基-2'-苯基引朵烯鹽酸(DAPI)的VECTASHIELD (VECTOR Laboratories, Inc, Burlingame, CA)包埋，以光譜共焦掃描系統(Leica)顯現。

(7)siRNA表現載體與轉感染至攝護腺癌細胞

五、發明說明 (66)

使用siRNA表現載體(psiU6BX)預估該目標基因的效應或RNAi。U6啟動子被選殖在該基因特定序列上游(在該序列的反互補股的TTCAAGAGA短區間所分離出的目標轉錄本的第19個核苷酸序列)，5個胸腺嘌呤為終止訊號，並整合新卡式步驟以提供抗Geneticin (Sigma)的抗性。D4493的目標基因各為

5'-TAGGGCCCATGGGGCCCGG-3'(SEQ.ID.NO.21)(si1)， 5'-ACCAGTTGGGCCCAAAGGC-3'(SEQ.ID.NO.22)(si2), 5'-AGGCCCAATGTTGCCCCTT-3'(SEQ.ID.NO.23)(si3), 5'-TGTTGCCCCTTGGCCCCTC-3'(SEQ.ID.NO.24)(si4), 及 5'-GAAGCAGCACGACTTCTTC-3'(SEQ.ID.NO.25)(EGFP)。

A5736的目標基因為

5'-GCTGCTGGCCTCCATATCA-3' (SEQ.ID.NO.26)(si1), 5'-TGCTTACAACTACTGCTAC-3'(SEQ.ID.NO.27)(si2), 及 5'-CTACTGCTACATGTACGAG-3'(SEQ.ID.NO.28)(si3)。

人類攝護腺癌細胞株LNCaP、PC3及DU145塗布於10公分盤(5×10^5細胞/盤)中，根據操作方法使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen)，以含有EGFP目標序列的psiU6BX(psiU6BX-EGFP)，及以含有目標基因的psiH1BX(*D4493* 的psiU6BX-si1~4 或*A5736* 的si1~3)轉感染。細胞經500mg/ml Geneticin處理一星期後篩選，選擇初步細胞以使目標基因表現分析及以RT-PCR分析。RT-PCR

五、發明說明（67）

引子與上述相同。該細胞亦以Giemsa溶液染色及進行MTT分析。

2. 結果

（1）攝護腺癌細胞中向上調節基因 *PCOTH* 及 *MICAL2*（*MICAL2-PV*）攝護腺變異物的鑑定

使用cDNA微陣列晶片表現23,040個人類基因，分析來自20個攝護腺癌的純化癌症細胞的基因表現情形。結果，鑑定出88個基因在攝護腺癌細胞中普遍向上調節。在該鑑定的基因中，編號D4493基因在50%以上攝護腺癌中明顯增加，經由RT-PCR確認其在攝護腺癌細胞中過度表現情形（第1圖A）。D4493由來自攝護腺癌cDNA庫的二EST（BC015452及BG178505）重疊，且已知為 *LOC221179*（XP_167955）。比較小鼠與大鼠整組基因序列，*LOC221179* 的新編碼區確定為編碼100個胺基酸蛋白質。北方點漬分析法確認 *LOC221179* 高度及局部表現於攝護腺及睪丸（第1B圖）。該產物具有一特別區域，即膠原三級螺旋重複體（第1C圖），為膠原超家族的特徵之一。因此該基因稱為 *'PCOTH' (prostate collagen triple helix)*。

另一基因，A5736亦在50%以上攝護腺癌中明顯增加，經由RT-PCR確認其在攝護腺癌細胞中過度表現情形（第2A圖）。該基因與 *MICAL2 (Molecule Interacting with CasL2)* 重疊。北方點漬分析法使用A5736為探針，確認約7.5kb的轉錄本大量表現於睪丸及攝護腺癌細胞中。然而，*MICAL2* 的正常轉錄本為3.8kb長（第2B圖）。為解決長度的差異，

五、發明說明（68）

以RACE鑑定未知的轉錄區域。由於RACE使用睪丸cDNA，鑑定出 *MICAL2* 的變異體為7.5kb長。該變異體的3'端編碼區域與 *MICAL2* 不同，且編碼967個胺基酸，而非正常MICAL2蛋白質的1124個胺基酸（第2C圖）。本發明揭露兩個新穎 *MICAL2* 變異物，一長型變異物（accession number: AB110785）及一短型變異物（Accession number: AB110786），其中該短型變異物較長型變異物缺少一表現序列。此處，該變異物稱為 'MICAL2-PV'（*MICAL2 prostate cancer-variants*）。

（2）次細胞定位

為進一步調查PCOTH及MICAL2-PV蛋白質的次細胞定位，將該蛋白質與標籤連接，該蛋白質在COS7細胞中短暫過度表現以進行免疫細胞化學染色。如第3圖所示，外基因PCOTH-HA蛋白質位於細胞膜或次細胞膜上（第3A圖），外源MICAL2-PV-Myc蛋白質位於COS7細胞的細胞質（第3B圖）。

（3）攝護腺癌細胞株中siRNA媒介的生長抑制

為調查該基因在攝護腺癌細胞生長或存活的過度表現效應，該基因的內基因表現以哺乳動物載體為主的RNA干擾（RNAi）技術特定性去除。某些為 *PCOTH*（第4A圖）及 *MICAL2-PV*（第4D圖）設計的siRNA的si-RNA製造載體的轉感染，導致內基因表現的減少。*PCOTH* 轉錄本的siRNA去除效應導致在菌群形成分析及MTT分析（第4B、4C圖）中顯著的生長抑制。*MICAL2-PV* 轉錄本的siRNA去除效應亦導

五、發明說明（69）

致在菌群形成分析（第4E圖）中顯著的生長抑制。這些發現強烈顯示攝護腺癌細胞中*PCOTH* 及*MICAL2-PV* 的過度表現，與癌症細胞生長有關，且該基因或由該基因編碼的蛋白質可作為攝護腺癌治療的分子目標，其中該基因被抑制或去除。

工業上可利用性

人類基因*MICAL2-PV* 及*PCOTH* 的表現，相較非癌症攝護腺管道上皮細胞而言，在攝護腺癌中顯著增加。此等基因可能作為攝護腺癌的診斷指標，其編碼蛋白質可能作為攝護腺癌的診斷分析。

本發明人等亦顯示新穎蛋白質MICAL2-PV 或PCOTH的表現促進細胞生長，然而細胞生長受到對應於*MICAL2-PV* 或*PCOTH* 基因的小干擾RNA所抑制。此發現認為MICAL2-PV及PCOTH蛋白質刺激致癌基因活性。因此，每一該新穎致癌蛋白質在抗癌醫藥的發展上為有效目標。例如，抑制MICAL2-PV 或PCOTH表現或預防其活性的藥劑，可能作為抗癌藥劑的治療使用，特別是治療攝護腺癌的抗癌藥。該藥劑例如抗*MICAL2-PV* 或*PCOTH* 基因的反義股寡核苷酸、小干擾RNA及核酶，與辨識MICAL2-PV 或PCOTH的抗體。

雖然本發明詳細說明並有引用文獻及其特定實體，顯然在不分割本發明精神及範圍下，熟知該項技藝者可作各種改變及修改。

圖式簡單說明

第1圖的(A)照片顯示在經由RT-PCR後攝護腺癌細胞中*D4493*（*PCOTH*）的過度表現。相同個體的微切片的正常攝護腺管道上皮細胞(N)及攝護腺癌細胞(T)以半量化RT-PCR比較。ACBT用於結果的正常化。(B)照片顯示正常人類多層組織的北方點漬分析結果。偵測到睪丸及攝護腺中的高度及局部表現，而在心臟及骨髓中低表現。(C)顯示D4493(PCOTH)產物的胺基酸序列。該產物有100個胺基酸及含有G-X-X圖示重複特徵的膠原三級螺旋體重複組。G為甘胺酸，X較佳為脯胺酸。

第2圖的(A)為照片顯示在經由RT-PCR後攝護腺癌細胞中*A5736*（*MICAL2-PV*）的過度表現。相同個體的微切片的正常攝護腺管道上皮細胞(N)及攝護腺癌細胞(T)以半量化RT-PCR比較。ACBT用於結果的正常化。(B)照片顯示正常人類多層組織及攝護腺癌細胞株的北方點漬分析結果。對應*MICAL2-PV*約7kb轉錄本在睪丸及攝護腺癌細胞株(LNCaP、PC3及DU145)呈現高度表現，而對應原始*MICAL2*約4kb轉錄本表現在心臟、腦及肝臟中，並非在攝護腺癌細胞株。(C)顯示*MICAL2*（*KIAA0750*）及*MICAL2-PV*表現序列的連結。*MICAL2*（*KIAA0750*）為3.8kb轉錄本，含有28個表現序列，*MICAL2-PV*為6.8kb轉錄本，有數個刪除的表現序列及含有長延生表現序列。*MICAL2-PV*有兩種同型體，長型(編號Accession number: AB110785)及短型(編號Accession number: AB110786)，短型為長型中缺少一表現序列。該長型預期可產生976個胺基酸的蛋白質，與

圖式簡單說明

MICAL2(KIAA0750)蛋白質在醋酸根區域相異。

第3圖照片顯示外源PCOTH蛋白質(A)與MICAL2-PV蛋白質(B)在COS7細胞中的次相對位置(sublocalization)。外源PCOTH蛋白質在細胞膜上，而外源MICAL2-PV蛋白質在COS7細胞質中。

第4圖(A)照片顯示以siRNA顯示攝護腺癌細胞株除去*PCOTH*的效應。數個U6-啟動子-siRNA物(si 1-4目標*PCOTH*及一目標EGFP)轉感染至PC3。RT-PCR的結果顯示以si 3轉感染的除去*PCOTH*之PC3細胞有劇烈效應。(B)照片顯示以U6-啟動子-siRNA物轉感染後，所得PC3菌群形成分析結果。該菌群數對應於PC3去除*PCOTH*的效應。(C)為以siRNA顯示除去*PCOTH*的三群攝護腺癌細胞株(LNCaP、PC3及DU145)的MTT分析結果。該細胞生長亦對應於PC3去除*PCOTH*的效應。(D)照片為以siRNA顯示攝護腺癌細胞株除去*MICAL2-PV*的效應。數個U6-啟動子-siRNA物(si 1-3目標*MICAL2-PV*及一目標EGFP)轉感染至PC3。RT-PCR的結果顯示以si 2轉感染的除去*PCOTH*之PC3細胞有劇烈效應。(E)照片顯示以U6-啟動子-siRNA物轉感染後，所得PC3菌群形成分析結果。該菌群數對應於si 2去除MICAL2-PV的效應。

序列表

<110> 腫瘤治療科學股份有限公司

日本東京大學校長代表

<120> 攝護腺癌相關基因與多胜肽

<130> ONC-A0216P2

<150> US 60/414873

<151> 2002-09-30

<160> 28

<170> 專利版本 3.1

<210> 1

<211> 826

<212> DNA

<213> 人類

<220>

<221> CDS

<222> (332)..(634)

<223>

<400> 1

aaggggctca tgcagaagca gttcccggac ccgacactct gggtaggaga ccactaaacc 60

cggcccctca aagcagaggt gaccttgccc tcatcgagag cgcacacaag acgccactgt 120

aaaaggatca cagatggaga gacattttgc cacacgatga atcacacacc acatctcatc 180

cccgagcttc agctgcagga caatgctgcc agaggcctgg tcctcagagc tcacgtaagc 240

atctctggtg tgcagtattt ttactccgtt tttgaccaaa gacacctgaa cattcctgga 300

gaaaacagtg atgtggatct tatcaaattt a atg ggc aca tct gaa gaa gga 352
Met Gly Thr Ser Glu Glu Gly
1 5

aac ttg ctc agc acc gtg agc ccc aca gtg aaa gca ctt ttt ggc aag 400
Asn Leu Leu Ser Thr Val Ser Pro Thr Val Lys Ala Leu Phe Gly Lys
10 15 20

act aga gtc tca ccg att ttc cct ttc tct cct cga tct cct ttc cag 448
Thr Arg Val Ser Pro Ile Phe Pro Phe Ser Pro Arg Ser Pro Phe Gln
25 30 35

cct ctt att ccc cgg act cct ggc tca ccc tgg ggc ccc gtg ggt cca 496
Pro Leu Ile Pro Arg Thr Pro Gly Ser Pro Trp Gly Pro Val Gly Pro
40 45 50 55

gct tct ccc ttg gga cca ggc ttt cca ata ggg ccc atg ggg ccc ggt 544
Ala Ser Pro Leu Gly Pro Gly Phe Pro Ile Gly Pro Met Gly Pro Gly
60 65 70

aaa cca gtt ggg ccc aaa ggc cca atg ttg ccc ctt ggc ccc tca gga 592
Lys Pro Val Gly Pro Lys Gly Pro Met Leu Pro Leu Gly Pro Ser Gly
75 80 85

cca gtg gga ccc acg tca ccc tta ttc ccc ttc tgc ccc tga 634
Pro Val Gly Pro Thr Ser Pro Leu Phe Pro Phe Cys Pro
90 95 100

ggcccagtct ctcctcggag gcctttctct cccatgggcc ctgcaagccc cttggggcca 694

tgttttcctg gggatcctct tgagccttga tcacctttga tgccttttgc ttcaactttt 754

ccatctgctc ctaaatagag aaagagcaaa taaagagata gtttgtgaaa gataaaaaaa 814

aaaaaaaaaa aa 826

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> 人類

<400> 2

Met Gly Thr Ser Glu Glu Gly Asn Leu Leu Ser Thr Val Ser Pro Thr
1 5 10 15

Val Lys Ala Leu Phe Gly Lys Thr Arg Val Ser Pro Ile Phe Pro Phe
20 25 30

Ser Pro Arg Ser Pro Phe Gln Pro Leu Ile Pro Arg Thr Pro Gly Ser
35 40 45

Pro Trp Gly Pro Val Gly Pro Ala Ser Pro Leu Gly Pro Gly Phe Pro
50 55 60

Ile Gly Pro Met Gly Pro Gly Lys Pro Val Gly Pro Lys Gly Pro Met
65 70 75 80

Leu Pro Leu Gly Pro Ser Gly Pro Val Gly Pro Thr Ser Pro Leu Phe
85 90 95

Pro Phe Cys Pro
100

<210> 3

<211> 6805

〈212〉 DNA

〈213〉 人類

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (265)..(3195)

〈223〉

〈400〉 3

ccgggccgcc tcgctcgctc ccagctctgt cagtggcccg cggggcccga tcgctgcgcc 60

cgcggccagg gccgaggcag gcctgacccg gggccgggca gcccgcgcga ctttcggaac 120

atggcaaccc gtgtgtgtct catcccagaa agagaagact ttaaccactg tgatgcctga 180

gaatccagtg tgacgtttct ccagatactt catgctgttc acctgtgtcc tcgccgcacc 240

actgccgcac acgactcctg aacc atg ggg gaa aac gag gat gag aag cag 291
Met Gly Glu Asn Glu Asp Glu Lys Gln
1 5

gcc cag gcg ggg cag gtt ttt gag aac ttt gtc cag gca tcc acg tgc 339
Ala Gln Ala Gly Gln Val Phe Glu Asn Phe Val Gln Ala Ser Thr Cys
10 15 20 25

aaa ggt acc ctc cag gcc ttc aac att ctc aca cga cac ctg gac cta 387

Lys Gly Thr Leu Gln Ala Phe Asn Ile Leu Thr Arg His Leu Asp Leu
30 35 40

gac cct ctg gac cac aga aac ttt tat tcc aag ctc aag tcc aag gtg 435
Asp Pro Leu Asp His Arg Asn Phe Tyr Ser Lys Leu Lys Ser Lys Val
45 50 55

acc acc tgg aaa gcc aaa gcc ctg tgg tac aaa ttg gat aag cgt ggt 483
Thr Thr Trp Lys Ala Lys Ala Leu Trp Tyr Lys Leu Asp Lys Arg Gly
60 65 70

tcc cac aaa gag tat aag cga ggg aag tcg tgc acg aac acc aag tgt 531
Ser His Lys Glu Tyr Lys Arg Gly Lys Ser Cys Thr Asn Thr Lys Cys
75 80 85

ctc ata gtt ggg gga gga ccc tgt ggc ttg cgc act gcc att gaa ctt 579
Leu Ile Val Gly Gly Gly Pro Cys Gly Leu Arg Thr Ala Ile Glu Leu
90 95 100 105

gcc tac ctg gga gcc aaa gtg gtc gtg gtg gag aag agg gac tcc ttc 627
Ala Tyr Leu Gly Ala Lys Val Val Val Val Glu Lys Arg Asp Ser Phe
110 115 120

tcc cgg aac aac gtg cta cac ctc tgg cct ttc acc atc cat gac ctt 675
Ser Arg Asn Asn Val Leu His Leu Trp Pro Phe Thr Ile His Asp Leu
125 130 135

cgg ggc ctg gga gcc aag aag ttc tat ggg aag ttc tgt gct ggc tcc 723
Arg Gly Leu Gly Ala Lys Lys Phe Tyr Gly Lys Phe Cys Ala Gly Ser
140 145 150

atc gac cat atc agt att cgc caa cta cag ctc atc cta ttc aag gtg 771
Ile Asp His Ile Ser Ile Arg Gln Leu Gln Leu Ile Leu Phe Lys Val
155 160 165

gcc ctg atg ctg gga gtt gaa atc cat gtg aat gtg gag ttc gtg aag 819
Ala Leu Met Leu Gly Val Glu Ile His Val Asn Val Glu Phe Val Lys
170 175 180 185

gtt cta gag cct cct gaa gat caa gaa aat caa aaa att ggc tgg cgg 867
Val Leu Glu Pro Pro Glu Asp Gln Glu Asn Gln Lys Ile Gly Trp Arg
190 195 200

gca gaa ttt ctc cct aca gac cat tct ctg tcg gag ttt gag ttt gac 915
Ala Glu Phe Leu Pro Thr Asp His Ser Leu Ser Glu Phe Glu Phe Asp
205 210 215

gtc atc att ggt gcc gat ggc cgc agg aac acc ctg gaa ggg ttc aga 963
Val Ile Ile Gly Ala Asp Gly Arg Arg Asn Thr Leu Glu Gly Phe Arg
220 225 230

aga aaa gaa ttc cgt ggg aag ctg gcg att gcc atc acc gcc aac ttc 1011

Arg Lys Glu Phe Arg Gly Lys Leu Ala Ile Ala Ile Thr Ala Asn Phe
235 240 245

ata aac aga aac agc aca gcg gaa gcc aag gtg gaa gag att agt ggt 1059
Ile Asn Arg Asn Ser Thr Ala Glu Ala Lys Val Glu Glu Ile Ser Gly
250 255 260 265

gtg gct ttc atc ttc aat cag aaa ttt ttt cag gac ctt aaa gaa gaa 1107
Val Ala Phe Ile Phe Asn Gln Lys Phe Phe Gln Asp Leu Lys Glu Glu
270 275 280

aca ggc ata gat ctt gag aac att gtt tac tac aag gac tgc acc cac 1155
Thr Gly Ile Asp Leu Glu Asn Ile Val Tyr Tyr Lys Asp Cys Thr His
285 290 295

tat ttt gta atg aca gcc aag aag cag agc ctg ctc gac aaa ggt gtc 1203
Tyr Phe Val Met Thr Ala Lys Lys Gln Ser Leu Leu Asp Lys Gly Val
300 305 310

atc att aac gac tac atc gac aca gag atg ctg ctg tgt gcg gag aac 1251
Ile Ile Asn Asp Tyr Ile Asp Thr Glu Met Leu Leu Cys Ala Glu Asn
315 320 325

gtg aac caa gac aac ctg cta tcc tat gcc cgg gaa gct gca gac ttt 1299
Val Asn Gln Asp Asn Leu Leu Ser Tyr Ala Arg Glu Ala Ala Asp Phe
330 335 340 345

gcc acc aac tac cag ctg cca tcc tta gac ttt gcc atg aac cac tat 1347
Ala Thr Asn Tyr Gln Leu Pro Ser Leu Asp Phe Ala Met Asn His Tyr
350 355 360

ggg cag cct gat gtg gcc atg ttt gac ttt acc tgc atg tat gcc tca 1395
Gly Gln Pro Asp Val Ala Met Phe Asp Phe Thr Cys Met Tyr Ala Ser
365 370 375

gag aac gcg gcc ctg gtg cgg gag cgg cag gcg cac cag ctg ctc gtg 1443
Glu Asn Ala Ala Leu Val Arg Glu Arg Gln Ala His Gln Leu Leu Val
380 385 390

gcc ctt gtg ggt gac agc ttg ctt gag cca ttt tgg ccc atg ggt aca 1491
Ala Leu Val Gly Asp Ser Leu Leu Glu Pro Phe Trp Pro Met Gly Thr
395 400 405

ggc tgt gcc cgt ggc ttc ctg gca gcc ttt gac acg gca tgg atg gtg 1539
Gly Cys Ala Arg Gly Phe Leu Ala Ala Phe Asp Thr Ala Trp Met Val
410 415 420 425

aag agc tgg aac cag ggc acc cct ccc ctg gag ctg ctg gct gaa agg 1587
Lys Ser Trp Asn Gln Gly Thr Pro Pro Leu Glu Leu Leu Ala Glu Arg
430 435 440

gaa agt ctc tac cgg ctg tta cct cag aca acc ccg gag aac atc aac 1635

Glu Ser Leu Tyr Arg Leu Leu Pro Gln Thr Thr Pro Glu Asn Ile Asn
445 450 455

aag aac ttt gag cag tac acg ttg gac cca ggg aca cgg tac cca aac 1683
Lys Asn Phe Glu Gln Tyr Thr Leu Asp Pro Gly Thr Arg Tyr Pro Asn
460 465 470

ctc aac tca cac tgt gtc agg ccc cat cag gtg aag cat ttg tat atc 1731
Leu Asn Ser His Cys Val Arg Pro His Gln Val Lys His Leu Tyr Ile
475 480 485

act aag gag ctg gag cac tac cct ctc gag aga ctg ggc tcg gtg agg 1779
Thr Lys Glu Leu Glu His Tyr Pro Leu Glu Arg Leu Gly Ser Val Arg
490 495 500 505

aga tct gtc aac ctc tcc agg aag gag tca gat atc cgg ccc agc aag 1827
Arg Ser Val Asn Leu Ser Arg Lys Glu Ser Asp Ile Arg Pro Ser Lys
510 515 520

ctc ctg acc tgg tgc cag cag cag aca gag ggc tac cag cat gtc aac 1875
Leu Leu Thr Trp Cys Gln Gln Gln Thr Glu Gly Tyr Gln His Val Asn
525 530 535

gtc acc gac ctg acc aca tcc tgg cgc agt ggg ttg gcc ctg tgt gcc 1923
Val Thr Asp Leu Thr Thr Ser Trp Arg Ser Gly Leu Ala Leu Cys Ala
540 545 550

atc atc cac cgc ttc cgg cct gag ctc atc aac ttt gac tct ttg aat 1971
Ile Ile His Arg Phe Arg Pro Glu Leu Ile Asn Phe Asp Ser Leu Asn
555 560 565

gaa gat gat gct gtg gag aac aac cag ctc gca ttt gat gtg gcc gag 2019
Glu Asp Asp Ala Val Glu Asn Asn Gln Leu Ala Phe Asp Val Ala Glu
570 575 580 585

cga gag ttt ggg atc cct cca gtg acc acg ggc aaa gag atg gca tct 2067
Arg Glu Phe Gly Ile Pro Pro Val Thr Thr Gly Lys Glu Met Ala Ser
590 595 600

gcc cag gag cct gac aag ctc agc atg gtc atg tac ctc tcc aag ttc 2115
Ala Gln Glu Pro Asp Lys Leu Ser Met Val Met Tyr Leu Ser Lys Phe
605 610 615

tac gag ctc ttc cgg ggc acc cca ctg agg ccc gtg gat tct tgg cgc 2163
Tyr Glu Leu Phe Arg Gly Thr Pro Leu Arg Pro Val Asp Ser Trp Arg
620 625 630

aaa aac tat gga gaa aat gct gac ctc agc ttg gcc aaa tca tcc att 2211
Lys Asn Tyr Gly Glu Asn Ala Asp Leu Ser Leu Ala Lys Ser Ser Ile
635 640 645

tct aat aac tat ctc aac ctc aca ttt cca agg aag agg act cca cgg 2259

Ser Asn Asn Tyr Leu Asn Leu Thr Phe Pro Arg Lys Arg Thr Pro Arg
650 655 660 665

gtg gat ggt caa acc gga gag aat gac atg aac aaa cgg aga cgg aag 2307
Val Asp Gly Gln Thr Gly Glu Asn Asp Met Asn Lys Arg Arg Arg Lys
670 675 680

ggc ttc acc aac ctg gac gag cct tca aac ttt tcc agc cgt agc ttg 2355
Gly Phe Thr Asn Leu Asp Glu Pro Ser Asn Phe Ser Ser Arg Ser Leu
685 690 695

ggc tcc aat caa gag tgt ggg agc agt aag gaa ggt gga aat cag aac 2403
Gly Ser Asn Gln Glu Cys Gly Ser Ser Lys Glu Gly Gly Asn Gln Asn
700 705 710

aaa gtc aag tcc atg gcg aat cag ctg ctg gcc aag ttt gag gag agc 2451
Lys Val Lys Ser Met Ala Asn Gln Leu Leu Ala Lys Phe Glu Glu Ser
715 720 725

act cgg aac ccc tca ctc atg aag cag gaa aag aag tca cct tca ggg 2499
Thr Arg Asn Pro Ser Leu Met Lys Gln Glu Lys Lys Ser Pro Ser Gly
730 735 740 745

ttc cat ttt cat ccc agc cat ttg aga aca gtg cat cct cag gaa tct 2547
Phe His Phe His Pro Ser His Leu Arg Thr Val His Pro Gln Glu Ser
750 755 760

atg cga aag tca ttt ccc ctt aac ctg gga ggc agc gac acg tgt tac 2595
Met Arg Lys Ser Phe Pro Leu Asn Leu Gly Gly Ser Asp Thr Cys Tyr
765 770 775

ttc tgt aag aaa cgt gtg tac gtg atg gaa cgg ctg agc gcc gag ggc 2643
Phe Cys Lys Lys Arg Val Tyr Val Met Glu Arg Leu Ser Ala Glu Gly
780 785 790

cac ttc ttc cac cgg gag tgt ttc cgc tgc agc atc tgt gcc acc acc 2691
His Phe Phe His Arg Glu Cys Phe Arg Cys Ser Ile Cys Ala Thr Thr
795 800 805

ttg cgc ctg gcc gcc tac acc ttt gac tgc gat gaa ggc aaa ttt tac 2739
Leu Arg Leu Ala Ala Tyr Thr Phe Asp Cys Asp Glu Gly Lys Phe Tyr
810 815 820 825

tgc aag cct cac ttc att cac tgt aaa acc aat agc aaa caa cgg aag 2787
Cys Lys Pro His Phe Ile His Cys Lys Thr Asn Ser Lys Gln Arg Lys
830 835 840

aga cgg gca gag ttg aag caa caa aga gag gag gag gca aca tgg caa 2835
Arg Arg Ala Glu Leu Lys Gln Gln Arg Glu Glu Glu Ala Thr Trp Gln
845 850 855

gag cag gaa gcc cct cgg aga gac act ccc acc gaa agt tct tgc gca 2883

Glu Gln Glu Ala Pro Arg Arg Asp Thr Pro Thr Glu Ser Ser Cys Ala
860 865 870

gtg gcc gcc att ggc acc ctg gaa ggc agc ccc cca ggt atc tcc acc 2931
Val Ala Ala Ile Gly Thr Leu Glu Gly Ser Pro Pro Gly Ile Ser Thr
875 880 885

tcc ttc ttt agg aag gtg ctg ggc tgg ccc ctc agg ctg ccg agg gac 2979
Ser Phe Phe Arg Lys Val Leu Gly Trp Pro Leu Arg Leu Pro Arg Asp
890 895 900 905

ctg tgt aac tgg atg cag gga ctc ctg caa gct gct ggc ctc cat atc 3027
Leu Cys Asn Trp Met Gln Gly Leu Leu Gln Ala Ala Gly Leu His Ile
910 915 920

agg gac aat gct tac aac tac tgc tac atg tac gag ctc ctg agc ctg 3075
Arg Asp Asn Ala Tyr Asn Tyr Cys Tyr Met Tyr Glu Leu Leu Ser Leu
925 930 935

ggg ctg cca ctc ctc tgg gcg ttc tct gag gtc ctg gca gcc atg tac 3123
Gly Leu Pro Leu Leu Trp Ala Phe Ser Glu Val Leu Ala Ala Met Tyr
940 945 950

agg gaa tct gag ggc tcc ctc gag agc atc tgc aac tgg gtg ctc agg 3171
Arg Glu Ser Glu Gly Ser Leu Glu Ser Ile Cys Asn Trp Val Leu Arg
955 960 965

tgc ttc cca gtc aag ctc cgc tga catggctggc tgccccaaag tgccttcaca 3225

Cys Phe Pro Val Lys Leu Arg

970 975

tttccaggga ggcttcagat ggcagtgcgt ttgcagtttg ctcaggctct ggccaggaag 3285

cctagcattc tctaagcaat tagctcaaag ccaaagaatt tcacatgggc cacctccgcc 3345

tggccttatc agggtgaaca tctactcacg gtgctagggc cagggatgat atgaaggatc 3405

ttttctatag ctttgtgagc catacttctg ggtttacatt tcaatttttt taattttaat 3465

tagcccagag aaagcatttt tttctatgag tgtcaatttt tctaaacatg ggtttgaagc 3525

ttataaccag ttttataaac cccttgaaca ctgcagtgag ttatcaaagc cactgcctgc 3585

aaagtggatg atttaagatt ttacacgcat gaaaatgagt gtgccatctc ctgaccagtg 3645

ccttttgact taggtaccca gatgccactt gtcagcagca ggatactttt tacaacacga 3705

aagcataatt attttagaag aagagagtag aagggcagaa tagaattcaa cttacagaag 3765

cacggagcag tgtgtggttg gctgttatct gtccccctgg gaggaggact gttttgctcc 3825

cttgttttga tgttaaacag tagcttaaag gctttccccc ccataccaac tcacagccaa 3885

atgacaaaga accgtggggt ttcaacagat tctacaaaca tgcattttcc cttcccacta 3945

atgggcactg cagggaaagc ccattggcat ttgaccatgg agctgatgca gtgccaaaga 4005

tgagctcttt caactgatgg cattttagcc cctgtggctc ccagcggatc ccccagcccg 4065

ggctgcaggc tgagccaagg ctgtgcaggg tccatattgg tcaggccaag tggagtggaa 4125

gactctgtcc acttatgtgg tgtcctttgg gactgagggg gtttgttagc acatcaggct 4185

attgctggga agcgtggcct gcccagtgag cattgcctgt ggacatcctg actgcttagc 4245

tgctccgctg ccacacatat gtggtcaaaa cagaaaccaa tttcacactg ccctgggaaa 4305

ggaatgggtc tgacctccag gggaagctct accatatctt gactggcagg gaaggctggg 4365

agtggaagct atttatggac tgatccaaag gacatatgca tgagtaaggg taaaaatgag 4425

catgcaggtc cacctgtgtt cttactctgg gtatctagaa gagtcctcag ctctccctac 4485

tccacgctgc ctagacatac acagctgcag ggtctggctg aacaatcaag gggccgccag 4545

agaaaggcca tctacggtgc gcagtgtatc tggagttgct gggcccaaga tagctctgtg 4605

gagttatcac tagagatgcc tctggattaa ctaagaggtg tgcctgggtg tgggtgagga 4665

gtcagaacct ttgagagctt tgagatgaca gtttctatgg ggcgggaaga aggaggtgca 4725

tttctacaaa cacttccctg aaatccttgg gaaaaacaga ggcatggccg tggccaactc 4785

tgtgggaact ggcgcctctg tccttgttgg cactgttctc agtccgatga cttgcattgt 4845

gttttctcca atttttgctg ggattttaat gttcagcatg gtgggaggaa cccttgattc 4905

cttttgtttg agtatagaaa gtaaattttt gaggtcatga tgtgaacggc catgttattg 4965

tgattatctt cagctcagga taggctgaga tgctttgtgg agtgttccat gaagcccgag 5025

tcggaatctc tgactgtcgt gtacagccat aaggagactg gtttgaatta ctgtggcgag 5085

acagggcgtg cctgtcagaa atctgagatg tttgtacgct ctgagatgtt gaacctttct 5145

ggtgggcagc accgacaccc aggggtggac ccccgaggat gaatgcctct aggcctccgc 5205

aacatattca agaatgaatg ggagacgcta gagtaaaatg ggggcagaga ggatatcagg 5265

gagcaagatg caaactgtgt gcatccactc tcgtaaacaa gtagctggtc acaaccagaa 5325

aggttcatct ctcctaagca aacagcgact ctttcagagg aagtttccct ctttcaatcg 5385

tggccttatt ttcaactccg gtgccttctc gtgatgttaa tcatttcctt ttttccccac 5445

actaagctct cttttctatc tttctctctc tttccaatct tacgccatgg ccatcagttc 5505

atttcagcct tccagtgcta cacccacttc ttggctgaca cacttctgct ctaaggtgac 5565

tggttttctt gccaattttc aaagagtggt actaaccccc aacccgcttt ccgcaccccg 5625

tcctctccgc cagcagtact ggttgcacta actgtgagtg tcttgcatac tgatggactc 5685

atttggtggc atggttggct aacagcatgg cgggggggtgt tcagcttgag acccatgcct 5745

gtgttcattt cccatggagc tggcagcctg gtctacccca agtgcatgcc ccgcctctcc 5805

tctctccctt gggtctgcct gcgtgcatgc ttctccagtt gcgtctgcga agctacctac 5865

tttcttggga gggtcgacct tgatcatgaa acaataccat gagggggcct ctgtcacctt 5925

tgaaaagaac acttttgag cagcctcaaa aagctcatac ataccagcgc cttcttaaat 5985

tggctctaat gtaaagattg ttaatgtcat ttatcaaaac cataggtgat tatttggagg 6045

gatttaaaaa acttaattac tctcaggcct catcccaagc ttgacacatg ctctgtaggt 6105

tgaacacata atcacaaata ttctagcaaa tgctgccttg gttgcagcct gcactgtaga 6165

cccaagggtt ttgctgtggc tcttcttatc tcccttggct cataaagccc cagatgatgc 6225

cagagcttca attagagcca tcatcatccc aggcagggat atctttgaga aatgactcag 6285

ttcagcccca ggcccctgtg actctgctta aagcacacat ttctgctgac tcttgtacct 6345

ggggcagcag gataatcacc aacacactct taacgagaaa caacacacca agcaccgtgg 6405

agctgtccta ggcaacactc gcggtctcag gctgcggtgg gcgtctgtcc tgcatgtggc 6465

ccagaccacc ctgacccccg ggcctgcctg cctggccctg catgctgcac gctcactgta 6525

tttgtgcaga tcctggccag tacaaagtcg ttgctcttgt cttatcttct cttacagagt 6585

ctccctccct ttatagaatg tcaaccaaag agtgccctcc tcccctctca gcctcctctt 6645

tagctagcct ccccatctca tcacaacgca tgtctgtgac ctttggtaat catttacagt 6705

gccacacgga accctgtatt ttgcacacag caaaacaaac aatgtttagc tttatttatg 6765

gtatttgatg ctgtaaatgg aaataaatat tgttctttat 6805

<210> 4

<211> 976

<212> PRT

<213> 人類

<400> 4

Met Gly Glu Asn Glu Asp Glu Lys Gln Ala Gln Ala Gly Gln Val Phe
1 5 10 15

Glu Asn Phe Val Gln Ala Ser Thr Cys Lys Gly Thr Leu Gln Ala Phe
20 25 30

Asn Ile Leu Thr Arg His Leu Asp Leu Asp Pro Leu Asp His Arg Asn
35 40 45

Phe Tyr Ser Lys Leu Lys Ser Lys Val Thr Thr Trp Lys Ala Lys Ala
50 55 60

Leu Trp Tyr Lys Leu Asp Lys Arg Gly Ser His Lys Glu Tyr Lys Arg
65 70 75 80

Gly Lys Ser Cys Thr Asn Thr Lys Cys Leu Ile Val Gly Gly Gly Pro
85 90 95

Cys Gly Leu Arg Thr Ala Ile Glu Leu Ala Tyr Leu Gly Ala Lys Val
100 105 110

Val Val Val Glu Lys Arg Asp Ser Phe Ser Arg Asn Asn Val Leu His
115 120 125

Leu Trp Pro Phe Thr Ile His Asp Leu Arg Gly Leu Gly Ala Lys Lys
130 135 140

Phe Tyr Gly Lys Phe Cys Ala Gly Ser Ile Asp His Ile Ser Ile Arg
145 150 155 160

Gln Leu Gln Leu Ile Leu Phe Lys Val Ala Leu Met Leu Gly Val Glu
165 170 175

Ile His Val Asn Val Glu Phe Val Lys Val Leu Glu Pro Pro Glu Asp
180 185 190

Gln Glu Asn Gln Lys Ile Gly Trp Arg Ala Glu Phe Leu Pro Thr Asp
195 200 205

His Ser Leu Ser Glu Phe Glu Phe Asp Val Ile Ile Gly Ala Asp Gly
210 215 220

Arg Arg Asn Thr Leu Glu Gly Phe Arg Arg Lys Glu Phe Arg Gly Lys
225 230 235 240

Leu Ala Ile Ala Ile Thr Ala Asn Phe Ile Asn Arg Asn Ser Thr Ala
245 250 255

Glu Ala Lys Val Glu Glu Ile Ser Gly Val Ala Phe Ile Phe Asn Gln
260 265 270

Lys Phe Phe Gln Asp Leu Lys Glu Glu Thr Gly Ile Asp Leu Glu Asn
275 280 285

Ile Val Tyr Tyr Lys Asp Cys Thr His Tyr Phe Val Met Thr Ala Lys
290 295 300

Lys Gln Ser Leu Leu Asp Lys Gly Val Ile Ile Asn Asp Tyr Ile Asp
305 310 315 320

Thr Glu Met Leu Leu Cys Ala Glu Asn Val Asn Gln Asp Asn Leu Leu
325 330 335

Ser Tyr Ala Arg Glu Ala Ala Asp Phe Ala Thr Asn Tyr Gln Leu Pro
340 345 350

Ser Leu Asp Phe Ala Met Asn His Tyr Gly Gln Pro Asp Val Ala Met
355 360 365

Phe Asp Phe Thr Cys Met Tyr Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Val Arg
370 375 380

Glu Arg Gln Ala His Gln Leu Leu Val Ala Leu Val Gly Asp Ser Leu
385 390 395 400

Leu Glu Pro Phe Trp Pro Met Gly Thr Gly Cys Ala Arg Gly Phe Leu

405 410 415

Ala Ala Phe Asp Thr Ala Trp Met Val Lys Ser Trp Asn Gln Gly Thr
420 425 430

Pro Pro Leu Glu Leu Leu Ala Glu Arg Glu Ser Leu Tyr Arg Leu Leu
435 440 445

Pro Gln Thr Thr Pro Glu Asn Ile Asn Lys Asn Phe Glu Gln Tyr Thr
450 455 460

Leu Asp Pro Gly Thr Arg Tyr Pro Asn Leu Asn Ser His Cys Val Arg
465 470 475 480

Pro His Gln Val Lys His Leu Tyr Ile Thr Lys Glu Leu Glu His Tyr
485 490 495

Pro Leu Glu Arg Leu Gly Ser Val Arg Arg Ser Val Asn Leu Ser Arg
500 505 510

Lys Glu Ser Asp Ile Arg Pro Ser Lys Leu Leu Thr Trp Cys Gln Gln
515 520 525

Gln Thr Glu Gly Tyr Gln His Val Asn Val Thr Asp Leu Thr Thr Ser
530 535 540

Trp Arg Ser Gly Leu Ala Leu Cys Ala Ile Ile His Arg Phe Arg Pro
545 550 555 560

Glu Leu Ile Asn Phe Asp Ser Leu Asn Glu Asp Asp Ala Val Glu Asn
565 570 575

Asn Gln Leu Ala Phe Asp Val Ala Glu Arg Glu Phe Gly Ile Pro Pro
580 585 590

Val Thr Thr Gly Lys Glu Met Ala Ser Ala Gln Glu Pro Asp Lys Leu
595 600 605

Ser Met Val Met Tyr Leu Ser Lys Phe Tyr Glu Leu Phe Arg Gly Thr
610 615 620

Pro Leu Arg Pro Val Asp Ser Trp Arg Lys Asn Tyr Gly Glu Asn Ala
625 630 635 640

Asp Leu Ser Leu Ala Lys Ser Ser Ile Ser Asn Asn Tyr Leu Asn Leu
645 650 655

Thr Phe Pro Arg Lys Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Thr Gly Glu
660 665 670

Asn Asp Met Asn Lys Arg Arg Arg Lys Gly Phe Thr Asn Leu Asp Glu
675 680 685

Pro Ser Asn Phe Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Cys Gly
690 695 700

Ser Ser Lys Glu Gly Gly Asn Gln Asn Lys Val Lys Ser Met Ala Asn
705 710 715 720

Gln Leu Leu Ala Lys Phe Glu Glu Ser Thr Arg Asn Pro Ser Leu Met
725 730 735

Lys Gln Glu Lys Lys Ser Pro Ser Gly Phe His Phe His Pro Ser His
740 745 750

Leu Arg Thr Val His Pro Gln Glu Ser Met Arg Lys Ser Phe Pro Leu
755 760 765

Asn Leu Gly Gly Ser Asp Thr Cys Tyr Phe Cys Lys Lys Arg Val Tyr
770 775 780

Val Met Glu Arg Leu Ser Ala Glu Gly His Phe Phe His Arg Glu Cys
785 790 795 800

Phe Arg Cys Ser Ile Cys Ala Thr Thr Leu Arg Leu Ala Ala Tyr Thr
805 810 815

Phe Asp Cys Asp Glu Gly Lys Phe Tyr Cys Lys Pro His Phe Ile His

820 825 830

Cys Lys Thr Asn Ser Lys Gln Arg Lys Arg Arg Ala Glu Leu Lys Gln
835 840 845

Gln Arg Glu Glu Glu Ala Thr Trp Gln Glu Gln Glu Ala Pro Arg Arg
850 855 860

Asp Thr Pro Thr Glu Ser Ser Cys Ala Val Ala Ala Ile Gly Thr Leu
865 870 875 880

Glu Gly Ser Pro Pro Gly Ile Ser Thr Ser Phe Phe Arg Lys Val Leu
885 890 895

Gly Trp Pro Leu Arg Leu Pro Arg Asp Leu Cys Asn Trp Met Gln Gly
900 905 910

Leu Leu Gln Ala Ala Gly Leu His Ile Arg Asp Asn Ala Tyr Asn Tyr
915 920 925

Cys Tyr Met Tyr Glu Leu Leu Ser Leu Gly Leu Pro Leu Leu Trp Ala
930 935 940

Phe Ser Glu Val Leu Ala Ala Met Tyr Arg Glu Ser Glu Gly Ser Leu
945 950 955 960

Glu Ser Ile Cys Asn Trp Val Leu Arg Cys Phe Pro Val Lys Leu Arg
965 970 975

<210> 5

<211> 6742

<212> DNA

<213> 人類

<220>

<221> CDS

<222> (265)..(3132)

<223>

<400> 5

ccgggccgcc tcgctcgctc ccagctctgt cagtggcccg cggggcccga tcgctgcgcc 60

cgcggccagg gccgaggcag gcctgacccg gggccgggca gcccgcgcga ctttcggaac 120

atggcaaccc gtgtgtgtct catcccagaa agagaagact ttaaccactg tgatgcctga 180

gaatccagtg tgacgtttct ccagatactt catgctgttc acctgtgtcc tcgccgcacc 240

actgccgcac acgactcctg aacc atg ggg gaa aac gag gat gag aag cag 291
Met Gly Glu Asn Glu Asp Glu Lys Gln
1 5

gcc cag gcg ggg cag gtt ttt gag aac ttt gtc cag gca tcc acg tgc 339
Ala Gln Ala Gly Gln Val Phe Glu Asn Phe Val Gln Ala Ser Thr Cys
10 15 20 25

aaa ggt acc ctc cag gcc ttc aac att ctc aca cga cac ctg gac cta 387
Lys Gly Thr Leu Gln Ala Phe Asn Ile Leu Thr Arg His Leu Asp Leu
30 35 40

gac cct ctg gac cac aga aac ttt tat tcc aag ctc aag tcc aag gtg 435
Asp Pro Leu Asp His Arg Asn Phe Tyr Ser Lys Leu Lys Ser Lys Val
45 50 55

acc acc tgg aaa gcc aaa gcc ctg tgg tac aaa ttg gat aag cgt ggt 483
Thr Thr Trp Lys Ala Lys Ala Leu Trp Tyr Lys Leu Asp Lys Arg Gly
60 65 70

tcc cac aaa gag tat aag cga ggg aag tcg tgc acg aac acc aag tgt 531
Ser His Lys Glu Tyr Lys Arg Gly Lys Ser Cys Thr Asn Thr Lys Cys
75 80 85

ctc ata gtt ggg gga gga ccc tgt ggc ttg cgc act gcc att gaa ctt 579
Leu Ile Val Gly Gly Gly Pro Cys Gly Leu Arg Thr Ala Ile Glu Leu
90 95 100 105

gcc tac ctg gga gcc aaa gtg gtc gtg gtg gag aag agg gac tcc ttc 627

Ala Tyr Leu Gly Ala Lys Val Val Val Val Glu Lys Arg Asp Ser Phe
110 115 120

tcc cgg aac aac gtg cta cac ctc tgg cct ttc acc atc cat gac ctt 675
Ser Arg Asn Asn Val Leu His Leu Trp Pro Phe Thr Ile His Asp Leu
125 130 135

cgg ggc ctg gga gcc aag aag ttc tat ggg aag ttc tgt gct ggc tcc 723
Arg Gly Leu Gly Ala Lys Lys Phe Tyr Gly Lys Phe Cys Ala Gly Ser
140 145 150

atc gac cat atc agt att cgc caa cta cag ctc atc cta ttc aag gtg 771
Ile Asp His Ile Ser Ile Arg Gln Leu Gln Leu Ile Leu Phe Lys Val
155 160 165

gcc ctg atg ctg gga gtt gaa atc cat gtg aat gtg gag ttc gtg aag 819
Ala Leu Met Leu Gly Val Glu Ile His Val Asn Val Glu Phe Val Lys
170 175 180 185

gtt cta gag cct cct gaa gat caa gaa aat caa aaa att ggc tgg cgg 867
Val Leu Glu Pro Pro Glu Asp Gln Glu Asn Gln Lys Ile Gly Trp Arg
190 195 200

gca gaa ttt ctc cct aca gac cat tct ctg tcg gag ttt gag ttt gac 915
Ala Glu Phe Leu Pro Thr Asp His Ser Leu Ser Glu Phe Glu Phe Asp
205 210 215

gtc atc att ggt gcc gat ggc cgc agg aac acc ctg gaa ggg ttc aga 963
Val Ile Ile Gly Ala Asp Gly Arg Arg Asn Thr Leu Glu Gly Phe Arg
220 225 230

aga aaa gaa ttc cgt ggg aag ctg gcg att gcc atc acc gcc aac ttc 1011
Arg Lys Glu Phe Arg Gly Lys Leu Ala Ile Ala Ile Thr Ala Asn Phe
235 240 245

ata aac aga aac agc aca gcg gaa gcc aag gtg gaa gag att agt ggt 1059
Ile Asn Arg Asn Ser Thr Ala Glu Ala Lys Val Glu Glu Ile Ser Gly
250 255 260 265

gtg gct ttc atc ttc aat cag aaa ttt ttt cag gac ctt aaa gaa gaa 1107
Val Ala Phe Ile Phe Asn Gln Lys Phe Phe Gln Asp Leu Lys Glu Glu
270 275 280

aca ggc ata gat ctt gag aac att gtt tac tac aag gac tgc acc cac 1155
Thr Gly Ile Asp Leu Glu Asn Ile Val Tyr Tyr Lys Asp Cys Thr His
285 290 295

tat ttt gta atg aca gcc aag aag cag agc ctg ctc gac aaa ggt gtc 1203
Tyr Phe Val Met Thr Ala Lys Lys Gln Ser Leu Leu Asp Lys Gly Val
300 305 310

atc att aac gac tac atc gac aca gag atg ctg ctg tgt gcg gag aac 1251

Ile Ile Asn Asp Tyr Ile Asp Thr Glu Met Leu Leu Cys Ala Glu Asn
315 320 325

gtg aac caa gac aac ctg cta tcc tat gcc cgg gaa gct gca gac ttt 1299
Val Asn Gln Asp Asn Leu Leu Ser Tyr Ala Arg Glu Ala Ala Asp Phe
330 335 340 345

gcc acc aac tac cag ctg cca tcc tta gac ttt gcc atg aac cac tat 1347
Ala Thr Asn Tyr Gln Leu Pro Ser Leu Asp Phe Ala Met Asn His Tyr
350 355 360

ggg cag cct gat gtg gcc atg ttt gac ttt acc tgc atg tat gcc tca 1395
Gly Gln Pro Asp Val Ala Met Phe Asp Phe Thr Cys Met Tyr Ala Ser
365 370 375

gag aac gcg gcc ctg gtg cgg gag cgg cag gcg cac cag ctg ctc gtg 1443
Glu Asn Ala Ala Leu Val Arg Glu Arg Gln Ala His Gln Leu Leu Val
380 385 390

gcc ctt gtg ggt gac agc ttg ctt gag cca ttt tgg ccc atg ggt aca 1491
Ala Leu Val Gly Asp Ser Leu Leu Glu Pro Phe Trp Pro Met Gly Thr
395 400 405

ggc tgt gcc cgt ggc ttc ctg gca gcc ttt gac acg gca tgg atg gtg 1539
Gly Cys Ala Arg Gly Phe Leu Ala Ala Phe Asp Thr Ala Trp Met Val
410 415 420 425

aag agc tgg aac cag ggc acc cct ccc ctg gag ctg ctg gct gaa agg 1587
Lys Ser Trp Asn Gln Gly Thr Pro Pro Leu Glu Leu Leu Ala Glu Arg
430 435 440

gaa agt ctc tac cgg ctg tta cct cag aca acc ccg gag aac atc aac 1635
Glu Ser Leu Tyr Arg Leu Leu Pro Gln Thr Thr Pro Glu Asn Ile Asn
445 450 455

aag aac ttt gag cag tac acg ttg gac cca ggg aca cgg tac cca aac 1683
Lys Asn Phe Glu Gln Tyr Thr Leu Asp Pro Gly Thr Arg Tyr Pro Asn
460 465 470

ctc aac tca cac tgt gtc agg ccc cat cag gtg aag cat ttg tat atc 1731
Leu Asn Ser His Cys Val Arg Pro His Gln Val Lys His Leu Tyr Ile
475 480 485

act aag gag ctg gag cac tac cct ctc gag aga ctg ggc tcg gtg agg 1779
Thr Lys Glu Leu Glu His Tyr Pro Leu Glu Arg Leu Gly Ser Val Arg
490 495 500 505

aga tct gtc aac ctc tcc agg aag gag tca gat atc cgg ccc agc aag 1827
Arg Ser Val Asn Leu Ser Arg Lys Glu Ser Asp Ile Arg Pro Ser Lys
510 515 520

ctc ctg acc tgg tgc cag cag cag aca gag ggc tac cag cat gtc aac 1875

Leu Leu Thr Trp Cys Gln Gln Gln Thr Glu Gly Tyr Gln His Val Asn
525 530 535

gtc acc gac ctg acc aca tcc tgg cgc agt ggg ttg gcc ctg tgt gcc 1923
Val Thr Asp Leu Thr Thr Ser Trp Arg Ser Gly Leu Ala Leu Cys Ala
540 545 550

atc atc cac cgc ttc cgg cct gag ctc atc aac ttt gac tct ttg aat 1971
Ile Ile His Arg Phe Arg Pro Glu Leu Ile Asn Phe Asp Ser Leu Asn
555 560 565

gaa gat gat gct gtg gag aac aac cag ctc gca ttt gat gtg gcc gag 2019
Glu Asp Asp Ala Val Glu Asn Asn Gln Leu Ala Phe Asp Val Ala Glu
570 575 580 585

cga gag ttt ggg atc cct cca gtg acc acg ggc aaa gag atg gca tct 2067
Arg Glu Phe Gly Ile Pro Pro Val Thr Thr Gly Lys Glu Met Ala Ser
590 595 600

gcc cag gag cct gac aag ctc agc atg gtc atg tac ctc tcc aag ttc 2115
Ala Gln Glu Pro Asp Lys Leu Ser Met Val Met Tyr Leu Ser Lys Phe
605 610 615

tac gag ctc ttc cgg ggc acc cca ctg agg ccc gtg gat tct tgg cgc 2163
Tyr Glu Leu Phe Arg Gly Thr Pro Leu Arg Pro Val Asp Ser Trp Arg
620 625 630

aaa aac tat gga gaa aat gct gac ctc agc ttg gcc aaa tca tcc att 2211
Lys Asn Tyr Gly Glu Asn Ala Asp Leu Ser Leu Ala Lys Ser Ser Ile
635 640 645

tct aat aac tat ctc aac ctc aca ttt cca agg aag agg act cca cgg 2259
Ser Asn Asn Tyr Leu Asn Leu Thr Phe Pro Arg Lys Arg Thr Pro Arg
650 655 660 665

gtg gat ggt caa acc gga gag aat gac atg aac aaa cgg aga cgg aag 2307
Val Asp Gly Gln Thr Gly Glu Asn Asp Met Asn Lys Arg Arg Arg Lys
670 675 680

ggc ttc acc aac ctg gac gag cct tca aac ttt tcc agc cgt agc ttg 2355
Gly Phe Thr Asn Leu Asp Glu Pro Ser Asn Phe Ser Ser Arg Ser Leu
685 690 695

ggc tcc aat caa gag tgt ggg agc agt aag gaa ggt gga aat cag aac 2403
Gly Ser Asn Gln Glu Cys Gly Ser Ser Lys Glu Gly Gly Asn Gln Asn
700 705 710

aaa gtc aag tcc atg gcg aat cag ctg ctg gcc aag ttt gag gag agc 2451
Lys Val Lys Ser Met Ala Asn Gln Leu Leu Ala Lys Phe Glu Glu Ser
715 720 725

act cgg aac ccc tca ctc atg aag cag gaa tct atg cga aag tca ttt 2499

Thr Arg Asn Pro Ser Leu Met Lys Gln Glu Ser Met Arg Lys Ser Phe
730 735 740 745

ccc ctt aac ctg gga ggc agc gac acg tgt tac ttc tgt aag aaa cgt 2547
Pro Leu Asn Leu Gly Gly Ser Asp Thr Cys Tyr Phe Cys Lys Lys Arg
750 755 760

gtg tac gtg atg gaa cgg ctg agc gcc gag ggc cac ttc ttc cac cgg 2595
Val Tyr Val Met Glu Arg Leu Ser Ala Glu Gly His Phe Phe His Arg
765 770 775

gag tgt ttc cgc tgc agc atc tgt gcc acc acc ttg cgc ctg gcc gcc 2643
Glu Cys Phe Arg Cys Ser Ile Cys Ala Thr Thr Leu Arg Leu Ala Ala
780 785 790

tac acc ttt gac tgc gat gaa ggc aaa ttt tac tgc aag cct cac ttc 2691
Tyr Thr Phe Asp Cys Asp Glu Gly Lys Phe Tyr Cys Lys Pro His Phe
795 800 805

att cac tgt aaa acc aat agc aaa caa cgg aag aga cgg gca gag ttg 2739
Ile His Cys Lys Thr Asn Ser Lys Gln Arg Lys Arg Arg Ala Glu Leu
810 815 820 825

aag caa caa aga gag gag gag gca aca tgg caa gag cag gaa gcc cct 2787
Lys Gln Gln Arg Glu Glu Glu Ala Thr Trp Gln Glu Gln Glu Ala Pro
830 835 840

cgg aga gac act ccc acc gaa agt tct tgc gca gtg gcc gcc att ggc 2835
Arg Arg Asp Thr Pro Thr Glu Ser Ser Cys Ala Val Ala Ala Ile Gly
845 850 855

acc ctg gaa ggc agc ccc cca ggt atc tcc acc tcc ttc ttt agg aag 2883
Thr Leu Glu Gly Ser Pro Pro Gly Ile Ser Thr Ser Phe Phe Arg Lys
860 865 870

gtg ctg ggc tgg ccc ctc agg ctg ccg agg gac ctg tgt aac tgg atg 2931
Val Leu Gly Trp Pro Leu Arg Leu Pro Arg Asp Leu Cys Asn Trp Met
875 880 885

cag gga ctc ctg caa gct gct ggc ctc cat atc agg gac aat gct tac 2979
Gln Gly Leu Leu Gln Ala Ala Gly Leu His Ile Arg Asp Asn Ala Tyr
890 895 900 905

aac tac tgc tac atg tac gag ctc ctg agc ctg ggg ctg cca ctc ctc 3027
Asn Tyr Cys Tyr Met Tyr Glu Leu Leu Ser Leu Gly Leu Pro Leu Leu
910 915 920

tgg gcg ttc tct gag gtc ctg gca gcc atg tac agg gaa tct gag ggc 3075
Trp Ala Phe Ser Glu Val Leu Ala Ala Met Tyr Arg Glu Ser Glu Gly
925 930 935

tcc ctc gag agc atc tgc aac tgg gtg ctc agg tgc ttc cca gtc aag 3123

Ser Leu Glu Ser Ile Cys Asn Trp Val Leu Arg Cys Phe Pro Val Lys

940 945 950

ctc cgc tga catggctggc tgccccaaag tgccttcaca tttccaggga 3172

Leu Arg

955

ggcttcagat ggcagtgcgt ttgcagtttg ctcaggctct ggccaggaag cctagcattc 3232

tctaagcaat tagctcaaag ccaaagaatt tcacatgggc cacctccgcc tggccttatc 3292

agggtgaaca tctactcacg gtgctagggc cagggatgat atgaaggatc ttttctatag 3352

ctttgtgagc catacttctg ggtttacatt tcaatttttt taattttaat tagcccagag 3412

aaagcatttt tttctatgag tgtcaatttt tctaaacatg ggtttgaagc ttataaccag 3472

ttttataaac cccttgaaca ctgcagtgag ttatcaaagc cactgcctgc aaagtggatg 3532

atttaagatt ttacacgcat gaaaatgagt gtgccatctc ctgaccagtg ccttttgact 3592

taggtaccca gatgccactt gtcagcagca ggatactttt tacaacacga aagcataatt 3652

attttagaag aagagagtag aagggcagaa tagaattcaa cttacagaag cacggagcag 3712

tgtgtggttg gctgttatct gtccccctgg gaggaggact gttttgctcc cttgttttga 3772

tgttaaacag tagcttaaag gctttccccc ccataccaac tcacagccaa atgacaaaga 3832

accgtggggt ttcaacagat tctacaaaca tgcattttcc cttcccacta atgggcactg 3892

cagggaaagc ccattggcat ttgaccatgg agctgatgca gtgccaaaga tgagctcttt 3952

caactgatgg cattttagcc cctgtggctc ccagcggatc ccccagcccg ggctgcaggc 4012

tgagccaagg ctgtgcaggg tccatattgg tcaggccaag tggagtggaa gactctgtcc 4072

acttatgtgg tgtcctttgg gactgagggg gtttgttagc acatcaggct attgctggga 4132

agcgtggcct gcccagtgag cattgcctgt ggacatcctg actgcttagc tgctccgctg 4192

ccacacatat gtggtcaaaa cagaaaccaa tttcacactg ccctgggaaa ggaatgggtc 4252

tgacctccag gggaagctct accatatctt gactggcagg gaaggctggg agtggaagct 4312

atttatggac tgatccaaag gacatatgca tgagtaaggg taaaaatgag catgcaggtc 4372

cacctgtgtt cttactctgg gtatctagaa gagtcctcag ctctccctac tccacgctgc 4432

ctagacatac acagctgcag ggtctggctg aacaatcaag gggccgccag agaaaggcca 4492

tctacggtgc gcagtgtatc tggagttgct gggcccaaga tagctctgtg gagttatcac 4552

tagagatgcc tctggattaa ctaagaggtg tgcctgggtg tgggtgagga gtcagaacct 4612

ttgagagctt tgagatgaca gtttctatgg ggcgggaaga aggaggtgca tttctacaaa 4672

cacttccctg aaatccttgg gaaaaacaga ggcatggccg tggccaactc tgtgggaact 4732

ggcgcctctg tccttgttgg cactgttctc agtccgatga cttgcattgt gttttctcca 4792

atttttgctg ggattttaat gttcagcatg gtgggaggaa cccttgattc cttttgtttg 4852

agtatagaaa gtaaattttt gaggtcatga tgtgaacggc catgttattg tgattatctt 4912

cagctcagga taggctgaga tgctttgtgg agtgttccat gaagcccgag tcggaatctc 4972

tgactgtcgt gtacagccat aaggagactg gtttgaatta ctgtggcgag acagggcgtg 5032

cctgtcagaa atctgagatg tttgtacgct ctgagatgtt gaacctttct ggtgggcagc 5092

accgacaccc aggggtggac ccccgaggat gaatgcctct aggcctccgc aacatattca 5152

agaatgaatg ggagacgcta gagtaaaatg ggggcagaga ggatatcagg gagcaagatg 5212

caaactgtgt gcatccactc tcgtaaacaa gtagctggtc acaaccagaa aggttcatct 5272

ctcctaagca aacagcgact ctttcagagg aagtttccct ctttcaatcg tggccttatt 5332

ttcaactccg gtgccttctc gtgatgttaa tcatttcctt ttttccccac actaagctct 5392

cttttctatc tttctctctc tttccaatct tacgccatgg ccatcagttc atttcagcct 5452

tccagtgcta cacccacttc ttggctgaca cacttctgct ctaaggtgac tggttttctt 5512

gccaattttc aaagagtggt actaaccccc aacccgcttt ccgcaccccg tcctctccgc 5572

cagcagtact ggttgcacta actgtgagtg tcttgcatac tgatggactc atttggtggc 5632

atggttggct aacagcatgg cgggggggtgt tcagcttgag acccatgcct gtgttcattt 5692

cccatggagc tggcagcctg gtctacccca agtgcatgcc ccgcctctcc tctctccctt 5752

gggtctgcct gcgtgcatgc ttctccagtt gcgtctgcga agctacctac tttcttggga 5812

gggtcgacct tgatcatgaa acaataccat gaggggggcct ctgtcacctt tgaaaagaac 5872

acttttgag cagcctcaaa aagctcatac ataccagcgc cttcttaaat tggctctaat 5932

gtaaagattg ttaatgtcat ttatcaaaac cataggtgat tatttggagg gatttaaaaa 5992

acttaattac tctcaggcct catcccaagc ttgacacatg ctctgtaggt tgaacacata 6052

atcacaaata ttctagcaaa tgctgccttg gttgcagcct gcactgtaga cccaagggtt 6112

ttgctgtggc tcttcttatc tcccttggct cataaagccc cagatgatgc cagagcttca 6172

attagagcca tcatcatccc aggcagggat atctttgaga aatgactcag ttcagcccca 6232

ggcccctgtg actctgctta aagcacacat ttctgctgac tcttgtacct ggggcagcag 6292

gataatcacc aacacactct taacgagaaa caacacacca agcaccgtgg agctgtccta 6352

ggcaacactc gcggtctcag gctgcggtgg gcgtctgtcc tgcatgtggc ccagaccacc 6412

ctgacccccg ggcctgcctg cctggccctg catgctgcac gctcactgta tttgtgcaga 6472

tcctggccag tacaaagtcg ttgctcttgt cttatcttct cttacagagt ctccctccct 6532

ttatagaatg tcaaccaaag agtgccctcc tcccctctca gcctcctctt tagctagcct 6592

ccccatctca tcacaacgca tgtctgtgac ctttggtaat catttacagt gccacacgga 6652

accctgtatt ttgcacacag caaaacaaac aatgtttagc tttatttatg gtatttgatg 6712

ctgtaaatgg aaataaatat tgttctttat 6742

<210> 6

<211> 955

〈212〉 PRT

〈213〉 人類

〈400〉 6

Met Gly Glu Asn Glu Asp Glu Lys Gln Ala Gln Ala Gly Gln Val Phe
1 5 10 15

Glu Asn Phe Val Gln Ala Ser Thr Cys Lys Gly Thr Leu Gln Ala Phe
20 25 30

Asn Ile Leu Thr Arg His Leu Asp Leu Asp Pro Leu Asp His Arg Asn
35 40 45

Phe Tyr Ser Lys Leu Lys Ser Lys Val Thr Thr Trp Lys Ala Lys Ala
50 55 60

Leu Trp Tyr Lys Leu Asp Lys Arg Gly Ser His Lys Glu Tyr Lys Arg
65 70 75 80

Gly Lys Ser Cys Thr Asn Thr Lys Cys Leu Ile Val Gly Gly Gly Pro
85 90 95

Cys Gly Leu Arg Thr Ala Ile Glu Leu Ala Tyr Leu Gly Ala Lys Val
100 105 110

Val Val Val Glu Lys Arg Asp Ser Phe Ser Arg Asn Asn Val Leu His

115 120 125

Leu Trp Pro Phe Thr Ile His Asp Leu Arg Gly Leu Gly Ala Lys Lys
130 135 140

Phe Tyr Gly Lys Phe Cys Ala Gly Ser Ile Asp His Ile Ser Ile Arg
145 150 155 160

Gln Leu Gln Leu Ile Leu Phe Lys Val Ala Leu Met Leu Gly Val Glu
165 170 175

Ile His Val Asn Val Glu Phe Val Lys Val Leu Glu Pro Pro Glu Asp
180 185 190

Gln Glu Asn Gln Lys Ile Gly Trp Arg Ala Glu Phe Leu Pro Thr Asp
195 200 205

His Ser Leu Ser Glu Phe Glu Phe Asp Val Ile Ile Gly Ala Asp Gly
210 215 220

Arg Arg Asn Thr Leu Glu Gly Phe Arg Arg Lys Glu Phe Arg Gly Lys
225 230 235 240

Leu Ala Ile Ala Ile Thr Ala Asn Phe Ile Asn Arg Asn Ser Thr Ala
245 250 255

Glu Ala Lys Val Glu Glu Ile Ser Gly Val Ala Phe Ile Phe Asn Gln
260 265 270

Lys Phe Phe Gln Asp Leu Lys Glu Glu Thr Gly Ile Asp Leu Glu Asn
275 280 285

Ile Val Tyr Tyr Lys Asp Cys Thr His Tyr Phe Val Met Thr Ala Lys
290 295 300

Lys Gln Ser Leu Leu Asp Lys Gly Val Ile Ile Asn Asp Tyr Ile Asp
305 310 315 320

Thr Glu Met Leu Leu Cys Ala Glu Asn Val Asn Gln Asp Asn Leu Leu
325 330 335

Ser Tyr Ala Arg Glu Ala Ala Asp Phe Ala Thr Asn Tyr Gln Leu Pro
340 345 350

Ser Leu Asp Phe Ala Met Asn His Tyr Gly Gln Pro Asp Val Ala Met
355 360 365

Phe Asp Phe Thr Cys Met Tyr Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Val Arg
370 375 380

Glu Arg Gln Ala His Gln Leu Leu Val Ala Leu Val Gly Asp Ser Leu
385 390 395 400

Leu Glu Pro Phe Trp Pro Met Gly Thr Gly Cys Ala Arg Gly Phe Leu
405 410 415

Ala Ala Phe Asp Thr Ala Trp Met Val Lys Ser Trp Asn Gln Gly Thr
420 425 430

Pro Pro Leu Glu Leu Leu Ala Glu Arg Glu Ser Leu Tyr Arg Leu Leu
435 440 445

Pro Gln Thr Thr Pro Glu Asn Ile Asn Lys Asn Phe Glu Gln Tyr Thr
450 455 460

Leu Asp Pro Gly Thr Arg Tyr Pro Asn Leu Asn Ser His Cys Val Arg
465 470 475 480

Pro His Gln Val Lys His Leu Tyr Ile Thr Lys Glu Leu Glu His Tyr
485 490 495

Pro Leu Glu Arg Leu Gly Ser Val Arg Arg Ser Val Asn Leu Ser Arg
500 505 510

Lys Glu Ser Asp Ile Arg Pro Ser Lys Leu Leu Thr Trp Cys Gln Gln
515 520 525

Gln Thr Glu Gly Tyr Gln His Val Asn Val Thr Asp Leu Thr Thr Ser

530 535 540

Trp Arg Ser Gly Leu Ala Leu Cys Ala Ile Ile His Arg Phe Arg Pro
545 550 555 560

Glu Leu Ile Asn Phe Asp Ser Leu Asn Glu Asp Asp Ala Val Glu Asn
565 570 575

Asn Gln Leu Ala Phe Asp Val Ala Glu Arg Glu Phe Gly Ile Pro Pro
580 585 590

Val Thr Thr Gly Lys Glu Met Ala Ser Ala Gln Glu Pro Asp Lys Leu
595 600 605

Ser Met Val Met Tyr Leu Ser Lys Phe Tyr Glu Leu Phe Arg Gly Thr
610 615 620

Pro Leu Arg Pro Val Asp Ser Trp Arg Lys Asn Tyr Gly Glu Asn Ala
625 630 635 640

Asp Leu Ser Leu Ala Lys Ser Ser Ile Ser Asn Asn Tyr Leu Asn Leu
645 650 655

Thr Phe Pro Arg Lys Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Thr Gly Glu
660 665 670

Asn Asp Met Asn Lys Arg Arg Arg Lys Gly Phe Thr Asn Leu Asp Glu
675 680 685

Pro Ser Asn Phe Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Cys Gly
690 695 700

Ser Ser Lys Glu Gly Gly Asn Gln Asn Lys Val Lys Ser Met Ala Asn
705 710 715 720

Gln Leu Leu Ala Lys Phe Glu Glu Ser Thr Arg Asn Pro Ser Leu Met
725 730 735

Lys Gln Glu Ser Met Arg Lys Ser Phe Pro Leu Asn Leu Gly Gly Ser
740 745 750

Asp Thr Cys Tyr Phe Cys Lys Lys Arg Val Tyr Val Met Glu Arg Leu
755 760 765

Ser Ala Glu Gly His Phe Phe His Arg Glu Cys Phe Arg Cys Ser Ile
770 775 780

Cys Ala Thr Thr Leu Arg Leu Ala Ala Tyr Thr Phe Asp Cys Asp Glu
785 790 795 800

Gly Lys Phe Tyr Cys Lys Pro His Phe Ile His Cys Lys Thr Asn Ser
805 810 815

Lys Gln Arg Lys Arg Arg Ala Glu Leu Lys Gln Gln Arg Glu Glu Glu
820 825 830

Ala Thr Trp Gln Glu Gln Glu Ala Pro Arg Arg Asp Thr Pro Thr Glu
835 840 845

Ser Ser Cys Ala Val Ala Ala Ile Gly Thr Leu Glu Gly Ser Pro Pro
850 855 860

Gly Ile Ser Thr Ser Phe Phe Arg Lys Val Leu Gly Trp Pro Leu Arg
865 870 875 880

Leu Pro Arg Asp Leu Cys Asn Trp Met Gln Gly Leu Leu Gln Ala Ala
885 890 895

Gly Leu His Ile Arg Asp Asn Ala Tyr Asn Tyr Cys Tyr Met Tyr Glu
900 905 910

Leu Leu Ser Leu Gly Leu Pro Leu Leu Trp Ala Phe Ser Glu Val Leu
915 920 925

Ala Ala Met Tyr Arg Glu Ser Glu Gly Ser Leu Glu Ser Ile Cys Asn
930 935 940

Trp Val Leu Arg Cys Phe Pro Val Lys Leu Arg

945 950 955

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 7

ccgacactct gggtaggaga 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 8

tacgtgagct ctgaggacca 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 9

tgaagcaaca aagagaggag gag 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 10

ccgtgtggca ctgtaaatga tta 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 11

catccacgaa actaccttca act 23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 12

tctccttaga gagaagtggg gtg 23

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 13

ccgacactct gggtaggaga 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 14

tacgtgagct ctgaggacca 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 15

gcagggatat ctttgagaaa 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 16

ccaggatctg cacaaataca 20

<210> 17

<211> 50

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 17

cgtggatccc agaccgtgca tcatgggcac atctgaagaa ggaaacttgc 50

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 18

aatctcgagt caggggcaga aggggaataa gg 32

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 19

cccaagctta tgggggaaaa cgaggatga 29

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> RT-PCR 使用的人造合成引子序列

<400> 20

ttttccttttt gcggccgcgc ggagcttgac tgggaagc 38

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> SiRNA 的人造合成目標序列

<400> 21

tagggcccat ggggcccgg 19

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> SiRNA 的人造合成目標序列

<400> 22

accagttggg cccaaaggc 19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> SiRNA 的人造合成目標序列

<400> 23

aggcccaatg ttgcccctt 19

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> SiRNA 的人造合成目標序列

<400> 24

tgttgcccct tggcccctc 19

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> SiRNA 的人造合成目標序列

<400> 25

gaagcagcac gacttcttc 19

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

〈213〉 人造

〈220〉

〈223〉 SiRNA 的人造合成目標序列

〈400〉 26

gctgctggcc tccatatca 19

〈210〉 27

〈211〉 19

〈212〉 DNA

〈213〉 人造

〈220〉

〈223〉 SiRNA 的人造合成目標序列

〈400〉 27

tgcttacaac tactgctac 19

〈210〉 28

〈211〉 19

〈212〉 DNA

〈213〉 人造

〈220〉

〈223〉 SiRNA 的人造合成目標序列

〈400〉 28

ctactgctac atgtacgag 19

四、中文發明摘要　（發明名稱：攝護腺癌相關基因與多胜肽）

本申請案提供新穎人類基因 *MICAL2-PV* ，其在攝護腺癌中表現顯著升高。本案更提供該基因所編碼多胜肽，及在攝護腺癌中表現亦升高的 *PCOTH* 所編碼的多胜肽。該基因及其所編碼的多胜肽可用於如攝護腺癌的診斷、作為發展抗該疾病之藥物的目標分子、及用於減緩攝護腺癌的細胞生長。

本案若有化學式，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

五、英文發明摘要　（發明名稱：GENES AND POLYPEPTIDES RELATING TO PROSTATE CANCERS）

The present application provides novel human gene *MICAL2-PV* whose expression is markedly elevated in prostate cancers. Furthermore, it provides polypeptides encoded by the gene as well as polypeptides encoded by *PCOTH* which expression was also discovered to be elevated in prostate cancers. The genes and polypeptides encoded by the genes can be used, for example, in the diagnosis

四、中文發明摘要　（發明名稱：攝護腺癌相關基因與多胜肽）

五、英文發明摘要　（發明名稱：GENES AND POLYPEPTIDES RELATING TO PROSTATE CANCERS）

of prostate cancers, as target molecules for developing drugs against the disease, and for attenuating cell growth of prostate cancer.

六、申請專利範圍

1. 一種實質上純多胜肽，其選自：

(a)一種多胜肽，由序列識別號：4或6之胺基酸序列所構成；

(b)一種多胜肽，由序列識別號：4或6之胺基酸序列所構成，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性；

(c)一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號：3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性。

2. 一種實質上純多胜肽，其選自：

(a)一種多胜肽，由序列識別號：2之胺基酸序列所構成；

(b)一種多胜肽，由序列識別號：2之胺基酸序列所構成，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：2之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性。

3. 一種單離的多核苷酸，其編碼如申請專利範圍第1或2項所述之多胜肽。

4. 一種載體，其包含如申請專利範圍第3項所述之多核苷酸。

5. 一種寄主細胞，其載有如申請專利範圍第3項所述之多核苷酸或如申請專利範圍第4項所述之載體。

六、申請專利範圍

6. 一種製造如申請專利範圍第1或2項所述多胜肽之方法，其包含步驟：

(a)培養如申請專利範圍第5項所述之寄主細胞；

(b)使該寄主細胞表現該多胜肽；及

(c)收集該表現的多胜肽。

7. 一種抗體，其連接至如申請專利範圍第1項所述之多胜肽。

8. 一種多胜肽，其為互補於編碼如申請專利範圍第1項所述之多胜肽的多核苷酸，或為其互補股，包含至少15個核苷酸。

9. 一種反義股多核苷酸或小干擾RNA，其為抗編碼如申請專利範圍第1項所述之多胜肽的多核苷酸。

10. 如申請專利範圍第9項所述之小干擾RNA，其中該順義股為序列識別號: 27之核苷酸序列。

11. 一種診斷攝護腺癌的方法，其包含步驟：

(a)生物樣本中，偵測編碼序列識別號: 2、4、或6之胺基酸序列的基因表現程度；

(b)該表現程度升高表示與該疾病相關。

12. 如申請專利範圍第11項所述之方法，其中該表現程度以選自下列任一方法偵測：

(a)偵測編碼序列識別號: 2、4、或6之胺基酸序列的mRNA；

(b)偵測包含序列識別號: 2、4、或6之胺基酸序列的蛋白質；

六、申請專利範圍

(c)偵測包含序列識別號: 2、4、或6之胺基酸序列的蛋白質生物活性。

13.一種化合物篩選方法，以治療或預防攝護腺癌，其包含步驟：

(a)使測試化合物與選自下列的多胜肽接觸：

(1)一種多胜肽，其包含序列識別號: 2、4、或6之胺基酸序列；

(2)一種多胜肽，其包含序列識別號: 2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號: 4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性；

(3)一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號: 1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號: 4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性；

(b)偵測該多胜肽與該測試化合物的連接活性；及

(c)篩選連接至該多胜肽的化合物。

14.一種化合物篩選方法，以治療或預防攝護腺癌，其包含步驟：

(a)使測試化合物與選自下列的多胜肽接觸：

(1)一種多胜肽，其包含序列識別號: 2、4、或6之胺基酸序列；

(2)一種多胜肽，其包含序列識別號: 2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插

六、申請專利範圍

入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性；

（3）一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號：1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性；

（b）偵測步驟(a)多胜肽的生物活性；及

（c）比較無該測試化合物存在下的生物活性，篩選抑制該多胜肽生物活性的化合物。

15. 如申請專利範圍第14項所述之方法，其中該生物活性為細胞增殖活性。

16. 一種化合物篩選方法，以治療或預防攝護腺癌，其包含步驟：

（a）使測試化合物與表現一或多個包含序列識別號：1、3或5之核苷酸序列的多核苷酸接觸；

（b）比較無該測試化合物存在下的表現程度，篩選使含有序列識別號：1、3或5之核苷酸序列的一或多個多核苷酸的表現程度降低的化合物。

17. 如申請專利範圍第16項所述之方法，其中該細胞為攝護腺癌細胞。

18. 一種化合物篩選方法，以治療或預防攝護腺癌，其包含步驟：

（a）使測試化合物與細胞接觸，該細胞由含有一或多個指標基因的轉錄調節區域及在該轉錄調節區域控制下表

六、申請專利範圍

現的報導基因的載體所導入，其中一或多個指標基因包含選自序列識別號：1、3或5的任一多核苷酸序列；

（b）測量該報導基因的活性；

（c）比較控制組，篩選該報導基因表現程度降低的化合物。

19. 一種化合物篩選方法，以治療或預防攝護腺癌，其包含步驟：

（a）在測試化合物存在下，使肌動蛋白與選自下列的多胜肽接觸：

（1）一種多胜肽，其包含序列識別號：4或6之胺基酸序列；

（2）一種多胜肽，其包含序列識別號：4或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性；

（3）一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號：3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性；

（b）偵測該多胜肽與肌動蛋白的連接；及

（c）篩選抑制該多胜肽與肌動蛋白連接的測試化合物。

20. 一種治療或預防攝護腺癌的組成物，其包含一藥理上有效量的反義股多核苷酸或小干擾RNA為活性成分，

六、申請專利範圍

及醫藥可接受載體，該反義股多核苷酸或小干擾RNA為抗編碼選自下列多胜肽的多核苷酸：

（a）一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列；

（b）一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性；及

（c）一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號：1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性。

21. 如申請專利範圍第20項所述之組成物，其中該小干擾RNA的順義股為序列識別號：23或27之核苷酸序列。

22. 一種治療或預防攝護腺癌的組合物，其包含一藥理上有效量的抗體為活性成分，及醫藥可接受載體，該抗體為抗選自下列多胜肽者：

（a）一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列；

（b）一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性；及

（c）一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在

六、申請專利範圍

嚴謹條件下與序列識別號：1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性。

23. 一種治療或預防攝護腺癌的組合物，其包含選自如申請專利範圍第13-19項任一項所述之方法的化合物的藥理上有效量為活性成分，及醫藥可接受載體。

24. 一種治療或預防攝護腺癌的方法，其包含投予一藥理上有效量的反義股多核苷酸或小干擾RNA的步驟，該反義股多核苷酸或小干擾RNA為抗編碼選自下列多胜肽的多核苷酸：

(a)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列；

(b)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性；及

(c)一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號：1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性。

25. 如申請專利範圍第24項所述之方法，其中該小干擾RNA的順義股為序列識別號：23或27之核苷酸序列。

26. 一種治療或預防攝護腺癌的方法，其包含投予一藥理上有效量的抗體的步驟，該抗體為抗選自如下列多胜

六、申請專利範圍

肽者：

(a)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列；

(b)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性；及

(c)一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號：1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性。

27.一種治療或預防攝護腺癌的方法，其包含投予選自如申請專利範圍第13-19項任一項之方法的化合物的一藥理上有效量的步驟。

28.一種治療或預防攝護腺癌的方法，其包含投予一藥理上有效量的多胜肽的步驟，該多胜肽為選自(a)-(c)的多胜肽或編碼該多胜肽的多核苷酸：

(a)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，或其片段；

(b)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性，或其片段；及

(c)一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在

六、申請專利範圍

嚴謹條件下與序列識別號：1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性，或其片段。

29. 一種誘導抗腫瘤免疫的方法，其包含使選自(a)-(c)的多胜肽與抗原表現細胞接觸，或將編碼該多胜肽的多核苷酸或包含多核苷酸的載體呈現於抗原表現細胞：

(a)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，或其片段；

(b)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性，或其片段；及

(c)一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號：1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性，或其片段。

30. 如申請專利範圍第29項所述之誘導抗腫瘤免疫的方法，其中該方法更包含投予個體該抗原表現細胞的步驟。

31. 一種治療或預防攝護腺癌的醫藥組合物，其包含一藥理上有效量的多胜肽為活性成分，及醫藥上可接受載體，該多胜肽為選自(a)-(c)的多胜肽或編碼該多胜肽的多核苷酸：

六、申請專利範圍

(a)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，或其片段；

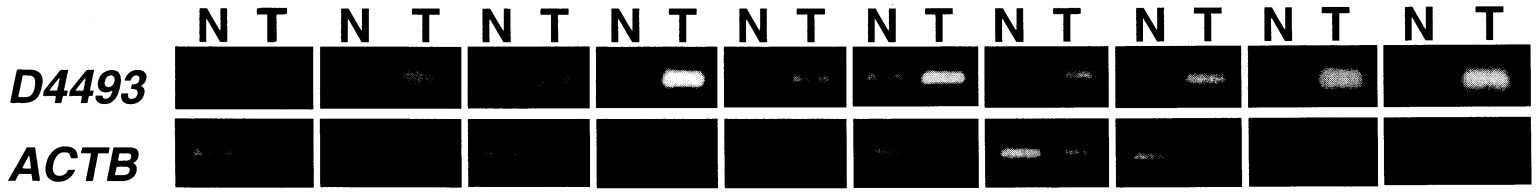
(b)一種多胜肽，其包含序列識別號：2、4、或6之胺基酸序列，其中有一或多個胺基酸被取代、缺失、插入、及/或加入，但具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的蛋白質生物活性，或其片段；及

(c)一種多胜肽，由多核苷酸所編碼，該多核苷酸在嚴謹條件下與序列識別號：1、3或5之核苷酸序列雜交，其中該多胜肽具有相等於由序列識別號：2、4或6之胺基酸序列所構成的多胜肽生物活性，或其片段。

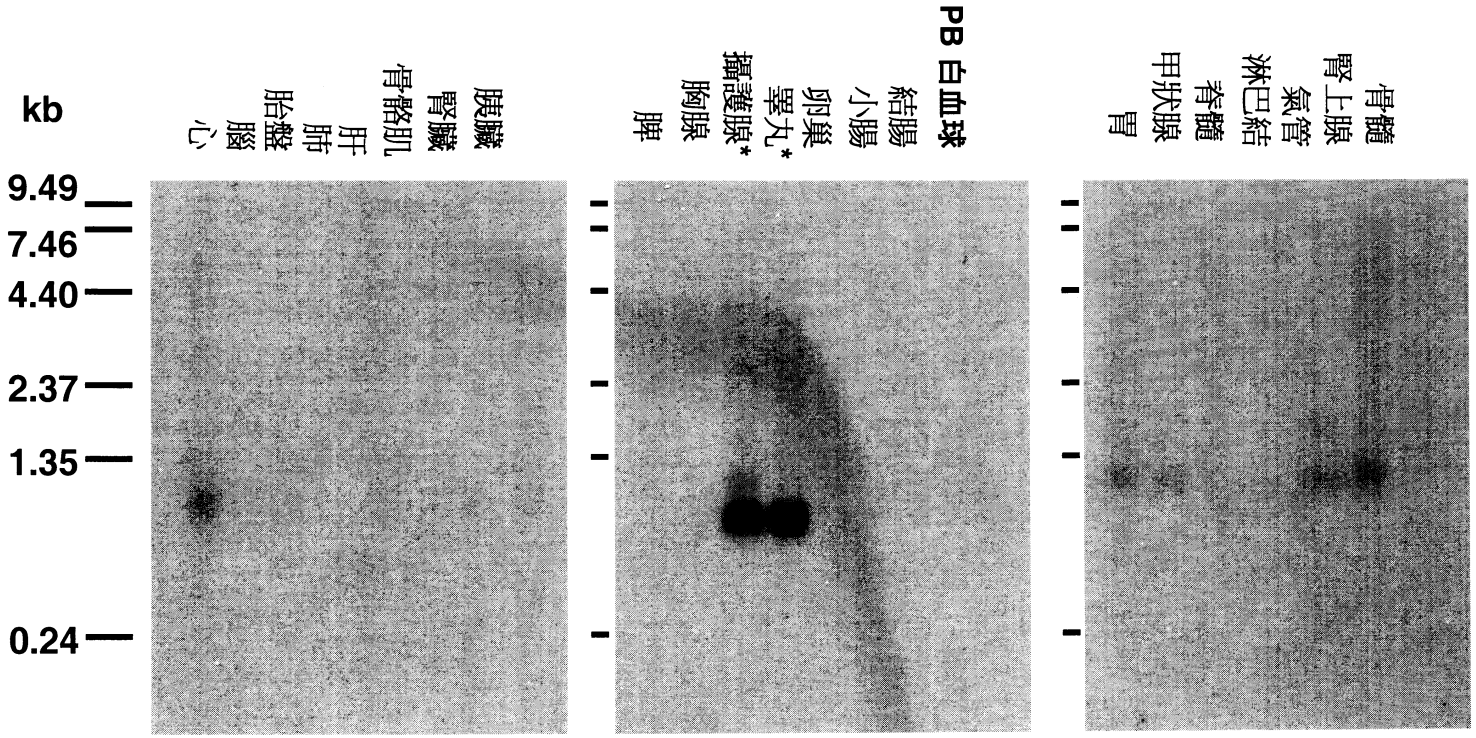
32. 如申請專利範圍第31項所述之醫藥組合物，其中該多核苷酸與該表現載體作用。

33. 一種診斷劑，其包含與編碼如申請專利範圍第1項所述之多胜肽的多核苷酸雜交的寡核苷酸，或連接於如申請專利範圍第1項所述之多胜肽的抗體。

(A)



(B)



(C)

MGTSEEGNLLSTVSPTVKALFGKTRVSPIFPFSPRSPFQPLIPRTP

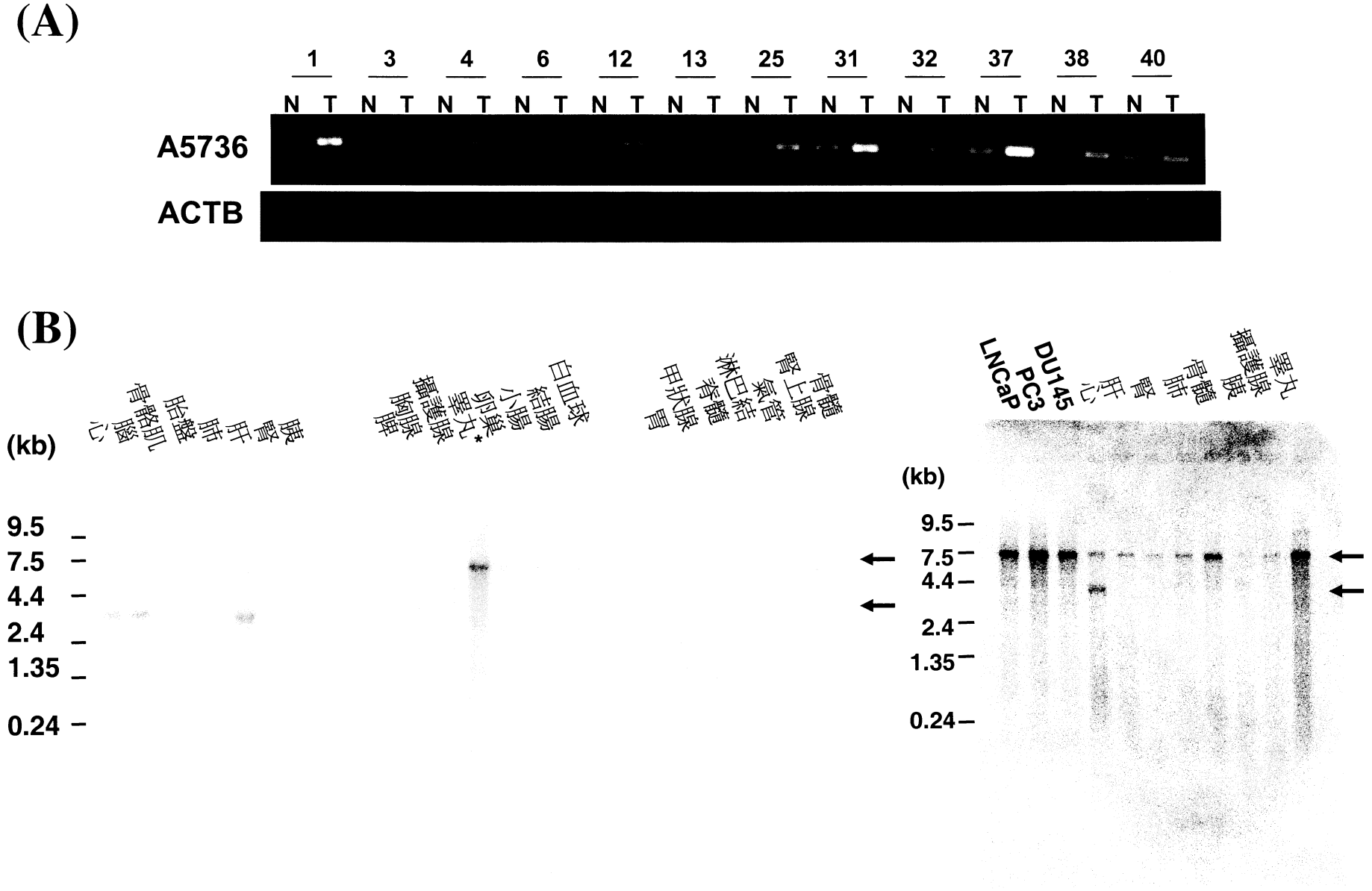
GSPWGPVGPASPLGPGFPIGPMGPGKPVGPKGPMLPLGP

SGPVGPTSPLFPFCP

膠原三級螺旋體重複組(G-X-X)n

第 1 圖

200413539



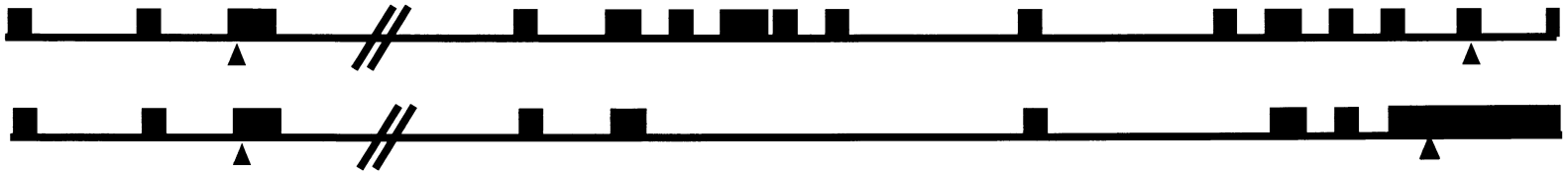
第 2 圖

200413539

(C)

MICAL2
(KIAA0750)

mRNA: 3885 bp
蛋白質 : 1124 aa
(編號 NM_014632)



MICAL2-PV

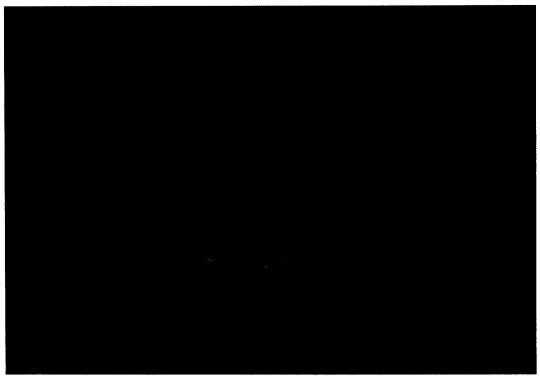
長型
mRNA: 6805 bp
蛋白質 : 976 aa
(編號 AB110785)

短型
mRNA: 6742 bp
蛋白質 : 955 aa
(編號 AB110786)

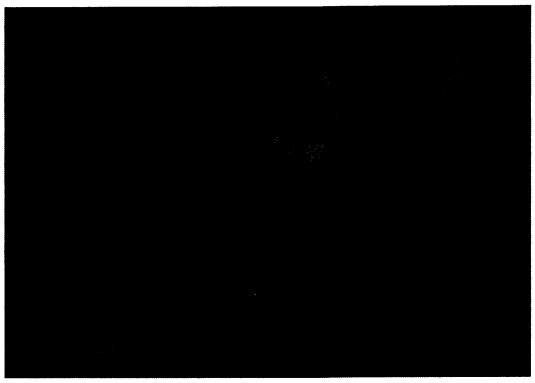
第 2 圖

200413539

(A) PCOTH

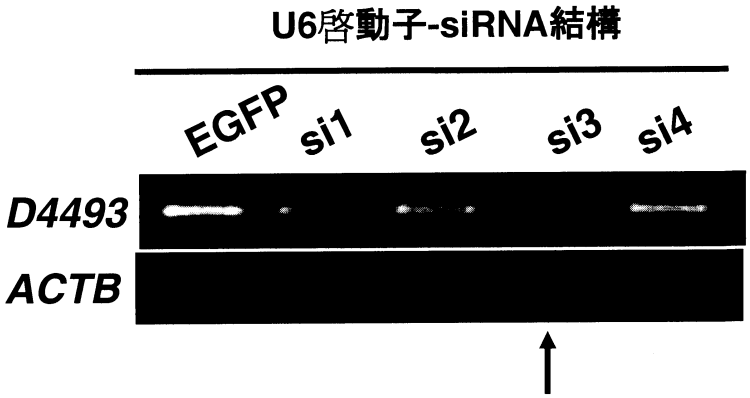


(B) MICAL2-PV

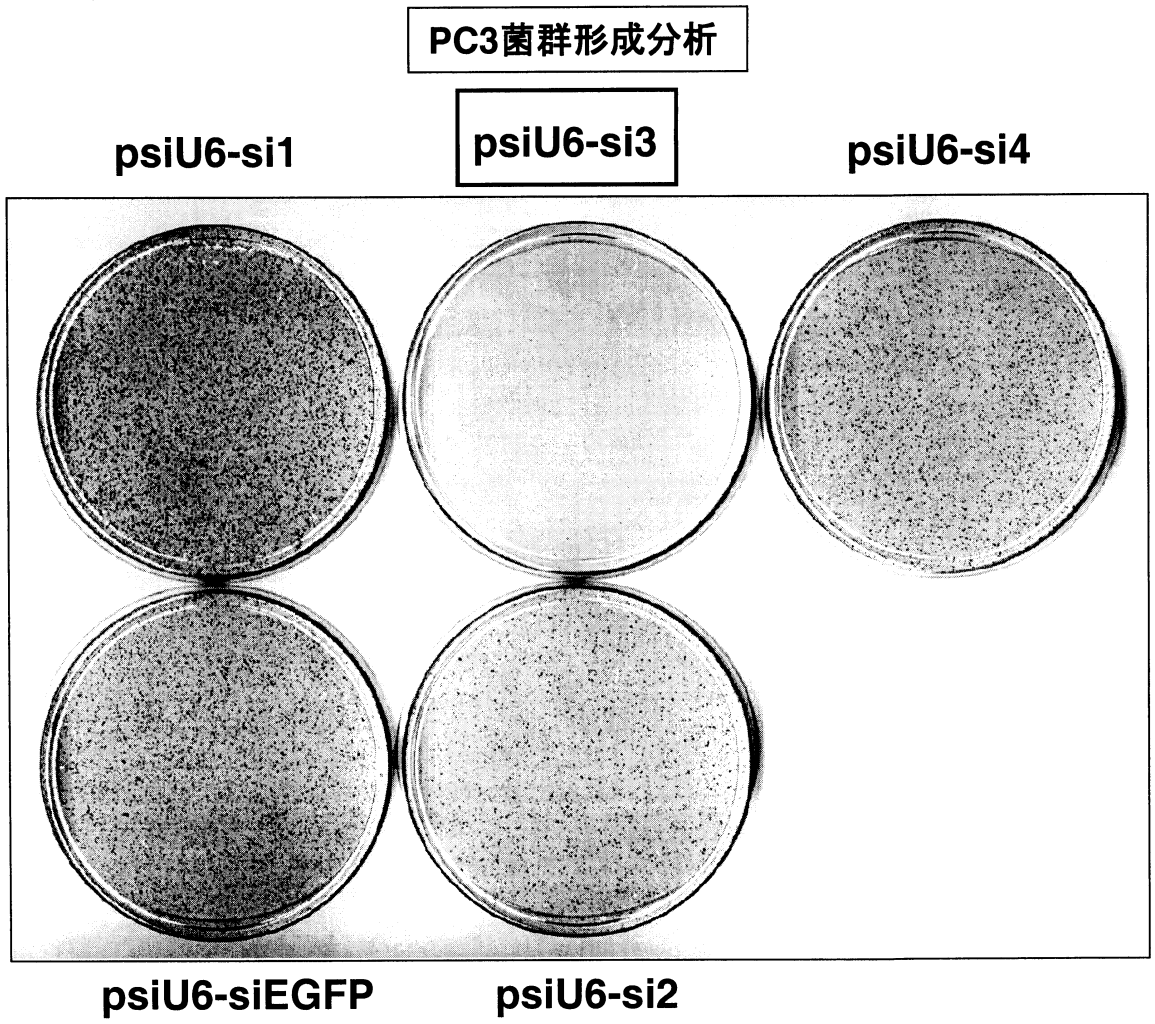


第 3 圖

(A)

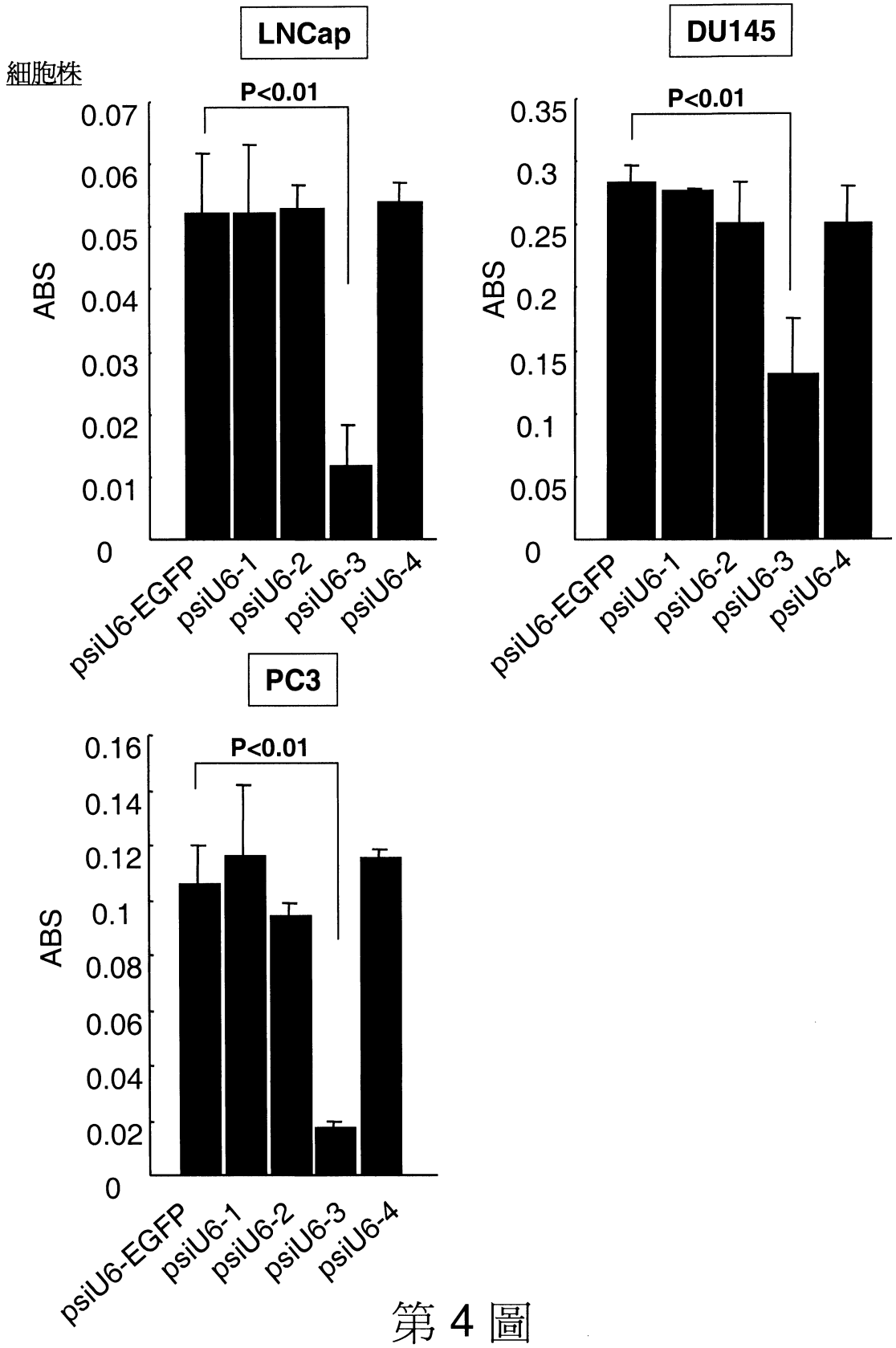

U6啓動子-siRNA結構
EGFP
si1
si2
si3
si4
D4493
ACTB

(B)


PC3菌群形成分析
psiU6-si1
psiU6-si3
psiU6-si4
psiU6-siEGFP
psiU6-si2

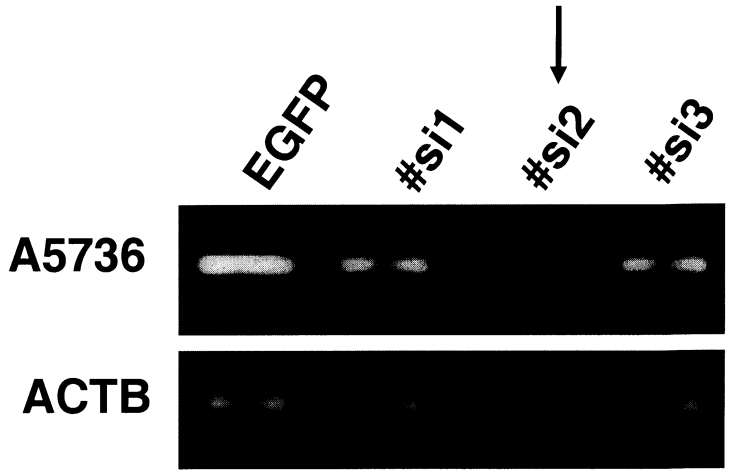
第 4 圖

(C)

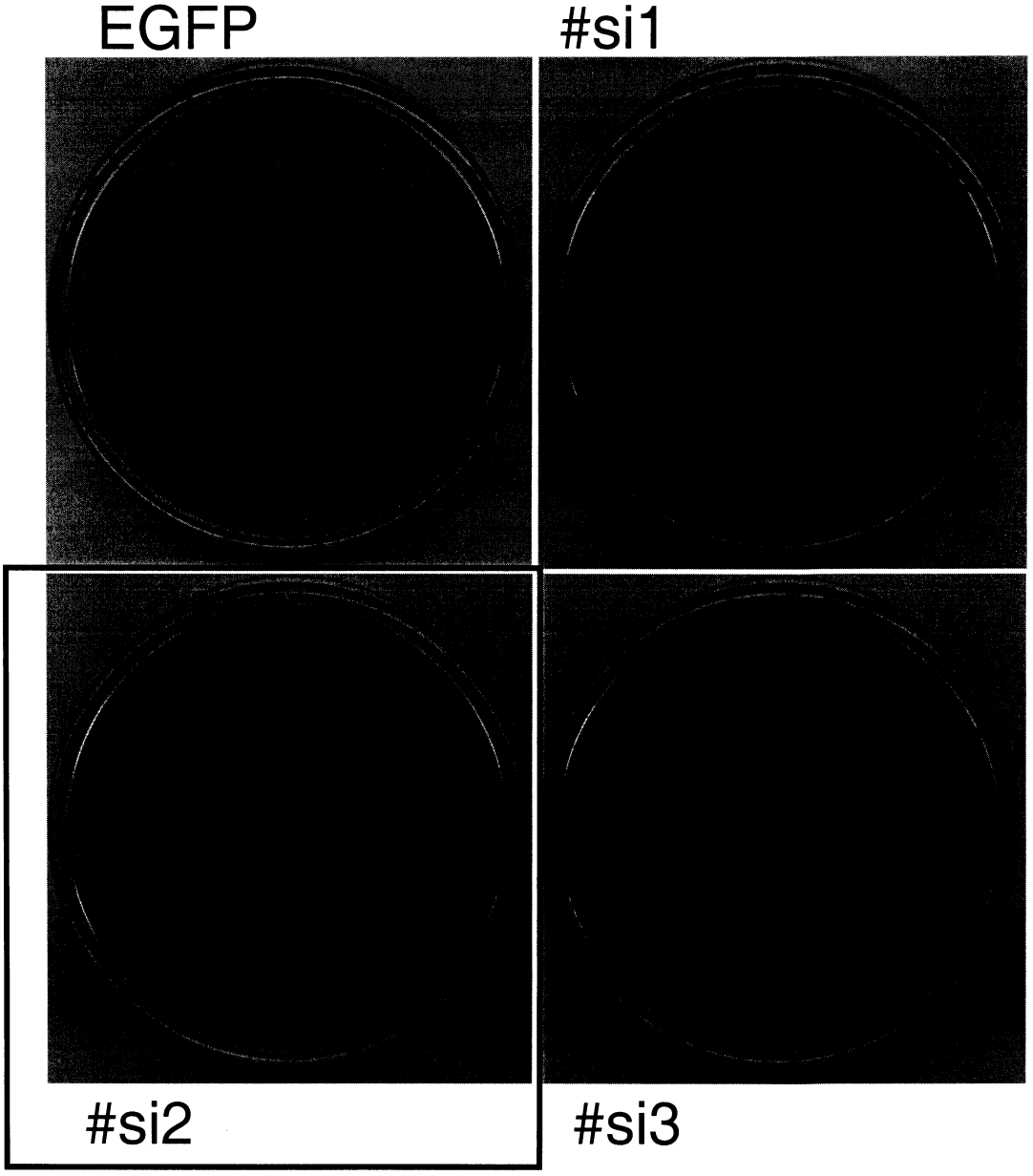

LNCap
DU145
PC3
細胞株
P<0.01
ABS
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0.16
0.14
0.12
0.08
psiU6-EGFP
psiU6-1
psiU6-2
psiU6-3
psiU6-4

第 4 圖

(D)



(E)



第 4 圖

六、指定代表圖

（一）、本案代表圖為：第__2C__圖

（二）、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：無