

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504811  
(P2004-504811A)

(43) 公表日 平成16年2月19日(2004.2.19)

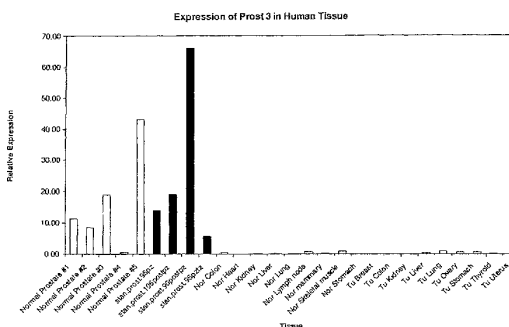
(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 5
A 6 1 K 38/46	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 131 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-578648 (P2001-578648)	(71) 出願人	300049958
(86) (22) 出願日	平成13年4月26日 (2001. 4. 26)		シエーリング アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成14年10月25日 (2002. 10. 25)		ドイツ連邦共和国 デー-1 3 3 5 3 ベ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/013323		ルリン ミューラーシュトラッセ 1 7 8
(87) 国際公開番号	W02001/081577	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成13年11月1日 (2001. 11. 1)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	60/200, 065	(74) 代理人	100092624
(32) 優先日	平成12年4月27日 (2000. 4. 27)		弁理士 鶴田 準一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	09/838, 785		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成13年4月20日 (2001. 4. 20)	(74) 代理人	100082898
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 西山 雅也
		(74) 代理人	100081330
			弁理士 樋口 外治
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規PROST03ポリペプチドをコードするDNA

(57) 【要約】

本発明は、前立腺組織に対して高い特異性を示す発現パターンを示す、PROST 03と称する新規ヒトポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記ポリペプチドの生成方法、前記ポリペプチドの発現のための発現ベクター及び遺伝子的に構築された宿主細胞に関する。本発明はさらに、研究、診断及び治療用途への前記ポリヌクレオチド及びポリペプチドの使用方法に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 図 2 (配列番号 2) に示されアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド又は生物学的もしくは免疫学的に活性なそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド、；及び  
(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチド；  
から成る群から選択されたメンバーに対して少なくとも 70% 同一であるポリヌクレオチドを含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 2】

前記ポリヌクレオチドが DNA である請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが RNA である請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドがゲノム DNA である請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドが、図 2 (配列番号 2) に示されるようなアミノ酸 1 ~ アミノ酸 53 を含んで成るポリペプチドをコードする請求項 2 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドが、図 1 (配列番号 1) に示されるようなヌクレオチド 1 ~ ヌクレオチド 3320 の配列を含んで成る請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 7】

前記ポリヌクレオチドが、図 1 (配列番号 1) に示されるようなヌクレオチド 282 ~ ヌクレオチド 1943 の配列を含んで成る請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 8】

請求項 2 記載のポリヌクレオチドを含んで成るベクター。

## 【請求項 9】

請求項 8 記載のベクターを含んで成る宿主細胞。

## 【請求項 10】

請求項 9 記載の宿主細胞から、前記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現することを含んで成る、ポリペプチドを生成するための方法。

## 【請求項 11】

前記ポリペプチドが、図 2 (配列番号 2) に示されるようなアミノ酸 1 ~ アミノ酸 553 を含んで成る請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 12】

図 2 (配列番号 2) に示されるアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドを生成するための方法であって、

(a) 請求項 9 記載の宿主細胞を、ポリペプチドが発現される条件下で培養し；そして  
(b) 前記培養物からポリペプチドを回収する；  
段階を含んで成る方法。

## 【請求項 13】

ポリペプチドを発現する細胞の生成方法であって、請求項 8 記載のベクターにより前記細胞を遺伝子的に構築することを含んで成る方法。

## 【請求項 14】

(a) 図 2 (配列番号 2) に示されるようなアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、又は生物学的もしくは免疫学的に活性なそのフラグメント；及び  
(b) 上記 (a) のポリペプチドに対して少なくとも 70% 同一であるポリペプチド；  
から成る群から選択されたメンバーを含んで成るポリペプチド。

## 【請求項 15】

前記ポリペプチドが、図 2 (配列番号 2) に示されるようなアミノ酸 1 ~ アミノ酸 553 を含んで成る請求項 14 記載のポリペプチド。

## 【請求項 16】

10

20

30

40

50

( a ) 図 2 ( 配列番号 2 ) に示されるようなアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、又は生物学的もしくは免疫学的に活性なそのフラグメント；

( b ) 図 2 ( 配列番号 2 3 ) に示されるようなアミノ酸 1 8 1 ~ アミノ酸 1 9 7 を含んで成るポリペプチド；

( c ) 図 2 ( 配列番号 2 6 ) に示されるようなアミノ酸 2 2 5 ~ アミノ酸 2 4 0 を含んで成るポリペプチド；

( d ) 図 2 ( 配列番号 2 5 ) に示されるようなアミノ酸 2 9 4 ~ アミノ酸 3 2 2 を含んで成るポリペプチド；

( e ) 図 2 ( 配列番号 2 1 ) に示されるようなアミノ酸 4 0 6 ~ アミノ酸 4 3 1 を含んで成るポリペプチド；

( f ) 図 2 ( 配列番号 2 4 ) に示されるようなアミノ酸 5 4 4 ~ アミノ酸 5 5 3 を含んで成るポリペプチド；及び

( g ) 上記 ( a )、( b )、( c )、( d )、( e ) 又は ( f ) のポリペプチドに対して少なくとも 7 0 % 同一であるポリペプチド；

から成る群から選択されたメンバーを含んで成るポリペプチドに対して特異的に結合する単離された抗体又は抗体フラグメント。

10

【請求項 1 7】

前記抗体が、アミノ酸配列 I D W D T S A L A P Y L G T Q E E ( 配列番号 2 3 ) に対して特異的に結合する請求項 1 6 記載の抗体。

【請求項 1 8】

前記抗体が、アミノ酸配列 P T E P A E G L S A P S P L S P H ( 配列番号 2 6 ) に対して特異的に結合する請求項 1 6 記載の抗体。

20

【請求項 1 9】

前記抗体が、アミノ酸配列 D F V G E G L Y Q G V P R A E G T E A R R H Y D E G V R ( 配列番号 2 5 ) に対して特異的に結合する請求項 1 6 記載の抗体。

【請求項 2 0】

前記抗体が、アミノ酸配列 E K Q V F L P K Y R G D T G G A S S E D S L M T S F ( 配列番号 2 1 ) に対して特異的に結合する請求項 1 6 記載の抗体。

【請求項 2 1】

前記抗体が、アミノ酸配列 D K S D L A K Y S A ( 配列番号 2 4 ) に対して特異的に結合する請求項 1 6 記載の抗体。

30

【請求項 2 2】

前記抗体が、ポリクローナル抗体である請求項 1 6 記載の抗体。

【請求項 2 3】

前記抗体が、モノクローナル抗体である請求項 1 6 記載の抗体。

【請求項 2 4】

( a ) 図 2 ( 配列番号 2 ) に示されるようなアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、又は生物学的もしくは免疫学的に活性なそのフラグメント；

( b ) 図 2 ( 配列番号 2 3 ) に示されるようなアミノ酸 1 8 1 ~ アミノ酸 1 9 7 を含んで成るポリペプチド；

( c ) 図 2 ( 配列番号 2 6 ) に示されるようなアミノ酸 2 2 5 ~ アミノ酸 2 4 0 を含んで成るポリペプチド；

( d ) 図 2 ( 配列番号 2 5 ) に示されるようなアミノ酸 2 9 4 ~ アミノ酸 3 2 2 を含んで成るポリペプチド；

( e ) 図 2 ( 配列番号 2 1 ) に示されるようなアミノ酸 4 0 6 ~ アミノ酸 4 3 1 を含んで成るポリペプチド；

( f ) 図 2 ( 配列番号 2 4 ) に示されるようなアミノ酸 5 4 4 ~ アミノ酸 5 5 3 を含んで成るポリペプチド；及び

( g ) 上記 ( a )、( b )、( c )、( d )、( e ) 又は ( f ) のポリペプチドに対して少なくとも 7 0 % 同一であるポリペプチド；

40

50

から成る群から選択されたメンバーを含んで成る、治療剤に接合されるポリペプチドに対して特異的に結合する単離された抗体又は抗体フラグメントを含んで成る免疫接合体。

【請求項 25】

前記治療剤が細胞毒性剤である請求項 24 記載の免疫接合体。

【請求項 26】

前記細胞毒性剤が、リシン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラシチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン D、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素 (PE) A、PE 40、アブリン、グルココルチコイド及び放射性同位体から成る群から選択される請求項 25 記載の免疫接合体。

10

【請求項 27】

前記抗体フラグメントが、Fv、F(ab')<sub>1</sub>及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントから成る群から選択される請求項 24 記載の免疫接合体。

【請求項 28】

図 2 (配列番号 2) のポリペプチドを発現する細胞を選択的に破壊するための方法であって、請求項 24 記載の免疫接合体と前記細胞とを、前記免疫接合体の治療剤が前記細胞を破壊できるよう反応せしめることを含んで成る方法。

【請求項 29】

ヒト患者における、PROST 03 の発現に関連する疾病状態の処理方法であって、治療的有効量の請求項 24 記載の免疫接合体を前記患者に投与すること含んで成る方法。

20

【請求項 30】

(a) 図 2 (配列番号 2) に示されるようなアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、又は生物学的もしくは免疫学的に活性なそのフラグメント；及び

(b) 上記 (a) のポリペプチドに対して少なくとも 70% 同一であるポリペプチド；から成る群から選択されたメンバーを含んで成る、低められたレベルのポリペプチドを必要とする患者における、PROST 03 の不適切な発現に関連する疾病状態の処理方法であって、前記ポリペプチドをコードする RNA を特異的に分解する、治療的有効量のリボザイムを、前記患者に投与すること含んで成る方法。

【請求項 31】

図 2 (配列番号 2) に示されるようなアミノ酸配列を有する、低められたレベルのポリペプチドを必要とする患者における、PROST 03 の不適切な発現に関連する疾病状態の処理方法であって、前記ポリペプチド又はその一部をコードするポリヌクレオチドに対して相補的である、治療的有効量のポリヌクレオチドを、前記患者に投与すること含んで成る方法。

30

【請求項 32】

(a) 図 2 (配列番号 2) に示されるようなアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、又は生物学的もしくは免疫学的に活性なそのフラグメント；

(b) 図 2 (配列番号 23) に示されるようなアミノ酸 181 ~ アミノ酸 197 を含んで成るポリペプチド；

(c) 図 2 (配列番号 26) に示されるようなアミノ酸 225 ~ アミノ酸 240 を含んで成るポリペプチド；

40

(d) 図 2 (配列番号 25) に示されるようなアミノ酸 294 ~ アミノ酸 322 を含んで成るポリペプチド；

(e) 図 2 (配列番号 21) に示されるようなアミノ酸 406 ~ アミノ酸 431 を含んで成るポリペプチド；

(f) 図 2 (配列番号 24) に示されるようなアミノ酸 544 ~ アミノ酸 553 を含んで成るポリペプチド；及び

(g) 上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) のポリペプチドに対して少なくとも 70% 同一であるポリペプチド；

から成る群から選択されたメンバーを含んで成るポリペプチドの存在について、宿主に由

50

来するサンプルを分析することを含んで成る診断方法。

【請求項 3 3】

前記分析が、前記ポリペプチドに対して特異的に結合する請求項 1 6 記載の抗体又は抗体フラグメントと前記サンプルとを接触せしめ、そして前記サンプルにおけるポリペプチドへの抗体の結合を検出することを含んで成る請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

( a ) 図 2 ( 配列番号 2 ) に示されアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド又は生物学的又は免疫学的活性のそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド、 ; 及び  
( b ) 上記 ( a ) のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチド ;  
から成る群から選択されたメンバーに対して少なくとも 7 0 % 同一であるポリヌクレオチドを含んで成るポリヌクレオチドの存在について分析することを含んで成る診断方法。

10

【請求項 3 5】

患者における、図 2 ( 配列番号 2 ) のポリペプチドに関連する転移を診断するための方法であって、

( a ) 前記患者から組織及び / 又は流体サンプルを得 ;  
( b ) 前記サンプルと、請求項 1 6 記載の抗体とを接触し ; そして  
( c ) 前記サンプルにおけるポリペプチドと抗体との結合を検出することを含んで成る方法。

【請求項 3 6】

前記抗体が、検出できるシグナルを直接的に又は間接的に生成するために、放射性ラベル、酵素、発色団及び蛍光剤から成る群から選択された化合物によりラベルされる請求項 3 5 記載の方法。

20

【請求項 3 7】

P R O S T 0 3 発現に関連する前立腺癌に対するヒトにおける免疫応答を誘発するために有効な量の、生理学的に許容できる非毒性ピークルに分散される、図 2 ( 配列番号 2 ) に示されるようなアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、又は生物学的もしくは免疫学的に活性的なフラグメントを含んで成るワクチン。

【請求項 3 8】

図 2 ( 配列番号 2 ) に示されるようなアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、又は生物学的又は免疫学的に活性的なフラグメントをコードする D N A 配列を含んで成るワクチンであって、前記 D N A は、P R O S T 0 3 発現に関連する前立腺癌に対してヒトを免疫化するのに有効な免疫原量の前記ポリペプチド又はフラグメントを生成するために、プロモーターに操作可能的に連結され、そして哺乳類の組織へのインビボ投与に続いて、前記 D N A の細胞中への十分な摂取が生じ、そして前記ポリペプチド又はフラグメントの十分な発現が生じることを特徴とするワクチン。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野 :

本発明は、新しく同定されたポリヌクレオチド及びポリペプチド ; 前記ポリヌクレオチド及びポリペプチドの変異体及び誘導體 ; 前記ポリヌクレオチド及びポリペプチド、及びそれらの変異体及び誘導體の製造方法 ; 前記ポリペプチドに対して向けられた抗体、それらの変異体及び誘導體 ; 及び前記ポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体及び抗体の使用に関する。特に、それらの及び他に関して、本発明は、前立腺組織に対して高い特異性を示す新規ヒト P R O S T 0 3 ポリペプチド、それらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、それらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、それらのポリペプチドに対して向けられた抗体、及び P R O S T 0 3 の発現を阻止するアンチセンスポリヌクレオチドに関する。

40

【0002】

発明の背景 :

前立腺癌は、それが 4 5 歳以上の男性の約 1 / 3 に見出されることにおいて、男性におい

50

て頻繁に発生する疾病である。遺伝的及び環境的原因の証拠が存在し、そしてそれらの主要原因はたぶん前記要因の組み合わせの結果である。家族性癌の研究は、遺伝的素因がすべての前立腺癌の約5～10%、及び55歳以下の若い男性の約45%において役割を演じることを示唆している。

#### 【0003】

前立腺癌は多段階疾病として進行する証拠が存在し、そして前駆体疾病の1つは、前立腺上皮内新形成(PIN)である。疾病の初期段階はアンドロゲン依存性であり、そして後期段階はホルモンには無関係である。良性前立腺過形成として知られている前立腺の増殖性疾患はしばしば、臨床的に検出されるが、しかしたぶん、癌の進行における段階ではない。しかしながら、それはしばしば、前立腺癌に関連している。前立腺における癌はしばしば、多病巣性であり、一般的にゆっくりと増殖し、そして異種性である。後期段階の癌はしばしば、リンパ節及び骨に転移する。

10

#### 【0004】

前立腺癌は通常、物理的試験により及び前立腺特異的抗原(PSA)の血清レベルにより診断される。基本的な前立腺切除は、局在化する疾病のための選択的処理である。進行した転移性疾病は現在、精巣切除又はGnRH(ゴナドトロピン放出ホルモン)による処理により誘発されるアンドロゲン変性により、及び抗-アンドロゲン治療により処理される。しかしながら、進行した疾病はほとんど一定して、ホルモン耐性になり、そして進行性疾病のための治療が必要に成る。さらに、基本的な前立腺切除及びアンドロゲン変性治療の両者に関連する重度の副作用が存在する。それらは、基本的前立腺切除に関連する失禁及びインポテンス、及びアンドロゲン変性治療に関連する骨破損及びオステオポロシスの高い危険性を包含する。

20

#### 【0005】

従って、初期及び後期段階の前立腺癌の両者のための新規治療アプローチの相当の必要性が存在する。これは、処理に有意に影響を及ぼすので、新規診断剤、特に疾病の段階を識別できる剤についての有意な必要性が存在する。例えば、疾病が前立腺以上に進行し、そしてリンパ節に移転する場合、基本的な前立腺切除は、それが進行に対して効果を有さず、しかも所望しない有意な副作用を有するので、保証されない。インビボでの転移を検出するいずれかの剤が相当の価値を有するのであろう。それらの発現パターンにおいて、前立腺組織に対して特異性を示すタンパク質は、転移検出及び治療剤のために有用であるべきである。

30

#### 【0006】

特定タンパク質の発現の変化が、前立腺癌、例えば後期段階の前立腺癌における異常p53発現、低められたレベルのTGF-受容体、低められたレベルのE-カドヘン、C-CAM(細胞付着分子)及びいくつかのインテグリンにおいて示されて来た。腫瘍遺伝子bcl-2の発現は、後期段階アンドロゲン依存性腫瘍において著しく高められ、そして高められたレベルでbcl-2を発現する患者についての予後は比較的不良である。前で言及された遺伝子発現における変化は十分に記録されているが、疾病の原因であることが示されている発現の変化は同定されていない。従って、発現は、前立腺癌の診断及び治療のための分子標的物として作用するので、それらの発現が前立腺腫瘍の存在又は進行に連

40

#### 【0007】

輸送システムは、必須栄養物及びイオンの摂取、代謝の最終生成物の排泄、及び細胞と環境との間の連絡を可能にする(Mitchell, Adv. Enzymol. 29: 33-87, 1963)。一次活性輸送体は、ATP加水分解、光吸収、電子流、基質脱カルボキシル化又はメチルトランスファーを用いることによって、種々の物質の溶質蓄積又は押出しを可能にする(Mitchell, Fed. Proc. 26: 1370-1379, 1967)。100以上のファミリーの輸送体が分類されており、それらのうち2種は、生存生物のすべての分類において偏在的に存在する。

#### 【0008】

50

それらの1種、すなわち主要促進体スーパーファミリー(MFS)は、種々の物質の共輸送、対向輸送又は単輸送に關与する膜輸送タンパク質から成る(Griffithなど、*Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 684-685, 1992; Margerなど、*Trends Biochem. Sci.* 18: 13-21)。MFS内で、明確なファミリーの膜輸送タンパク質がお互い漸進的に關連している(Henderson, *Bioenerg. Biomembr.* 22: 525-569, 1990)。MFSメンバーは現在、300のFSFタンパク質を表す17(18)の明確なファミリーに分類される。前記タンパク質は、糖摂取、耐薬物性、クレブス回路中間体の摂取、リン酸エステル/リン酸対向輸送、及びオリゴ糖摂取に關与している(Hendersonなど、*Philos. Trans. Royal Soc. London Ser. B* 326: 391-410, 1990)。

#### 【0009】

第二構造レベルで、水治療法の考慮は、3種を除いて、前記ファミリーはすべて、12のトランスメンブラン-スパナ-(TMS)タンパク質トポロジーにより特徴づけられることを示唆している。3種のファミリーにおいて、2種の追加のトランスメンブラン-スパナーが見出されている(Paulsenなど、*Microbio. Rev.* 60: 575-608, 1996)。トランスメンブラン-スパナーは、 $\alpha$ -ヘリカルコンホメーションで形質膜を横切ることが提案されている(Goswitz and Brooker, *Protein Science* 4: 534-537, 1995)。

#### 【0010】

TMS2とTMS3との間の十分に保存されたMFS特異的モチーフ、及びTMS8とTMS9との間の關連するが、しかし十分には保存されていないモチーフは、實質的にすべてのMFSファミリーメンバーの特性を示し、そして機能的に有意なものであると思われる(Paoなど、*Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62(1): 1-34, 1998)。MFS輸送体のC-末端領域は主に、MFS内のタンパク質の基質特異性の決定に關与し、そしてそのN-末端領域は主に輸送の促進に關与することが仮定されている(Griffithなど、*Curr. Opin. Cell Biol.*, 4: 684-695, 1992; Rouchなど、*Mol. Microbiol.*, 4: 2051-2062, 1990)。ファミリー特異的モチーフは、MFSのメンバー内に同定されており、これは、新しく同定されたMFSタンパク質を、それらの適切なファミリーグループに配置するための手段を提供する(Paulsenなど、*Gene* 124: 1-11, 1993)。

#### 【0011】

糖輸送体(SP)ファミリーは、細菌、始原細菌、真核原生生物、菌類、動物及び植物に由来する133種の配列決定されたメンバーから成る最大のMFSファミリーを示す。タンパク質は12のTMSを有し、そして配列及び機能においては非常に多様である。生理学的条件下で、それらは単輸送又は $H^+$ 共輸送により機能する。共輸送体は中心部に向けられた極性を有する、促進された細胞において機能する。

#### 【0012】

糖輸送体ファミリーのメンバーは、基質が膜の両側上で存在する場合、溶質:溶質対向輸送を触媒することができることを示されている。糖輸送体ファミリーの基質は、細菌においてグルコース、植物においてヘキソース、及び動物において有機カチオン及び神経伝達物質を包含する。タンパク質は、404-818個のアミノ酸残基のサイズ範囲を示す。真核タンパク質の親水性領域は、調節又は細胞骨格結合において役割を演じることができ、そしてそれらはATP-依存性タンパク質キナーゼによるリン酸化を時おり受けやすい。

#### 【0013】

糖輸送体ファミリーのタンパク質はしばしば、薬物輸送に關与し、そしてそれらのタンパク質における変化は薬物耐性の出現において役割を演じることができ(Lewis, *Trends Biochem. Sci.* 19: 119-123, 1994)。高め

られたレベルの輸送タンパク質は、効果の低い化学治療をもたらす、蓄積された薬物の急速な輸送を導くことが可能である。そのようなタンパク質のレベルの低下、又はその活性の低下は、細胞内での効果的な治療薬物の維持において重要であることがわかっている。

【0014】

それらのデータは、輸送体タンパク質が癌の診断及び治療介入への使用のための良好な候補体であり得ることを示唆する。新規PROST 03ポリペプチドは、膜輸送タンパク質の糖輸送体ファミリーに対する類似性を示し、そして従って、癌のための治療及び診断有用性を有する。

【0015】

発明の要約：

本発明は、PROST 03として本明細書において称する新規タンパク質をユニークにコードするポリヌクレオチド配列を提供する。PROST 03ポリペプチドは、腫瘍性及び正常な前立腺組織において、及び骨及びリンパ節に転移する前立腺癌において選択的に発現される。さらに、PROST 03ポリペプチドは、それが細胞表面タンパク質であることを示唆する、スクロース/ $H^+$ 共輸送体タンパク質、すなわちDcSUT2 (Genbank o65803.sp., plant)に対する類似性を示す。それは、膜輸送タンパク質のMFSファミリーのメンバーに共有するトランスメンブラン-スパナータンパク質トポロジーを包含する。

【0016】

PROST 03として本明細書において称し、そして本明細書において、図1(配列番号)に記載されるポリヌクレオチド配列は、図2(配列番号2)に示される、PROST 03のためのアミノ酸配列をコードする。PROST 03の発現の前立腺-特異的性質及びその細胞表面位置は、PROST 03が転移性前立腺癌を検出するための診断剤のための新規標的物を提供し、そしてPROST 03ポリペプチドで指図される抗体に連結される治療剤の使用を通しての治療介入性のための可能性ある標的物を提供する。

【0017】

中でも、前立腺組織において選択的に発現される新規タンパク質として同定されたポリペプチドを供給することが本発明の目的である。ポリペプチドはまた、図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列及びもう1つの糖輸送体タンパク質、DcSUT2の既知のアミノ酸配列の比較により示されるように、膜輸送タンパク質の糖輸送体ファミリーに対する類似性を有すると思われる。

さらに、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特にPROST 03として本明細書において命名されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することが本発明のもう1つの目的である。

【0018】

本発明のこの観点によれば、PROST 03をコードする単離されたポリヌクレオチド、例えばmRNA, cDNA, 及び、本明細書の観点のさらなる態様においては、生物学的、診断的に、臨床学的に又は治療的に有用なその変異体、類似体、又は誘導体、又はそのフラグメント、例えば前記変異体、類似体及び誘導体のフラグメントが提供される。

本発明のこの観点の特に好ましい態様においては、PROST 03として本明細書において命名されたポリペプチドの変異体をコードするポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子変異体が存在する。

【0019】

本発明のこの観点によれば、PROST 03として本明細書において言及されるヒト起源の新規ポリペプチド、及び生物学的、診断的又は治療的に有用なそのフラグメント、変異体及び誘導体、前記フラグメントの変異体及び誘導体、及び前記のもの類似体が提供される。

本発明のこの観点の特に好ましい態様においては、PROST 03ポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子変異体にコードされるPROST 03の変異体が提供され

10

20

30

40

50

る。

【0020】

前述のポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、変異体及び誘導体、前記変異体及び誘導体のフラグメント、及び前述のものの類似体の生成方法を提供することが、本発明のもう1つの目的である。本発明のこの観点の好ましい態様においては、前記PROST 03ポリペプチドを生成する方法が提供され、ここで前記方法は、外因性由来のPROST 03コードのポリヌクレオチドを、そこに発現可能的に組み込んでいる宿主細胞を、ヒトPROST 03の宿主において発現のための条件下で培養することを含んで成る。

【0021】

本発明のもう1つの目的によれば、前記ポリペプチド及びポリヌクレオチドを、中でも研究、生物学、臨床学及び治療目的のために使用する、生成物、組成物及び方法が提供される。

10

本発明のこの観点の好ましい態様によれば、PROST 03ポリペプチド又はPROST 03コードのmRNAを決定することにより細胞におけるPROST 03の発現を評価し、そしてprost 03を含むゲノム配列における遺伝子変動及び異常性、例えば欠損及び突然変異をアッセイするための生成物、組成物及び方法が提供される。

【0022】

本発明のこの及び他の観点の好ましい態様によれば、prost 03ポリヌクレオチド配列に対してハイブリダイズするプローブが提供される。

PROST 03ポリペプチド又はそのフラグメントに対して高い選択性であり、そして前立腺癌に関連する、PROST 03発現の診断及び/又は検出のための方法に使用され得る抗体を提供することが本発明のさらなる目的である。本発明のこの観点の好ましい態様によれば、抗体は、検出できるシグナルを生成するような手段でラベルされる。放射性ラベル、酵素、発色団及び蛍光剤によりラベルされた抗体が特に好ましい。

20

【0023】

本発明のさらなる観点においては、インビトロ細胞、エクスピボ細胞及び細胞又は多細胞生物への投与のための治療剤に接合される抗体が提供される。これに関しては、細胞毒性である治療剤が特に好ましい。これに関する好ましい態様においては、PROST 03活性又は発現により特徴づけられる疾病状態、例えば前立腺癌の処理のためにヒト患者にそのような接合された抗体が投与される。

30

内在化される(internalized)治療用抗体を供給することが本発明のさらなる観点である。

【0024】

本発明のさらなる観点においては、免疫応答を刺激するために使用され得るペプチド及び抗-イジオタイプ抗体が提供される。

本発明のさらなる観点においては、細胞インビトロ、細胞エクスピボ及び細胞インピボ又は多細胞生物への投与のためのprost 03ポリヌクレオチド(すなわち、アンチセンスポリヌクレオチド)に対して相補的なりボザイム及びポリヌクレオチドが提供される。これに関して、疾病状態、例えば前立腺癌又は良性前立腺過形成の処理のためへのヒト患者へのアンチセンス分子の投与が特に好ましい。

40

【0025】

本発明の他の目的、特徴、利点及び観点は、次の記載から当業者に明らかになるであろう。しかしながら、本発明の好ましい態様を示す次の記載及び特定の例は、例示目的のためにのみ与えられることが利用されるべきである。開示される本発明の範囲内での種々の変更及び修飾は、次の記載及び開示される本発明の他の部分から当業者に容易に明らかになるであろう。

【0026】

本発明の特定の記載：

定義：

本明細書、例及び請求項において使用される場合、特にことわらない限り、次の用語は、

50

示される意味を有する。

“ P R O S T 0 3 ” は、図 2 ( 配列番号 2 ) に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変異体、類似体、誘導体及びフラグメント、及び前記変異体、類似体及び誘導体のフラグメントを言及する。用語“ フラグメント ”、及び“ 類似体 ”とは、図 2 ( 配列番号 2 ) のポリペプチドを言及する場合、図 2 ( 配列番号 2 ) のポリペプチドと実質的に同じ生物学的及び / 又は免疫学的活性を保存するポリペプチドを意味する。

【 0 0 2 7 】

“ p r o s t T 0 3 ” とは、図 1 ( 配列番号 1 ) に示される配列を有するポリヌクレオチド、及び図 2 ( 配列番号 2 ) に示される P R O S T 0 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ; 及び P R O S T 0 3 変異体、類似体、誘導体及びフラグメント、及び前記変異体、類似体及び誘導体のフラグメントをコードするポリヌクレオチドを言及する。P R O S T 0 3 はまた、R N A から構成されるそのようなポリヌクレオチド、及び図 2 ( 配列番号 2 ) に示されるポリペプチド配列コードするポリヌクレオチドの補体であるポリヌクレオチドも言及する。

10

【 0 0 2 8 】

“ ポリヌクレオチド ” とは一般的に、修飾されていない R N A 又は D N A、又は修飾された R N A 又は D N A であり得るいずれかのポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを言及する。従って、例えば、ポリヌクレオチドとは、本明細書において使用される場合、中でも、一本鎖及び二本鎖 D N A、一本鎖及び二本鎖領域の混合物である D N A、一本鎖及び二本鎖 R N A、及び一本鎖及び二本鎖領域の混合物である R N A ; 一本鎖又はより典型的には、二本鎖、又は一本鎖及び二本鎖領域の混合物であり得る D N A 及び R N A を含んで成るハイブリッド分子を言及する。

20

【 0 0 2 9 】

さらに、ポリヌクレオチドは、本明細書において使用される場合、R N A 又は D N A、又は R N A 及び D N A の両者を含んで成る三本鎖領域を言及する。そのような領域における鎖は、同じ分子又は異なった分子からであり得る。前記領域は 1 又は複数のすべての分子を包含するが、しかしより典型的には、前記分子のいくらかの領域のみを包含する。三本鎖ヘリックスの分子の 1 つはしばしば、オリゴヌクレオチドである。

【 0 0 3 0 】

本明細書において使用される場合、用語“ ポリヌクレオチド ” は、1 又は複数の修飾された塩基を含む、上記のような D N A 又は R N A を包含する。従って、安定性又は他の理由のために修飾された主鎖を有する D N A 又は R N A は、本明細書において意図されるような“ ポリヌクレオチド ” である。さらに、通常でない塩基、例えばイノシン、又は修飾された塩基、例えばトリチウム - ラベルされた塩基を含んで成る D N A 又は R N A は、本明細書において使用される場合、ポリヌクレオチドである。

30

【 0 0 3 1 】

非常に多くの修飾が、当業者に知られている多くの有用な目的を満たす D N A 及び R N A に行われて来たことが理解されるであろう。用語“ ポリヌクレオチド ” は、本明細書において使用される場合、そのような化学的、酵素的又は代謝的に修飾された形のポリヌクレオチド、及びウイルス及び細胞、例えば単純及び複雑な細胞の特徴を有する、化学的形の D N A 及び R N A を包含する。

40

【 0 0 3 2 】

“ ポリペプチド ” は、本明細書において使用される場合、下記に記載されるようなすべてのポリペプチドを包含する。ポリペプチドの基本的構造は良く知られており、そして当業界における無数のテキストブック及び他の出版物に記載されている。このような関係においては、前記用語は、ペプチド結合により直鎖においてお互い結合される複数のアミノ酸を含んで成るいずれかのペプチド又はタンパク質を言及する。本明細書において使用される場合、前記用語は、また通常、ペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとして当業界において言及される短鎖、及び多くのタイプが存在するタンパク質として当業界において一般的に言及される長鎖の両者を言及する。

50

## 【0033】

ポリペプチドはしばしば、20個の天然に存在するアミノ酸として通常言及される20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含み、そして末端アミノ酸を包含する多くのアミノ酸が、天然の工程、例えばグリコシル化及び他の後翻訳修飾により、又は当業界において良く知られている化学的修飾技法のいずれかにより、所定のポリペプチドにおいて修飾され得ることが理解されるであろう。ポリペプチドにおいて天然に存在する通常の修飾でさえ、本明細書において徹底的に列挙するには多過ぎるが、しかしそれは基本的なテキスト及びより詳細なモノグラフ、及び多数の研究文献において良く記載されており、そしてそれらは当業者に良く知られている。

## 【0034】

本発明のポリペプチドに存在することができる既知の修飾は次のものを包含する：アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、  
-カルボキシル化、グリケーション、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質加水分解工程、リン酸化、プレニル化、セラミ化、セレン酸化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA介在性付加、例えばアルキン化、及びユビキチン化。

## 【0035】

そのような修飾は、当業者に良く知られており、そして化学文献において、より詳細に記載されている。いくつかの特に共通する修飾、すなわちグリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基の -カルボキシル化、ヒドロキシル化及びADP-リボシル化が、ほとんどの基本的テキスト、例えばI. E. Creighton, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2<sup>nd</sup> Ed., W. H. Freeman and Company New York, 1993に記載されている。これに関する多くの詳細な再考は、次の文献により供給されるそれらのもので入手できる：Wala, F. *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12, 1983; Seifter など., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990及びRattanなど., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663: 48-62, 1992。

## 【0036】

ポリペプチドは必ずしも完全には直線ではないことは、良く知られているように及び上記に示されるように、理解されるであろう。例えば、ポリペプチドはユビキチル化の結果として枝分かれされ得、そしてそれらは、後翻訳現象、例えば天然のプロセッシング現象及び天然において存在しないヒト操作によりもたらされる現象の結果として、枝分かれを有するか又はそれを有さない環状であり得る。環状、枝分かれ及び枝分かれ環状ポリペプチドは、非翻訳性の天然の方法及び完全に合成の方法により合成され得る。

## 【0037】

修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖及びアミノ又はカルボキシル末端を包含するポリペプチドにおけるいずれかの位置で存在することができる。実際、共有修飾によるポリペプチドにおけるアミノ又はカルボキシル基、又は両者の遮断は、天然に存在するポリペプチド及び合成のポリペプチドにおいて共通し、そしてそのような修飾は、本発明のポリペプチドにおいても存在することができる。例えば、タンパク質分解工程の前、E. コリにおいて製造されるポリペプチドのアミノ末端残基は、ほとんど変わりなく、N-ホルミルメチオニンであろう。

## 【0038】

10

20

30

40

50

ポリペプチドにおいて存在する修飾はしばしば、それがいかにして製造されるかの機能であろう。例えば、宿主におけるクローン化された遺伝子の発現により製造されるポリペプチドに関しては、修飾の性質及び程度は大部分、ポリペプチドアミノ酸配列に存在する宿主細胞の後翻訳修飾能力及び修飾シグナルにより決定されるであろう。例えば、良く知られているように、グリコシル化はしばしば、細菌宿主、例えば、E. コリにおいては存在しない。従って、グリコシル化が所望される場合、ポリペプチドは、グリコシル化宿主、一般的に真核細胞において発現されるべきである。昆虫細胞はしばしば、哺乳類細胞と同じ後翻訳グリコシル化を行い、そしてこの理由のために、昆虫細胞発現システムは、中でも、グリコシル化の生来のパターンを有する哺乳類タンパク質を効果的に発現するよう環発されて来た。類似する考えが、他の修飾に適用される。

10

**【0039】**

同じタイプの修飾が、所定のポリペプチドにおけるいくつかの部位で同じか又は種々の程度、存在することができることが理解されるであろう。また、所定のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を有することができる。

一般的に、本明細書において使用される場合、用語、ポリペプチドは、すべてのその修飾、特に宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現することによって合成されるポリペプチドに存在するそれらの修飾を包含する。

**【0040】**

“ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド”は、本明細書において使用される場合、本発明のポリペプチド、特に図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列を有するPROST 03ポリペプチドをコードする配列を包含する。前記用語は、追加の領域と共に、前記ポリペプチドをコードする単一の連続領域又は不連続領域(例えば、イントロンにより中断される)を包含するポリヌクレオチドを包含する。

20

**【0041】**

“生物学的”とは、天然に存在するPRUST 07ポリペプチドの構造的、調節的又は生化学的機能を言及する。

“免疫的活性”とは、適切な動物又は細胞において特定の免疫応答を誘発し、そして特定の抗体と結合する、天然、組換え又は合成PROST 03、又はそのいずれかのフラグメントの能力を言及する。

**【0042】**

“オリゴヌクレオチド”とは、比較的短いポリヌクレオチドを言及する。しばしば、その用語は、一本鎖デオキシリボヌクレオチドを言及するが、しかしそれは中でも一本鎖又は二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド及び二本鎖DNAを言及することができる。オリゴヌクレオチド、例えば一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドはしばしば、化学的方法、例えば自動化されたオリゴヌクレオチド合成機上で実施されるそれらの方法により合成される。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、種々の他の方法、例えばインビトロ組換えDNA-介在性技法、及び細胞及び生物におけるDNAの発現により製造され得る。“オリゴヌクレオチド”又は“オリゴマー”、又はオリゴヌクレオチド“フラグメント”、“部分”又は“セグメント”とは、少なくとも約10個のヌクレオチド、及び約60個ほどのヌクレオチド、好ましくは約15~30個のヌクレオチド、及びより好ましくは約20~25個のヌクレオチド配列を言及する。

30

40

**【0043】**

“天然に存在するPROST 03”とは、遺伝子的に構築されていないヒト細胞により生成されるPROST 03を言及し、そして特に、ポリペプチドの後-翻訳修飾、例えばアセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、アシル化及び分解(但し、それだけには限定されない)からの種々のPROST 03形を企画する。

ポリヌクレオチド又はポリペプチドの“変異体”とは、本明細書において使用される場合、それぞれ、対象のポリヌクレオチド又はポリペプチドとは異なるポリヌクレオチド又はポリペプチドである。この変異体は下記に及び本発明の開示の他の場所において、より詳細に記載される。

50

## 【0044】

(1) もう1つの対照ポリヌクレオチドとはポリヌクレオチド配列において異なるポリヌクレオチド。一般的に、差異は、対照及び変異体のポリヌクレオチド配列が全体的に密接に類似し、そして多くの領域において同一であるよう、制限される。

## 【0045】

下記に示されるように、変異体のポリヌクレオチド配列の変化はサイレントであり得る。すなわち、それらはポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸を変更することはできない。変更がこのタイプのサイレント変化に制限される場合、変異体は、対照と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするであろう。下記に示されるように、変異体のポリヌクレオチド配列の変化は、対照のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更することができる。そのようなポリヌクレオチド変化は、下記で論じられるように、対照の配列によりコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸置換、付加、欠失、融合及び切断をもたらすことができる。

10

## 【0046】

(2) もう1つの対照ポリペプチドとは、アミノ酸配列において異なるポリペプチド。一般的に、差異は、対照及び変異体の配列が全体的に密接に類似し、そして多くの領域において同一であるよう、制限される。変異体及び対照ポリペプチドは、いずれかの組み合わせで存在することができる、1又は複数の置換、欠失、融合及び切断によりアミノ酸配列において異なることができる。それらの同じか又は類似するポリペプチドをコードする組換え変異体は、遺伝子コードにおける“冗長性”の使用により合成され得るか又は選択され得る。種々のコドン置換、例えば種々の制限部位を生成するサイレント変化は、プラスミド又はウィルスベクター中へのクローニング又は特定の原核又は真核システムにおける発現を最適化するために導入され得る。突然変異はまた、ポリペプチドの性質を修飾し、すなわちリガンド結合親和性、鎖間親和性又はポリペプチド分解又はターンオーバー速度を変えるためにも導入され得る。

20

## 【0047】

“対立遺伝子変異体”とは、PROST 03ポリヌクレオチドの他の形を言及する。対立遺伝子は突然変異、すなわちポリヌクレオチド配列の変化に起因し、そして一般的に、構造体又は機能が変更され得るか又は変更され得ない、変更されたmRNA又はポリペプチドを生成する。いずれかの所定の遺伝子は、何も有さないか、1又は多くの対立遺伝子形を有することができる。対立遺伝子を生ぜしめる通常の突然変異変化は一般的に、ヌクレオチドの天然の欠失、付加又は置換に帰する。それらのタイプの変化の個々は、所定の配置において、単独で、又は他と組合して、又は1又は複数回、存在することができる。

30

## 【0048】

“誘導體”とは、化学的修飾、例えばユビキチン化、ラベリング(例えば、放射性核種、種々の酵素的修飾による)、ペグ化(ポリエチレングリコールによる誘導體化)又はヒトタンパク質において通常存在しない、アミノ酸、例えばオルニチンの挿入又は置換(又は例えばアミノ酸をコードするヌクレオチドの置換)により、それぞれ天然に存在するPROST 03又はPROST 03から誘導されるポリヌクレオチド又はポリペプチドを言及する。

40

## 【0049】

“欠失”とは、1又は複数のポリヌクレオチド又はアミノ酸残基がそれぞれ不在であるポリヌクレオチド又はアミノ酸配列における変化として定義される。

“挿入”又は“付加”は、天然に存在するポリヌクレオチド又はアミノ酸配列に比較して、それぞれ、1又は複数のポリヌクレオチド又はアミノ酸残基の付加に起因する、ポリヌクレオチド又はアミノ酸配列の変化である。

“置換”は、それぞれ、異なったポリヌクレオチド又はアミノ酸による1又は複数のポリヌクレオチド又はアミノ酸の置換に起因する。

## 【0050】

好ましくは、アミノ酸置換は、類似する構造的及び/又は化学的性質を有するもう1つの

50

アミノ酸による1つのアミノ酸の置換、例えばイソロイシン又はバリンによるロイシン、グルタミン酸によるアスパラギン又はセリンによるトレオニンの置換、すなわち保存性アミノ酸置換に起因する。挿入又は欠失は典型的には、約1～5個のアミノ酸の範囲にある。その変動は、組換えDNA技法を用いてポリペプチドにおけるアミノ酸の挿入、欠失又は置換を組織的に製造し、そして活性についてその得られる組換え変異体をアッセイすることによって、実験的に決定され得る。

【0051】

“フラグメント”は、前記PROST 03ポリペプチド及びその変異体又は誘導体のアミノ酸配列とすべてではないが、一部と完全に同じであるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

10

ポリペプチド“フラグメント”、“部分”又は“セグメント”は、少なくとも約5個のアミノ酸、しばしば少なくとも約7個のアミノ酸、典型的には少なくとも約9～13個のアミノ酸及び種々の態様においては、少なくとも17個又はそれ以上のアミノ酸の長さのアミノ酸残基である。

【0052】

“組換え体”又は“組換えDNA分子”とは、天然に存在しないか、又は配列の2種の分離されたセグメントの人工的な組み合わせにより製造されるポリヌクレオチド配列を言及する。“組換え的に生成される”とは、化学的合成手段、又はポリヌクレオチドの単離されたセグメントの人工的操作、例えば遺伝子構築技法により達成される人工的組み合わせを意味する。そのような操作は通常、同じか又は保存性アミノ酸をコードする冗長性コドンにより1つのコドンを置換するために行われ、そして典型的には、配列認識部位を導入するか又は除去することによって行われる。

20

【0053】

他方では、それは、通常天然形においては見出されない所望する組み合わせの機能を含んで成る単一の遺伝子存在物を生成するための所望する機能を有するポリヌクレオチドセグメントと共に連結するために行われる。制限酵素認識部位、調節配列、制御配列又は他の有用な特徴が企画により組み込まれ得る。“組換えDNA分子”は、クローニング及び発現ベクターを包含する。“組換え体”はまた、ポリペプチドをコードし、そして組換えDNA技法を用いて調製されるポリヌクレオチドを言及することができる。

【0054】

“単離された”とは、天然の状態から“人の手により”変更されることを意味し、すなわち、それが天然において存在する場合、それは元の環境から変更され又は除去されている。例えば、その天然の状態で生存動物に天然において存在するポリヌクレオチド又はポリペプチドは“単離され”ないが、しかしその天然の状態の同時存在する材料から単離された同じポリヌクレオチド又はポリペプチドは、その用語が本明細書において使用される場合、“単離される”。

30

【0055】

例えば、ポリヌクレオチドに関しては、用語、“単離された”とは、それが天然に存在する染色体及び細胞から分離されることを意味する。ポリヌクレオチド及びポリペプチドは、組成物、例えば細胞中へのポリヌクレオチド又はポリペプチドの導入のための培地配合物又は溶液、天然に存在する組成物ではない、化学又は酵素反応のための組成物又は溶液に存在することができ、そして本明細書において使用されるような用語の意味内に単離されたポリヌクレオチド又はポリペプチドとして存続することができる。

40

【0056】

“実質的に単純な”及び実質的に相同な“とは、交換可能的に使用され、そしてPROST 03ポリペプチド又はそのフラグメント、又はそれをコードするポリヌクレオチドセグメントを記載し、ここでそのようなポリペプチド又はポリヌクレオチドは、天然においてそれに付随する成分から分離される。PROST 03ポリペプチド又はそのフラグメント、又はそれをコードするDNAセグメントは、それがその天然の状態でそれに付随する天然の汚染物から分離される場合、天然において関連する成分を実質的に含まない。

50

## 【0057】

従って、化学的に合成されるか、又はそれが天然において起因する細胞とは異なった細胞システムにおいて合成されるポリペプチドは、その天然において関連する成分を実質的に有さないであろう。同様に、化学的に合成されるか、又はそれが天然において起因する細胞とは異なった細胞システムにおいて合成されるポリヌクレオチドは、その天然において関連する成分を実質的に有さないであろう。

## 【0058】

“相同”とは、ポリヌクレオチドを説明するために使用される場合、2種のポリヌクレオチド又はその企画された配列は、任意に1列配列され、そして比較される場合、少なくとも70%のヌクレオチド、通常、約75~99%及びより好ましくは少なくとも約99%のヌクレオチドにおいて、適切なヌクレオチド挿入又は欠失を伴って、同一であることを示す。

10

“類似性”とは、ポリペプチドを記載するために使用される場合、1つのポリペプチドのアミノ酸及び保存されたアミノ酸置換基を第のポリペプチドの配列に比較することによって決定される。

## 【0059】

“ポリメラーゼ連鎖反応”又は“PCR”とは、DNAの特定の断片が、1987年7月28日に発行されたアメリカ特許第4,683,195号に記載のようにして増幅される方法を言及する。一般的に、オリゴヌクレオチドプライマーが企画され得るよう、興味あるか又はそれ以外のポリペプチドフラグメントの末端からの配列情報が入手できる必要であり；それらのプライマーはお互いの方向に向き、そして増幅されるべき鋳型の反対の鎖に、配列において同一であるか又は類似するであろう。2種のプライマーの5'末端のヌクレオチドは、増幅された材料の末端と同時に存在する。PCRは、全ゲノムDNAからの特定のDNA配列、全細胞RNAから転写されるcDNA、プラスミド配列、等を増幅するために使用され得る（一般的には、Mullisなど、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51, 263, 1987, Erich, ed. PCR Technology, Stackton Press, NY, 1989を参照のこと）。

20

## 【0060】

“緊縮性”は典型的には、約 $T_m$ （溶融温度）-5（プローブの $T_m$ より65低い）~約20-25（ $T_m$ よりも25低い）の範囲で存在する。当業者により理解されるように、緊縮ハイブリダイゼーションは、同一のポリヌクレオチド配列を同定し、又は検出するために、又は類似するか又は関連するポリヌクレオチド配列を同定するか又は検出するために使用され得る。本明細書において使用される場合、用語“緊縮条件”とは、ハイブリダイゼーションが、配列間で少なくとも95%及び好ましくは少なくとも97%の同一性が存在する場合でのみ存在するであろうことを意味する。

30

## 【0061】

“ハイブリダイゼーション”は、本明細書において使用される場合、“ポリヌクレオチド鎖が塩基対合を通して相補的鎖と連結するいずれかの方法”を包含するであろう（Combs, J., Dictionary of Biotechnology, Stackton Press, New York, N.Y., 1994）。

40

## 【0062】

“治療的有效用量”とは、疾病状態の症状又は病状を緩和する、ポリペプチド又はその抗体、アンタゴニスト、又はインヒビター、例えばアンチセンス分子及びリボザイムの量を言及する。そのような化合物の治療効率及び毒性、例えば $ED_{50}$ （集団の50%において治療的に有効な用量）及び $LD_{50}$ （集団の50%を致死をもたらす用量）は、細胞培養物又は実験動物における標準の医薬方法により決定され得る。治療効果と毒性効果との間の用量比は、治療指数であり、そしてそれは比 $ED_{50}/LD_{50}$ として表され得る。“処理する”又は“処理”とは、本明細書において使用される場合、疾病状態が前立腺腫瘍増殖に関連し、そして患者が低められたレベルのPROST 03の必要性を有する疾

50

病状態を包含する、ヒト患者における疾病状態の処理を包含する。

【0063】

発明の特定の記載：

本発明は、中でも、下記により詳細に記載されるような、新規PROST 03ポリペプチド、prost 03ポリヌクレオチド及びPROST 03ポリペプチドに対して向けられた抗体に関する。特に、本発明は、新規PROST 03ポリペプチド及びそれらのPROST 03ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関して、そして特に、図2（配列番号2）に示されるアミノ酸配列を有するPROST 03、及び図1（配列番号1）に示されるポリヌクレオチド配列を有するprost 03に関する。

【0064】

本発明はまた、PROST 03変異体を包含する。好ましいPROST 03変異体は、図2（配列番号2）に示されるポリペプチド配列に対して少なくとも70%の類似性（好ましくは、少なくとも70%の同一性）、及びより好ましくは少なくとも90%の類似性（より好ましくは、少なくとも90%の同一性）、及びさらにより好ましくは少なくとも95%の類似性（さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性）を有する変異体であり、そしてまた、一般的に少なくとも10個のアミノ酸及びより好ましくは少なくとも50個のアミノ酸を含むポリペプチドのそのような部分を有するそのようなポリペプチドの部分も包含する。

10

【0065】

PROST 03ポリペプチドの予測される活性形のためのコード配列は、図1（配列番号1）に示されるヌクレオチド配列の5'末端から282個の塩基対で開始する。PROST 03は、MFSファミリーの膜輸送タンパク質の特性を有する12-13のトランスメンブラン-スパンナー構造ドメインを含む。

20

本発明は、PROST 03とスクロース/H<sup>+</sup>共輸送タンパク質(DcSUT2)との間の図3に示される構造類似性に一部基づかされている。

【0066】

本発明はまた、前立腺組織ライブラリーにおけるその発現及び前立腺腫瘍ライブラリーにおけるその過剰発現により示されるように、そのPROST 03の発現プロフィールの一部に基づかされている。この組織プロフィールは、正常及び腫瘍組織からの組織サンプルにおけるmRNA発現の、PCRに基づくTaqman分析による分析に見られる。この分析方法は、PROST 03をコードするmRNAが、他の組織に比較して、前立腺組織において過剰発現されることを示した。

30

【0067】

ポリヌクレオチド：

本発明の1つの観点によれば、図2（配列番号2）の推定されるアミノ酸配列を有するPROST 03ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0068】

本明細書において提供される情報、例えば図1（配列番号1）に示されるポリヌクレオチド配列を用いて、PROST 03ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドは、標準のクローニング及びスクリーニング方法、例えば出発材料としてヒト組織の細胞からのmRNAを用いてのcDNAのクローニングのためのそれらの方法を用いて得られる。図1（配列番号1）におけるポリヌクレオチド配列は、ヒト前立腺組織から得られるcDNAクローニングに見出された。

40

【0069】

PROST 03は、Incyte's LifeSeqデータベースを調べることによって、前立腺において発現される遺伝子として同定された。ヌクレオチド配列は、前立腺腫瘍関連のESTについて記載データベースを調べることによって同定された。ヌクレオチド配列は、注釈されるデータベースにおける膜輸送分子のカテゴリーに見出された。ライブラリー組みにおけるprost 03ポリヌクレオチド配列の分布の電子ノザン分析は、prost 03 mRNAが前立腺ライブラリーにおいて高いレベルで及び多数の他の

50

組織、例えば正常及び腫瘍組織ライブラリーにおいて低いレベルで発現されることを示した。

【0070】

Incyte LifeSeqデータベースの調査は、実験使用のために前記Incyteから得られた一群のcDNAクローンを生ぜしめた。連続ポリヌクレオチド配列中へのprost 03クローンの電子アセンブリー及び連続配列の編集に続いて、部分コード配列が、予測されるアセンブリーされたポリヌクレオチドにおいて同定された。この例は、コード領域の5'末端を欠失していた。

【0071】

prost 03のための追加の5'配列が、ヒト前立腺cDNAライブラリーからクローン化された。これは、PROST 03のための十分な長さのコード領域を含むことが予測されるIncyteデータベースにおけるクローンの同定を導びいた。前記十分な長さのポリペプチド配列は、FastAプログラムを用いて、SWISS-PROT及びSPTREMBLデータベースを調べるために使用された、この調査の結果は、PROST 03配列が植物において前に同定された輸送体組、特にスクロース/プロトン輸送体組みに対する類似性を示すことを指摘した。特に、類似性は、PROST 03とDcSUT2、すなわちスクロース/H<sup>+</sup>共輸送タンパク質との間に見出された。

10

【0072】

Incyteクローン3362030, 3458076及び3352331を、実験研究のためにIncyteから得た。それらのクローンは十分に配列決定され、そしてすべては、予測されるPROST 03タンパク質についての十分なコード配列を含んだ。クローン3352331の配列は、図1(配列番号1)に示される。

20

本発明のポリヌクレオチドは、RNA、例えばmRNAの形で、又はDNAの形で、例えばクローニングにより得られるか、又は化学的合成技法、又はそれらの組み合わせ、又は本明細書に記載される方法により生成される、cDNA及びゲノムDNAの形で存在することができる。DNAは二本鎖であっても又は一本鎖であっても良い。一本鎖DNAは、またセンス鎖としても知られているコード鎖であり得、又はそれは、アンチセンス鎖としても言及される非コード鎖でもあり得る。

【0073】

前記ポリペプチドをコードする配列は、図1(配列番号1)で示されるポリヌクレオチドのコード配列と同一であり得る。それはまた、遺伝子コードの冗長性(縮重)の結果として、図2(配列番号2)のポリペプチドをコードする、異なった配列を有するポリヌクレオチドでもあり得る。

30

【0074】

図2(配列番号2)のポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドは、次のポリペプチド自体のためのコード配列を包含するが、但しそれらだけには限定されない:前記ポリペプチドのコード配列、及び追加の非コード配列、例えばイントロン及び非コード5'及び3'配列、例えば転写において役割を演じる、転写された非翻訳配列、mRNAプロセッシング(例えばスプライシング及びポリアデニル化シグナル)、又は追加のアミノ酸をコードする追加のコード配列、例えば追加の官能価を提供するそれらの配列と共に、前述の追加のコード配列を有する又は有さないポリペプチドのコード配列。

40

【0075】

従って、例えば、ポリペプチドは、融合されるポリペプチドの精製を促進するマーカー配列、例えばペプチドに融合され得る。本発明のこの観点の好ましい態様においては、マーカー配列は、ヘキサ-ヒスチジンペプチド、例えば、中でもpTrchisBベクター(Invitrogen, Carisbad, CA)に供給される標識(それらの多くは市販されている)である。例えば、Genizなど。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, 1989)に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の便利な精製を提供する。

【0076】

50

ポリヌクレオチドは、前記ポリペプチドである1つのポリペプチド、及び追加のアミノ又はカルボキシル末端アミノ酸、又はポリペプチドの内部ンアミノ酸（活性形が1つよりも多くのポリペプチド鎖を有する場合）をコードすることができる。そのような配列は、中でも前駆体から最終形へのポリペプチドのプロセッシングにおいて役割を演じることができ、ポリペプチドトラフッキングを促進することができ、ポリペプチドの半減期を延長するか又は短縮することができ、又はアッセイ又は生成のためのポリペプチドの操作を促進することができる。一般的に、良くあることであるが、追加のアミノ酸は、細胞酵素によりポリペプチドから除去され得る。

【0077】

本発明はさらに、図2（配列番号2）の推定されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメント、類似体及び誘導体をコードする、上記に記載されたポリヌクレオチドの変異体にも関する。ポリヌクレオチドの変異体は、天然に存在する変異体、例えば天然に存在する対立遺伝子変異体であり得、又はそれは天然において存在することが知られている変異体であり得る。ポリヌクレオチドのそのような天然に存在しない変異体は、突然変異誘発技法、例えばポリヌクレオチド、細胞又は生物に適用されるそれらの技法により製造され得る。

【0078】

これに関する変異体は、ポリヌクレオチド置換、欠失又は付加により前述のポリヌクレオチドとは異なる変異体である。置換、欠失又は付加は、1又は複数のポリヌクレオチドを包含することができる。変異体は、コード又は非コード領域、又は両領域において変更され得る。コード領域の変更は、保存性又は非保存性アミノ酸置換、欠失又は付加を生成することができる。

中でも、これに関しての本発明の特に好ましい態様は、図2（配列番号2）に示されるPROST 03のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、その変異体、類似体、誘導体及びフラグメント、及び前記変異体、類似体及び誘導体のフラグメントである。

【0079】

これに関してのさらに特に好ましいものは、いくつかの、数個、5～10個、1～5個、1～3個、2個、1個のアミノ酸残基がいずれかの組み合わせで置換され、欠失され又は付加されているか、又はいずれかのアミノ酸も置換、欠失又は付加されていない、図2（配列番号2）のPROST 03ポリペプチドのアミノ酸配列を有する、PROST 03変異体、類似体、誘導体及びフラグメント、及び前記フラグメントの変異体、類似体及び誘導体をコードするポリヌクレオチドである。それらの中で特に好ましいものは、PROST 03ポリペプチドの性質及び活性を変更しない、サイレント置換、付加及び欠失である。また、これに関して特に好ましいものは、保存性置換である。最も好ましいものは、置換を伴わないで、図2（配列番号2）のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【0080】

本発明のさらに好ましい態様は、図2（配列番号2）に示されるアミノ酸配列を有するPROST 03ポリペプチドをコードするポリペプチドに対して少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド、及びそのようなポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチドである。他方では、最も好ましいものは、PROST 03ポリペプチドをコードするポリペプチドに対して少なくとも80%同一である領域を含んで成るポリヌクレオチド及びそれに対して相補的であるポリヌクレオチドである。

【0081】

これに関して、少なくとも90%の同一性のポリヌクレオチドが特に好ましくは、そしてそれらの特に好ましいポリヌクレオチドの中で、少なくとも95%の同一性を有するそれらのものが特に好ましい。さらに、少なくとも97%の同一性を有するそれらのものが非常に好ましく、そしてそれらの中で、少なくとも98%及び少なくとも99%の同一性を有するそれらのものが特に非常に好ましく、そして少なくとも99%の同一性のものがよ

り好ましい。

【0082】

この観点における特に好ましい態様は、図1（配列番号1）のポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドと実質的に同じ生物学的活性を保持するポリペプチドを、コードするポリヌクレオチドである。

本発明はさらに、上記配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これに関して、本発明は特に、上記ポリヌクレオチドに対して、緊縮条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。

【0083】

本発明のポリヌクレオチドアッセイに関して、本明細書においてさらに論じられるように、上記で論じられたような本発明のポリヌクレオチドは、PROST 03をコードする十分な長さのcDNA及びゲノムクローンを単離するために、そしてPROST 03遺伝子に対して高い配列類似性を有する他の遺伝子のcDNA及びゲノムクローンを単離するために、cDNA及びゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。そのようなプローブは一般的に、少なくとも15個の塩基を含んで成るであろう。好ましくは、そのようなプローブは、少なくとも30個の塩基を有するであろうし、そして少なくとも50個の塩基を有することができる。

【0084】

例えば、PROST 03遺伝子のコード領域は、既知のDNA配列を用いて企画された合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて、ライブラリーをスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を有するラベルされたオリゴヌクレオチドは、プローブにハイブリダイズするクローンを同定するためにcDNA又はゲノムDNAのライブラリーをスクリーンするために使用され得る。

要するに、本発明のポリヌクレオチドは、ポリペプチド、ポリペプチド及びリーダー配列（プレポリペプチドとして言及され得る）をコードすることができる。

【0085】

本発明はまた、中でも、ポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチドフラグメント、特に緊縮条件下でハイブリダイズするそれらのフラグメントをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチド、及びポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドを増幅するためのポリヌクレオチド、例えばPCRプライマーに関する。それらに関しては、好ましいポリヌクレオチドは、下記で論じられるような、好ましいポリペプチドフラグメントに対応するそれらのポリヌクレオチドである。

【0086】

ポリペプチド：

本発明はさらに、図2（配列番号2）の推定されるアミノ酸配列を有するPROST 03ポリペプチドに関する。

本発明はまた、それらのポリペプチドのフラグメント、類似体及び誘導体に関する。用語、フラグメント、誘導体及び類似体は、図2（配列番号2）のポリペプチドに関する場合、そのようなポリペプチドと実質的に同じ生物学的活性を保持するポリペプチドを意味する。

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然ポリペプチド又は合成ポリペプチドであり得る。好ましい態様においては、それは組換えポリペプチドである。

【0087】

図2（配列番号2）のポリペプチドのフラグメント、誘導体又は類似体は、(i)1又は複数のアミノ酸残基が、保存された又は保存されていないアミノ酸残基（好ましくは、保存されたアミノ酸残基）により置換され、そしてそのような置換されたアミノ酸残基が遺伝子コードによりコードされる残基であっても又はなくても良いもの、又は(ii)1又は複数のアミノ酸残基が置換基を包含するもの、又は(iii)ポリペプチドがもう1つ

10

20

30

40

50

の化合物、例えばポリペプチドの半減期を高めるための化合物（例えば、ポリエチレングリコール）により融合されるもの、又は（iV）追加のアミノ酸がポリペプチド、例えばリーダー又は分泌配列、又はポリペプチドの精製のために使用される配列に融合されるものであり得る。そのようなフラグメント、誘導体及び類似体は、本明細書における技術から当業者の範囲内であると思われる。

【0088】

これに関しての本発明の特に好ましい態様は、図2（配列番号2）に示されるPROST 02のアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変異体、誘導体及びフラグメント、及び前記フラグメントの変異体、類似体及び誘導体である。

好ましい変異体は、保存性アミノ酸置換により対照とは異なるそれらの変異体である。そのような置換は、同様の特徴のもう1つのアミノ酸によりポリペプチドにおける所定のアミノ酸を置換するそれらの置換である。典型的には、次のような保存性置換が見出される：脂肪族アミノ酸Ala, Val, Leu及びIle間の置換、ヒドロキシル残基Ser及びThrの相互交換、酸性残基Asp及びGluの交換、アミド残基Asn及びGln間の置換、塩基性残基Lys及びArgの交換、及び芳香族残基Phe及びTyr間での置換。

10

【0089】

いくつかの、少々の、5～10個、1～5個、1～3個、2個、1個のアミノ酸残基が、いずれかの組み合わせで、置換され、欠失され又は付加されているか、又はいずれのそれらも存在しない、図2（配列番号2）のPROST 03ポリペプチドのアミノ酸残基を有する、変異体、類似体、誘導体及びフラグメント、及び前記フラグメントの変異体、類似体及び誘導体が、これに関して特に好ましい。それらの中で特に好ましいものは、PROST 03ポリペプチドの性質及び活性を変更しないサイレント置換、付加及び欠失である。これに関して特に好ましいものは、保存性置換である。置換を伴わないで、図2（配列番号2）のアミノ酸配列を有するポリペプチドが、最も好ましい。

20

【0090】

本発明のポリペプチドはまた、図2（配列番号2）のポリペプチド、及び図2（配列番号2）のポリペプチドに対して少なくとも70%の類似性（好ましくは少なくとも70%の同一性）及びより好ましくは少なくとも90%の類似体（より好ましくは少なくとも90%の同一性）、及びさらにより好ましくは少なくとも95%の類似性（さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性）を有するポリペプチドを包含し、そしてまた、一般的に少なくとも10個のアミノ酸及びより好ましくは少なくとも50個のアミノ酸を含むポリペプチドのそのような部分を有するそのようなポリペプチドの部分を包含する。

30

【0091】

当業界において知られているように、2種のポリペプチド間の“類似性”は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列及びその保存されたアミノ酸置換と第2のポリペプチドの配列を比較することによって決定される。

本発明のポリペプチドのフラグメント又は一部は、ペプチド合成によりその対応する十分な長さのポリペプチドを生成するために使用され得；従って、フラグメントは、十分な長さのポリペプチドを生成するための中間体として使用され得る。

40

【0092】

フラグメント：

また、本発明のこの観点の好ましい態様は、PROST 03のフラグメント、最も特定には、図2（配列番号2）のPROST 03のフラグメント、及び図2（配列番号2）のPROST 03の変異体及び誘導体のフラグメントを含んで成るポリペプチドである。

これに関して、フラグメントは、前記PROST 03ポリペプチド及びその変異体又は誘導体のアミノ酸配列のすべてではないが、一部と完全に同じであるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0093】

50

そのようなフラグメントは、“自立構造体 (free-standing)” であり得、すなわち他のアミノ酸又はポリペプチドの一部又はそれに融合せず、又はそれらは、それが一部又は領域を形成する大きなポリペプチド内包含され得る。大きなポリペプチド内に包含される場合、現在論じられているフラグメントは、最も好ましくは、単一の連続した領域を形成する。しかしながら、いくつかのフラグメントは、単一の大きなポリペプチド内に包含され得る。例えば、一定の好ましい態様は、宿主における発現のために企画され、そして PROST 03 フラグメントのアミノ酸末端に融合される異種プレ-及びプロポリペプチド領域、及びフラグメントのカルボキシル末端に融合される追加の領域を有する前駆体ポリペプチド内に包含される本発明の PROST 03 ポリペプチドのフラグメントに関する。従って、本発明において意図される意味の1つの観点におけるフラグメントは、PROST 03 に由来する融合ポリペプチド又は融合タンパク質の一部を言及する。

10

**【0094】**

本発明のポリペプチドフラグメントの代表的な例として、約10～約553個のアミノ酸を有するそれらのフラグメントが言及され得る。

本明細書において、“約”とは、特別に引用される範囲、及びいずれかの極限又は両極限でいくつかの、少数の、5, 4, 3, 2又は1個のアミノ酸、多いか又は少ない範囲を包含する。例えば、約553個のアミノ酸とは、 $10 \pm$ いくつかの、少数の、5, 4, 3, 2又は1個のアミノ酸～553±いくつかの、少数の、5, 4, 3, 2又は1個のアミノ酸残基のポリペプチドフラグメントを意味し、すなわち広範囲としての10-いくつかのアミノ酸～553+いくつかのアミノ酸～狭い範囲としての10+いくつかのアミノ酸～553-いくつかのアミノ酸の範囲である。

20

**【0095】**

これに関して、いずれかの極限又は両極限での引用された範囲±5個ほどのアミノ酸の範囲が、非常に好ましい。いずれかの極限又は両極限での引用された範囲±3個ほどの長さのアミノ酸の範囲が特に非常に好ましい。いずれかの極限又は両極限での引用された範囲(付加又は欠失を有さない)±1個のアミノ酸の範囲が特に好ましい。これに関しては、約10～約553個のアミノ酸が最も好ましい。

**【0096】**

本発明の特に好ましいフラグメントは、PROST 03の切断変異体である。PROST 03の切断変異体は、図2(配列番号2)の配列の変異体又は誘導体を包含するが、但し次のものを除く：図2(配列番号2)に示される配列のアミノ末端を包含する連続した一連の残基の欠失(すなわち、連続した領域、部分又は一部)、又はカルボキシル末端、又は二重切断変異体におけるような、2つの連続した一連の残基の欠失、アミノ末端を包含する欠失及びカルボキシル末端を包含する欠失を包含する連続した一連の残基。上記に示されるサイズ範囲を有するフラグメントはまた、一般的にフラグメント間で特に好ましい切断フラグメントの好ましい態様である。

30

**【0097】**

本発明のこの観点においては、PROST 03の生物学的及び/又は免疫学的特性により特徴づけられるフラグメントが特に好ましい。そのようなフラグメントは、例4に記載されるように、抗体を生成するために使用されるそれらのフラグメントを包含する、予測されるループドメイン及びアミノ及びカルボキシル末端ドメインを含むそれらのフラグメントを包含する。

40

それらに関する一定の好ましい領域は、図2(配列番号2)に示され、図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列の分析により同定される前記タイプの領域(但し、それだけには限定されない)を包含する。

**【0098】**

さらに好ましい領域は、PROST 03の活性を介在するそれらの領域である。これに関して最も好ましいものは、PROST 03の化学的、生物学的又は他の活性を有するフラグメント、例えば類似する活性、又は改良された活性、又は低められた所望しない活

50

性を有するそれらのフラグメントである。これに関しては、関連するポリペプチド、例えば P R O S T 0 3 を包含する、M F S ファミリーの他のタンパク質の活性領域に対して、配列において、又は位置において、又は配列及び位置の両者において相同である領域を含むフラグメントが、非常に好ましい。

【0099】

ベクター、宿主細胞及び発現システム：

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターにより遺伝子的に構築される宿主細胞、及び組換え技法による本発明のポリペプチドの生成に関する。そのような技法は、Sambrookなど、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. 1989, 及び Ausubel, F. M. など、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & New York, N. Y., 1989 に記載されている。

10

【0100】

宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドを組み込み、そしてポリペプチドを発現するよう、遺伝子的に構築され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、感染、トランスダクション、トランスフェクション、トランスベクション及び形質転換の良く知られている技法を用いて、宿主細胞中に導入され得る。ポリヌクレオチドは、単独で、又は他のポリヌクレオチドと共に導入され得る。そのような他のポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドに、独立して導入され、同時導入され、又は導入連結され得る。

20

【0101】

従って、例えば本発明のポリヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞における同時トランスフェクション及び選択のための標準技法を用いて、選択マーカーをコードするもう1つの別のポリヌクレオチドと共に宿主細胞中にトランスフェクトされ得る。この場合、ポリヌクレオチドは一般的に、宿主細胞ゲノム中に安定して組み込まれるであろう。

【0102】

他方では、ポリヌクレオチドは、宿主細胞における増殖のための選択マーカーを含むベクターに連結され得る。そのベクター構造体は、前記技法により宿主細胞中に導入され得る。一般的に、プラスミドベクターは、沈殿物、例えばリン酸カルシウム沈殿物、又は荷電された脂質との複合体におけるDNAとして導入される。エレクトロポレーションはまた、宿主中にポリヌクレオチドを導入するためにも使用され得る。ベクターがウィルスである場合、それはインビトロでパッケージングされ、又はパッケージング細胞中に導入され、そしてパッケージングされたウィルスが細胞中にトランスダクションされ得る。

30

【0103】

本発明のこの観点に関して、ポリヌクレオチドを製造し、そしてポリヌクレオチドを細胞中に導入するために適切な広範囲の種類技法は、良く知られており、そして当業者に通常のことである。そのような技法は、それらの技法を詳細に説明する多くの実験マニュアルを例示する、上記で引用されたSambrookなどに再考される。本発明のこの観点によれば、ベクターは、例えばプラスミドベクター、一本鎖又は二本鎖ファージベクター、一本鎖又は二本鎖RNA又はDNAウィルスベクターであり得る。

40

【0104】

そのようなベクターは、DNA及びRNAを細胞中に導入するための良く知られている技法により、ポリヌクレオチド、好ましくはRNAとして細胞中に導入され得る。ベクターは、ファージ及びウィルスベクターの場合、また好ましくは感染及びトランスダクションのための良く知られている技法により、パッケージングされた又は封入されたウィルスとして細胞中に導入される。ウィルスベクターは、複製能力を有するか、又は複製欠陥性であり得る。後者の場合、ウィルス増殖は一般的に、宿主細胞を補足することにおいてのみ存在する。

【0105】

50

ある観点において、好ましいベクターは、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの発現のためのそれらのベクターである。一般的に、そのようなベクターは、発現されるべきポリヌクレオチドに操作可能に連結される宿主における発現のために効果的なシス-作用性制御領域を含んで成る。適切なトランス-作用性因子は、宿主により供給され、補充ベクターにより供給され、又は宿主中への導入に基づいてベクター自体により供給される。

**【0106】**

これに関しての好ましい態様においては、ベクターは特定の発現を提供する。そのような特定の発現は、誘発性発現又は一定タイプの細胞においてのみの発現、又は誘発性及び細胞特異的発現であり得る。操作するのに容易である環境因子、例えば温度及び栄養添加剤による発現のために誘発され得るベクターが、誘発性ベクター間で特に好ましい。本発明のこの観点に適切な種々のベクター、例えば原核及び真核宿主への使用のための構成及び誘発性発現ベクターは良く知られており、そして当業者により日常的に使用され得る。

10

**【0107】**

構築された宿主細胞は、中でも、プロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、又は遺伝子を増幅するために適切にように変性され得る従来の栄養培地において培養され得る。発現のために選択される宿主細胞により従来使用されて来た培養条件、例えば温度、pH及び同様のものは一般的に、当業者に明らかなように、本発明のポリペプチドの発現のために適切であろう。

**【0108】**

多種の発現ベクターが、本発明のポリペプチドを発現するために使用され得る。適切なベクターは、染色体、エピソーム及びウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソーム、酵素染色体要素、ウイルス、例えばバキュロウィルス、パポバウィルス、例えばSV40、ワクシニアウィルス、アデノウィルス、家禽類ポックスウィルス、偽性狂犬病ウィルス、レトロウィルス及びアルファウィルス、例えばSindbisウィルスに由来するベクター、及びそれらの組み合わせに由来するベクター、例えばプラスミド及びバクテリアファージ遺伝子要素、例えばコスミド及びファゲミドに由来するそれらのベクターを包含し、ここですべては、本発明のこの観点に従って発現のために使用され得る。一般的に、宿主においてポリペプチドを発現するためのポリヌクレオチドを発現するために維持し、増殖し又は発現するために適切ないずれかのベクターが、これに関しての発現のために使用され得る。好ましいベクターは、バキュロウィルスに由来するベクターである。

20

30

**【0109】**

適切なDNA配列が、種々の良く知られており且つ通常の技法のいずれかによりベクター中に挿入され得る。一般的に、発現のためのDNA配列は、1又は複数の制限エンドヌクレアーゼによりDNA配列及び発現ベクターを切断し、そしてT4 DNAリガーゼを用いて制限フラグメントと一緒に連結することによって、発現ベクターに連結される。この目的のために使用され得る制限及び連結のための方法は、当業者に良く知られており、且つ通常の方法である。これに関して、及び当業者に良く知られ且つ通常のものである他の技法を用いての発現ベクターを構成するための適切な方法は、本明細書に引用により組み込まれるSambrookなどに詳細に示されている。

40

**【0110】**

発現ベクターにおけるDNA配列は、適切な発現制御配列、例えばmRNA転写を方向づけるためのプロモーターに操作可能に連結される。そのようなプロモーターの代表は、ファージランダムP<sub>L</sub>プロモーター、E. coli lac, trp, tac及びtrcプロモーター、SV40初期及び後期プロモーター、ヒトサイトメガロウィルス(CMV)即時初期プロモーター、及び少数のプロモーターを命名するためのレトロウィルスLTRのプロモーターを包含する。言及されない多くのプロモーターが、本発明のこの観点への使用のために適切であり、良く知られており、そして本明細書における論議及び例により例示される態様で当業者により容易に使用され得ることは理解されるであろう。

50

## 【0111】

一般的に、発現構造体は、転写開始及び終結のための部位、及び転写された領域における、翻訳のためのリボソーム結合部位を含むであろう。前記構造体により発現される転写体のコード部分は、開始での翻訳開始AUG、及び翻訳されるべきポリペプチドの末端にほぼ位置する終結コドンを含むであろう。

さらに、構造体は、発現を調節し、そして生ぜしめる制御領域を含むことができる。一般的に、多くの通常実施される方法によれば、そのような領域、例えば、中でもリプレッサー結合部位及びエンハンサーが、転写を制御することによって作動するであろう。

## 【0112】

増殖及び発現のためのベクターは一般的に、選択マーカを包含するであろう。そのようなマーカはまた、増幅のために適切であり、又はベクターはこの目的のための追加のマーカを含むことができる。これに関して、発現ベクターは好ましくは、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型形質を供給するための1又は複数の選択マーカ遺伝子を含む。好ましいマーカは、真核細胞培養物のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、ネオマイシン、プロマイシン又はヒグロマイシン耐性遺伝子、及びE. コリ及び他の細菌を培養するためのテトラサイクリン、テオマイシン、カナマイシン又はアンピシリン耐性遺伝子を包含する。

10

## 【0113】

本明細書の他の部分で記載されるような適切なDNA配列、及び適切なポロモーター、並びに他の適切な制御配列を含むベクターが、所望するポリペプチドの底における発現のために適切な良く知られている種々の技法を用いて、適切な宿主中に導入され得る。適切な宿主の代表的な例は、細菌細胞、例えばE. コリ、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 及びサルモネラ・チピムリウム (*Salmonella typhimurium*) 細胞、菌類細胞、例えば酵母細胞；昆虫細胞、例えば *Drosophila* 52 及び *Spodoptera Sf9* 細胞、動物細胞、例えばCHO、COS及びBowesメラノーマ細胞；及び植物細胞、好ましくは昆虫細胞BT1-TN-5B1-4を包含する。多種の発現構造体のための宿主は良く知られており、そして当業者は、本発明のこの観点に従って、ポリペプチドを発現するための宿主の容易な選択を可能にされる。

20

## 【0114】

種々の哺乳類細胞培養物システムが発現のために使用され得る。哺乳類発現システムの例は、モンキー腎臓線維芽細胞のCOS-7系を包含する (Gluzmanなど, *Cell* 23: 175, 1991)。適合できるベクターを発現できる他の細胞系は、例えばC127、3T3、CHO、HeLa、ヒト腎臓293及びBHK細胞系を包含する。哺乳類宿主細胞においては、多くのウィルスに基づく発現システムが使用され得る。アデノウィルスが発現ベクターとして使用される場合、PROST 03をコードするポリヌクレオチド配列は、後期プロモーター及び三元リーダー配列から成るアデノウィルス転写/翻訳複合体中に連結され得る。ウィルスゲノムの非必須のE1又はE3領域における挿入は、感染された宿主細胞におけるPROST 03の発現を可能にする生存ウィルスをもたらすであろう (Logon and Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3656-59, 1984)。さらに、転写エンハンサー、例えばラウス肉腫ウィルス (RSV) エンハンサーが、哺乳類宿主細胞における発現を高めるために使用され得る。

30

40

## 【0115】

より特定には、本発明はまた、上記の1又は複数の配列を含んで成る、組換え構造体、例えば発現構造体を包含する。前記構造体は、本発明のそのような配列が挿入されているベクター、例えばプラスミド又はウィルスベクターを含んで成る。前記配列は、前方向又は逆方向で挿入され得る。これに関しての好ましい態様においては、構造体はさらに、調節配列、例えば前記配列に操作可能に連結されるプロモーターを含んで成る。多数の適切なベクター及びプロモーターは、当業者に知られており、そして本発明への使用のために適切な多くの市販のベクターが存在する。

50

## 【0116】

市販されている次のベクターが例により提供される。細菌への使用のために適切なベクターは、次のものを包含する：Qiagen USA (Valencia, CA) から入手できる、pQE70, pQE60及びpQE-9; Stratagene (La Jolla, CA) から入手できる、pBSベクター、Phagescript (商標) ベクター、Bluescript (商標) ベクター、pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A; 及びPharmacia Biotech (Piscataway, NJ) から入手できる、ptrc99a, pk223-3, pkk233-3, pDR540, pRIT5。好ましい真核ベクターは、Stratageneから入手できるpWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXTI及びpSG; 及びPharmacia Biotechから入手できるpSVK3, pBPV, pMSG及びpSVLである。Promegaから入手できるpCineoベクターが最も好ましい。

10

## 【0117】

それらのベクターは、本発明のこの観点に従っての使用のために当業者により入手できる、多くの市販の良く知られているベクターにより列挙される。例えば、宿主における本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチドの導入、維持、増殖又は発現のために適切ないずれかの他のプラスミド又はベクターが本発明のこの観点において使用され得ることが理解されるであろう。

## 【0118】

プロモーター領域は、プロモーター領域を欠いているレポーター転写単位、例えば候補体プロモーターフラグメント、すなわちプロモーターを含むことができるフラグメントを導入するための制限部位の下流のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ ("cat") 転写単位を含むベクターを用いていずれかの所望する遺伝子から選択され得る。良く知られているように、cat遺伝子の上流の制限部位でのプロモーター包含フラグメントのベクター中への導入は、標準のCATアッセイにより検出され得る、CAT活性の生成を生ぜしめる。この目的のために適切であるベクターは良く知られており、そして容易に入手できる。2種のそのようなベクターは、pKK232-8及びpCM7である。従って、本発明のポリヌクレオチドの発現のためのプロモーターは、良く知られ、且つ容易に入手できるプロモーターのみならず、また、レポーター遺伝子を用いて前記技法により容易に得られるプロモーターも包含する。

20

30

## 【0119】

本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの発現のために適切な既知の細胞プロモーターは、E. coli lac及びlacZプロモーター、T3及びT7プロモーター、T5tacプロモーター、ラムダPR, PLプロモーター、trpプロモーター及びtrcハイブリッドプロモーター (trp及びlacプロモーターに起因する) である。これに関しての適切な既知の真核プロモーターは、CMV即時初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期及び後期SV40プロモーター、レトロウィルスLTRのプロモーター、例えばテウス肉腫ウィルス ("RSV") 及びメタロチオネインプロモーター、例えばマウスメタロチオネイン-1プロモーターである。

40

## 【0120】

宿主細胞における発現のための適切なベクター及びプロモーターの選択は、良く知られている方法であり、そして発現ベクター構成のための必要な技法、宿主中へのベクターの導入、及び宿主における発現は、当業者の通常範囲内にある。一般的に、組換え発現ベクターは、複製の起点、下流の構造配列の転写を方向づけるための高く発現された遺伝子に由来するプロモーター、及びベクターへの暴露の後、ベクター含有細胞の単離を可能にする選択マーカーを包含するであろう。

## 【0121】

本発明はまた、上記構造体を含む宿主細胞にも関する。宿主細胞は、高等真核細胞、例えば哺乳類細胞、又は下等真核細胞、例えば酵母細胞であり得、又は宿主細胞は原核細胞、

50

例えば細菌細胞であり得る。宿主細胞中の構造体は、組換え配列によりコードされる遺伝子生成物を生成するために従来の態様で使用され得る。

ポリペプチドは、適切なプロモーターの制御下で、哺乳類細胞、酵母、細菌又は他の細胞において発現され得る。細胞フリーの翻訳システムがまた、本発明のDNA構造体に由来するRNAをも用いて、そのようなタンパク質を生成するために使用され得る。真核及び原核と共に使用するための適切クローニング及び発現ベクターは、本明細書に引用される Sambrook などにより記載される。

#### 【0122】

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって高められ得る。エンハンサーは、所定の宿主細胞型においてプロモーターの転写活性を高めるよう作用する、通常約10~300bpのDNAの要素である。エンハンサーの例は、bp100~270での複製起点の後期側に位置するSV40エンハンサー、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側上のポリマーエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーを包含する。

10

#### 【0123】

本発明のポリペプチドの異種構造配列をコードする本発明のポリヌクレオチドは一般的に、標準技法を用いてベクター中に挿入され得、その結果、それは発現のためにプロモーターに操作可能的に連結される。ポリヌクレオチドは、転写が5'側のリボソーム結合部位側に位置するよう位置決定されるであろう。リボソーム結合部位は、発現されるべきポリペプチドの翻訳を開始する5'側のAUG側に存在するであろう。一般的に、開始コドン、通常AUGにより開始し、そしてリボソーム結合部位と開始AUGとの間に存在する他の読み取り枠は存在しないであろう。また、一般的に、ポリペプチドの末端で翻訳停止コドンが存在し、そして転写された領域の3'末端でほぼ配置されるポリアデニル化シグナル及び転写終結シグナルが存在するであろう。

20

#### 【0124】

小胞体の内腔、細胞周辺腔又は細胞外環境中への翻訳されたタンパク質の挿入のために、適切な分泌シグナルが、発現されたポリペプチド中に組み込まれ得る。シグナルは、ポリペプチドに対して内因性であり得、又はそれらは異種シグナルであり得る。ポリペプチドは修飾された形、例えば融合タンパク質の形で発現され得、そして分泌シグナルのみならず、また追加の異種官能領域も包含することができる。従って、例えば追加のアミノ酸、特に荷電されたアミノ酸の領域が、精製の間、又は続く取り扱い及び貯蔵の間、宿主細胞における安定性及び持続性を改良するために、ポリペプチドのN-末端に付加され得る。また、特定の領域がまた、精製を促進するためにポリペプチドに付加され得る。

30

#### 【0125】

そのような領域は、ポリペプチドの最終調製の前、除去され得る。中でも、分泌又は排泄を生ぜしめ、安定性を改良し、そして精製を促進するためにポリペプチドへのペプチド成分の付加は、当業界においては良く知られた通常の技法である。例えば多量のPROST 03が抗体の生成のために必要とされる場合、容易に精製される融合タンパク質の高レベル発現を指図するベクターが所望される。

#### 【0126】

そのようなベクターは、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：多官能E.コリクローニング及び発現ベクター、例えばBluescript(商標)(Stratagene)(ここで、PROST 03をコードする配列が、ハイブリッドタンパク質が生成されるよう、アミノ末端Met及び-ガラクトシダーゼの続く7個の残基と読み取り枠を整合してベクター中に連結され得る)；pINベクター(Van Heede and Shuster, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509, 1989)及び同様のもの。

40

#### 【0127】

PtrcHisベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)が、急速な精製のためにポリヒスチジン(6xHis)標識を含む融合タンパク質として外来性

50

ポリペプチドを発現するために使用され得る。そのようなシステムにより製造されたタンパク質は、切断部位、例えばエンテロキナーゼ切断部位を含むよう企画され、その結果、興味あるクローン化されたポリペプチドが意図して、融合ペプチド成分から開放され得る。

【0128】

適切な宿主株の形質転換及び適切な細胞密度への宿主株の増殖に続いて、存在するならば、誘発性プロモーターが、適切な手段（例えば、温度シフト、又は化学的インデューサーへの暴露）により誘発され、そして細胞が追加の期間、培養される。

次に、細胞は、典型的には、遠心分離により収穫され、物理的又は化学的手段により破壊され、そして得られる粗抽出物は追加の精製のために保持される。

タンパク質の発現に使用される微生物細胞は、いずれかの従来の方法、例えば凍結 - 融解循環、音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤の使用（そのような方法は、当業者に良く知られている）により破壊され得る。

【0129】

PROST 03ポリペプチドは、次の良く知られている方法により組換え細胞培養物から回収され、そして精製され得る：硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、及びシレチンクロマトグラフィー。最も好ましくは、高性能液体クロマトグラフィー（“HPLC”）が、精製のために使用される。

【0130】

タンパク質を折りたたむための良く知られている技法が、ポリペプチドが単離及び/又は精製の間、変性される場合、活性配座を再生するために使用され得る。当業界において良く知られているタンパク質精製の種々の他の方法は、Deutscher, M., *Methods in Enzymology*, Vol. 182, Academic Press, San Diego, 1982; 及びScopes, R., *Protein Purification: Principles and Practice* Springer-Verlag, New York, 1982 に記載されるそれらの方法を包含する。

【0131】

他方では、本発明のポリペプチドは、固相技法を用いての直接的なペプチド合成により生成され得る（Stewartなど., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Merrifield, J., *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154, 1963）。インピトロタンパク質合成は、手動技法を用いて、又は自動装置により行われ得る。自動合成は、Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer（Perkin Elmer, Foster City, Calif）を用いて、その製造業者により提供される説明書に従って達成され得る。PROST 03の種々のフラグメントは、十分な長さの分子を生成するために、化学的方法を用いて、別々に化学的に合成され、そして組み合わされ得る。

【0132】

本発明のポリペプチドは、天然において精製された生成物、化学的合成方法の生成物及び原核又は真核宿主、例えば細菌、酵母、高等植物、昆虫及び哺乳類細胞から組換え技法により生成せられた生物を包含する。組換え生成方法に使用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化されても又はされなくても良い。さらに、本発明のポリペプチドはまた、いくつかの場合、宿主介在性方法の結果として、初期修飾されたメチオニン残基を含むことができる。

【0133】

PROST 03ポリペプチド及びそれらをコードするポリヌクレオチドの使用：

PROST 03ポリヌクレオチド及びPROST 03ポリペプチドは、種々の用途、例

10

20

30

40

50

例えばPROST 03の化学的及び生物学的性質を使用するそれらの用途に従って使用され得る。追加の用途は、細胞増殖の疾病、例えば前立腺癌の診断及び処理に関する。本発明のそれらの観点は、次の論議によりさらに例示され、そしてさらに、本明細書内に記載される。

#### 【0134】

本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチド配列の使用のための基本原理は、他の組織と比較して、前立腺組織におけるPROST 03の選択的発現に、及び本明細書に開示されるPROST 03と、PROST 03が細胞表面タンパク質であることを示唆する、糖輸送体分子との間の化学的及び構造的類似性に基づかれています。PROST 03及びPROST 03の関連する分子は前立腺癌の不適切な増殖に関連する状態、障害又は疾病の診断及び処理に使用され得る。それらは、前立腺における癌及び転移性腫瘍増殖、及び他の腫瘍組織を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

10

#### 【0135】

PROST 03ポリヌクレオチド配列は、DNAプローブとして、及びアンチセンス及びリボザイム治療のための標的物として、又はアンチセンスポリヌクレオチドの生成のための鋳型として使用され得る。

PROST 03ポリペプチドは、細胞及び組織におけるPROST 03ポリペプチドのレベルを検出することにおいて、及び薬剤を一次及び転移性腫瘍に標的化することにおいて有用である、PROST 03に対する抗体を生成するために使用され得る。

PROST 03ポリペプチドは、PROST 03を含む細胞に対する免疫応答を刺激するために使用され得る。

20

#### 【0136】

PROST 03をコードするポリヌクレオチドは、細胞及び組織におけるPROST 03をコードするポリヌクレオチドのレベルを検出するための診断アッセイにおいて有用である。

PROST 03の発現に関連する状態、例えば前立腺癌においては、PROST 03の発現又は活性を制御することが好都合である。PROST 03の発現は、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はリボザイムの投与により抑制され得る。さらに、PROST 03ポリペプチドに結合し、そしてPROST 03活性を担当できる抗体が、PROST 03活性に関連する疾病又は病状を処理するために投与され得る。さらに、小分子アゴニスト及びアンタゴニストが、PROST 03活性をもたらすために投与され得る。

30

#### 【0137】

##### ポリヌクレオチドアッセイ：

本発明はまた、例えば診断試薬として、相補的ポリヌクレオチドを検出するためへのPROST 03 - 関連ポリヌクレオチドの使用にも関する。疾病状態に関連するPROST 03ポリヌクレオチドの検出は、PROST 03の組織特異的発現に起因する疾病の診断又は疾病に対する感受性を定義することができる、インビトロ及びインビボ診断の開発のための手段を提供するであろう。

#### 【0138】

PROST 03をコードする遺伝子に突然変異を担持する個人は、種々の技法によりDNAレベルで検出され得る。診断のためのポリヌクレオチドサンプルは、患者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織生検及び検死材料から得られる。ゲノムDNAは、検出のために直接的に使用され得、又は分析の前、PCRを用いることによって、酵素的に増幅され得る(Saikinなど、Nature, 324: 163-166, 1986)。RNA又はcDNAはまた、同じ手段で使用され得る。

40

#### 【0139】

例として、PROST 03をコードするポリヌクレオチド配列に対して相補的なPCRプライマーが、PROST 03発現及び突然変異を同定し、そして分析するために使用され得る。例えば、欠失及び挿入は、正常な遺伝子型への比較において、増幅された生成物のサイズの変化により検出され得る。点突然変異は、放射性ラベルされたPROST

50

03 RNA又は他方では、放射性ラベルされたPROST 03アンチセンスDNA配列に対して、増幅されたDNAをハイブリダイズすることによって同定され得る。完全に適合された配列は、RNAアーゼA消化又は溶解温度の差異によりミスマッチ重複体から区別され得る。

【0140】

対照遺伝子と、突然変異を有する遺伝子との間の配列差異はまた、直接的なDNA配列決定により示され得る。さらに、クローン化されたDNAセグメントは、特定のDNAセグメントを検出するためのプローブとして使用され得る。そのような方法の感度は、PCR又はもう1つの増幅方法の適切な使用により非常に増強され得る。例えば、配列決定プライマーは、二本鎖PCR生成物、又は改良されたPCRにより生成された一本鎖鋳型分子と共に使用される。配列決定は、放射性ラベルされたポリヌクレオチドによる従来の方法により、又は蛍光標識による自動配列決定方法により行われる。

10

【0141】

DNA配列差異に基づく遺伝子試験は、変性剤を伴って又はそれを伴わないで、ゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動性の変更の検出により達成され得る。小さな配列欠失及び挿入は、高解像度ゲル電気泳動により可視化され得る。異なった配列のDNAフラグメントは、異なったDNAフラグメントの移動性がそれらの特定の溶解又は部分溶解温度に従って異なった位置でゲルにおいて遅延される、変性ホルムアミドグラジエントゲル上で区別され得る(例えば、Myersなど、Science, 230: 1242, 1985を参照のこと)。

20

【0142】

特定の位置での配列の変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRN-アーゼ及びS1保護、又は化学的切断方法により表され得る(例えば、Cattionなど、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 4397-4401, 1985を参照のこと)。

従って、特定のDNA配列の検出は、種々の方法、例えばハイブリダイゼーション、RNアーゼ保護化学的切断、直接的なDNA配列決定又は制限の使用(例えば、ゲノムDNAの制限フラグメント長さ多型現象("RFLP")及びサザンプロット)により達成され得る。

従来ゲル電気泳動及びDNA配列決定の他に、突然変異はまた、現場分析により検出され得る。

30

【0143】

ポリペプチドアッセイ:

本発明はまた、診断アッセイ、例えば正常及び異常レベルの決定を包含する。細胞及び組織、及び体液におけるPROST 03ポリペプチドのレベルを決定するための定量及び診断アッセイにも関する。従って、例えば正常な対照組織サンプルと比較して、PROST 03ポリペプチドの過剰発現を検出するための本発明の診断アッセイが、過形成、例えば前立腺癌の存在を検出するために使用され得る。そのような診断試験は、転移性腫瘍増殖を検出するために使用され得る。宿主に由来するサンプルにおけるポリペプチド、例えば本発明のPROST 03ポリペプチドのレベルを決定するために使用され得るアッセイ技法は、当業者に良く知られている。

40

【0144】

そのようなアッセイ方法は、ラジオイムノアッセイ(RIA)、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析及び酵素結合された免疫吸着アッセイ(ELISA)及び蛍光活性化された細胞分類(FACS)を包含する。それらの中で、ELISAが好ましい。ELISAアッセイはまず、PRCST 07に対して特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体を調製することを含んで成る。さらに、モノクローナル抗体に結合するレポーターが一般的に調製される。レポーター抗体は、検出できる試薬、例えば放射性、蛍光又は酵素試薬に結合される。この例においては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ酵素が使用される。

50

## 【0145】

ELISAを行うためには、サンプルが宿主から除かれ、そして固体支持体、例えばサンプルにおけるポリペプチドを結合するポリスチレン皿上でインキュベートされる。次に、皿上のいずれかの遊離ポリペプチド結合部位が、非特異的タンパク質、例えばウシ血清アルブミンと共にインキュベートすることによって被覆される。次に、モノクローナル抗体が、前記モノクローナル抗体が皿においてインキュベートされ、この間、ポリスチレン皿に結合されるいずれかのPROST 03ポリペプチドに結合する。

## 【0146】

結合されていないモノクローナル抗体が緩衝液により洗浄される。ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合されるレポーター抗体が皿に配置され、PROST 03に結合されるいずれかのモノクローナル抗体へのレポーター抗体の結合がもたらされる。次に、結合されなかったレポーター抗体が洗浄される。次に、比色基質を包含する、ペルオキシダーゼ活性のための試薬が皿に添加される。第1及び第2抗体を通してPROST 03に結合される、固定されたペルオキシダーゼは、着色された反応生成物を生成する。所定の時間で進行する色彩の量は、サンプルに存在するPROST 03ポリペプチドを示す。定量的結果は典型的には、標準曲線により得られる。

10

## 【0147】

それらの及び他のアッセイは、中でも次の文献に記載されている：Hamptonなど、(Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul, Minn, 1990) 及びMaddoxなど、(J. Exp. Med. 158: 1211, 1983)。

20

## 【0148】

抗体：

本発明はさらに、本明細書においてPROST 03抗体として言及される、PROST 03に対して特異的に結合する抗体に関する。PROST 03発現は、腫瘍及び正常の前立腺組織に高く制限される。さらに、PROST 03発現は、骨及びリンパ節への前立腺癌転移において強い。その可能性ある細胞表面位置と組合されるそれらの特徴は、スクリーニング、予後、フォローアップアッセイ及びイメージング方法のための卓越したマーカーの特徴を示す。

## 【0149】

さらに、それらの特徴は、PROST 03が治療方法、例えば標的化された抗体治療、免疫治療及び遺伝子療法のための卓越した標的物であり得る。本明細書において使用される場合、用語“特異的に結合する”とは、抗体及びポリペプチドの相互作用を言及し、ここで前記相互作用は、ポリペプチド上での特定の構造体(すなわち、抗原決定基又はエпитープ)の存在に依存し、換言すれば、抗体は一般的にタンパク質よりもむしろ特定のポリペプチド構造体を認識し、そしてそれに結合する。

30

## 【0150】

PROST 03ポリペプチド、それらのフラグメント又は誘導體、又はその類似体、又はその類似体、又はそれらを発現する細胞が、それに対する抗体を生成するために免疫原として使用され得る(Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press NY (1989))。さらに、PROST 03コードの核酸分子及びPROST 03を発現することができる組換えベクターは、抗体を生成するための免疫原として使用され得る(Gurunathan など、, Ann. Rev. Immunol. 18: 927-74, 2000; Shedlock and Weiner, J. Leukoc. Biol. 68: 793-806, 2000)。それらの抗体は、例えばポリクローナル又はモノクローナル抗体であり得る。本発明はまた、キメラ、一本鎖及びヒト抗体、及びFabフラグメント、又はFab発現ライブラリーの生成物を包含する。当業界において知られている種々の方法が、そのような抗体及びフラグメントの生成のために使用され得る。

40

## 【0151】

50

本発明の配列に対応するペプチドに対して生成された抗体は、動物中へのポリペプチドの直接的な注入により、又は動物、好ましくは非ヒトにポリペプチドを投与することにより得られる。次に、そのようにして得られる抗体は、ポリペプチド自体を結合するであろう。この態様においては、ポリペプチドのフラグメントのみを配列でさえ、完全な生来のポリペプチドを結合する抗体を生成するために使用され得る。そのような抗体は、そのポリペプチドを発現する組織からポリペプチドを単離するために使用され得る。

【0152】

モノクローナル抗体の調製に関しては、連続細胞系培養により生成される抗体を供給するいずれかの技法が使用され得る。例としては、ハイブリドーマ技法 (Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497, 1975)、ヒトB-細胞ハイブリドーマ技法 (Kozborなど, Immunology Today 4, 72 1983) 及びヒトモノクローナル抗体を生成するEBV-ハイブリドーマ技法 (Coleなど, in Monoclonal Antibodies and Cancer, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985) を列挙することができる。

10

【0153】

さらに、“キメラ抗体”の生成のための技法、すなわち適切な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るために、ヒト抗体遺伝子に対するマウス抗体遺伝子のスプライシングが使用され得る (Morrissonなど, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851, 6855, 1984; Neubergerなど, Nature 312: 604-608, 1984; Takedaなど, Nature 314: 452-454, 1985)。他方では、一本鎖抗体の生成について記載される技法 (アメリカ特許第4,846,778号) が、PROST 03-特異的一本鎖を生成するよう適合化され得る。

20

【0154】

抗体はまた、リンパ球集団においてインビボ生成を誘発することによって、又はOriandiなど (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3937, 1989) 及びWinter and Milstein (Nature 349: 293-299, 1991) に開示されるような高い特異的な結合試薬のパネル又は組換え免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって生成され得る。

30

【0155】

PROST 03のための特異的結合部位を含む抗体フラグメントがまた生成され得る。例えば、そのようなフラグメントは、抗体分子のペプシン消化により生成され得るF(ab')<sub>2</sub>フラグメント及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得るFabフラグメントを包含するが、但しそれらだけには限定されない。他方では、Fab発現ライブラリーは、所望する特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの急速且つ容易な同定を可能にするために構成され得る (Huseなど, Science 256: 1270-1281, 1989)。

【0156】

本発明書において提供されるPROST 03のアミノ酸配列は、抗体を生成するためにPROST 03ポリペプチドの特異的領域を選択するために使用され得る。当業者により理解されるように、抗体が方向づけされるPROST 03ポリペプチドの領域又はエピトープは、その意図された用途により変化することができる。例えば、前立腺細胞上の膜結合されたPROST 03の検出のためのイムノアッセイへの使用のために意図された抗体は、PROST 03ポリペプチド上の接近できるエピトープに対して向けられるべきである。免疫原性構造、及び他の領域及びドメインを示す、PROST 03ポリペプチドの領域は、当業界において知られている種々の他の方法、例えばChou-Fasman、Garnier-Robson、又はJameson-Wolf分析を用いて、容易に同定され得る。

40

50

## 【0157】

それらの残基を含むフラグメントは、抗 - P R O S T 0 3 抗体の生成において特に適切である。特に有用なフラグメントは次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：V P P L L L E V G V E E K F (配列番号18)、Y T D F V G E G L Y Q G V P R A E P (配列番号19)、E P G T E A R R H Y D E G V R M (配列番号20)、E K Q V F L P K Y R G D T G G A S S E D S L M T S F (配列番号21)、P T E P A E G L S A S P L S P H (配列番号26)、L A G L L C P D P R P L E (配列番号22)、I D W D T S A L A P Y L G T Q E E (配列番号23)、D K S D L A K Y S A (配列番号24)、及びD F V G E G L Y Q G V P R A E G T E A R R H Y D E G V R (配列番号25)。それらの領域に対するポリクローナル抗体の生成は、例4に記載される。

10

## 【0158】

本発明のP R O S T 0 3 抗体は、診断アッセイ、イメージング方法、及び前立腺癌の管理のための治療方法において特に有用であり得る。本発明は、P R O S T 0 3 ポリペプチドの検出及び前立腺癌の診断のために有用な種々の免疫学的アッセイを提供する。そのようなアッセイは一般的に、P R O S T 0 3 ポリペプチドを認識し、そして結合することができる1又は複数のP R O S T 0 3 抗体を含んで成る。最も好ましい抗体は、P R O S T 0 3 に選択的に結合し、そして非 - P R O S T 0 3 ポリペプチドに結合しないであろう(又は弱く結合する)。

## 【0159】

前記アッセイは、当業界において良く知られている種々の免疫学的アッセイ型を包含するが、但しそれらだけには限定されない：種々のタイプのラジオイムノアッセイ、酵素結合の免疫吸着アッセイ及び同様のもの。さらに、前立腺癌を検出することができる免疫学的イメージング方法、例えばラベルされたP R O S T 0 3 抗体を用いての放射性シンチグラフィイメージング方法がまた、本発明により提供される。そのようなアッセイは、前立腺癌の検出、モニター及び予後において臨床学的に有用である。

20

## 【0160】

上記抗体は、ポリペプチドを発現するクローンを単離し又は同定するために、又は親和性クロマトグラフィーによる単離及び/又は精製のために固体支持体への抗体の結合により本発明のポリペプチドを精製するために使用され得る。

さらに、P R O S T 0 3 抗体は、細胞分類及び精製技法を用いてP R O S T 0 3 陽性細胞を単離するために使用され得る。特に、P R O S T 0 3 抗体は、抗体に基づく細胞分類又は親和性精製技法を用いて、異種移植腫瘍組織、培養細胞、等から前立腺癌細胞を単離するために使用され得る。本発明のP R O S T 0 3 抗体の他の使用は、P R O S T 0 3 ポリペプチドを模倣する抗 - イディオタイプ抗体の生成を包含する。

30

## 【0161】

種々の生物学的サンプル、例えば、血清、前立腺及び他の組織生検検体内のそのようなP R O S T 0 3 包含細胞の存在は、P R O S T 0 3 抗体により検出され得る。さらにP R O S T 0 3 抗体は、種々のイメージング方法、例えばT c - 9 9 m (又は他の同位体)接合の抗体による免疫シンチグラフィに使用され得る。例えば、I n - 1 1 1 接合の抗 - P S M A 抗体を用いての最近記載されているプロトコールに類似するイメージングプロトコールは、再発生及び転移性前立腺癌を検出するために使用され得る (S o d e e など, Clin. Nuc. Med. 21: 759 - 766, 1997)。

40

## 【0162】

本発明のP R O S T 0 3 抗体は、検出できるマーカーによりラベルされ得るか、又は第2分子、例えば細胞毒性別に接合され得、そしてP R O S T 0 3 陽性細胞に前記第2分子を標的にするために使用され得る (V i t e t l a, E. S. など, Immunotoxin Therapy, in Darita, Jr. V. T. など, eds, Cancer: Principles and Practice of Oncology 4<sup>th</sup> ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624 - 2636, 1993)。細胞毒性剤の例は次のものを包含するが

50

、但しそれらだけには限定されない：リシン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラシチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシン、ジオン、アクチノマイシンD、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素（PE）A、PE40、アブリン、グルココルチコイド及び他の化学療法剤、並びに放射性同位体。

【0163】

適切な検出マーカーは、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：放射性同位体、蛍光化合物、生物発行化合物、化学発光化合物、金属キレート剤又は酵素。適切な放射性同位体は、次のものを包含する：アンチモン - 124、アンチモン - 125、砒素 - 74、バリウム - 103、バリウム - 140、ベリリウム - 206、ビスマス - 207、カドミウム - 109、カドミウム - 115m、カルシウム - 45、セシウム - 139、セリウム - 141、セリウム - 144、セシウム - 137、クロム - 51、コバルト - 56、コバルト - 57、コバルト - 58、コバルト - 60、コバルト - 64、エルビウム - 169、ユーロピウム - 152、ガドリニウム - 153、全 - 195、全 - 199、ハフニウム - 175、ハフニウム - 175 - 182、インジウム - 11、イリジウム - 192、鉄 - 55、鉄 - 59、

10

【0164】

クリプトン - 85、鉛 - 210、マンガン - 54、水銀 - 197、水銀 - 203、モリブデン - 99、ネオジウム - 147、ネプチウム - 237、ニッケル - 63、ニオブ - 95、オスミウム - 185 + 191、パラジウム - 103、白金 - 195m、プラセオジウム - 143、プロメチウム - 147、プロトアクチニウム - 233、ラジウム - 222、レニウム - 186、ルビジウム - 86、ルテニウム - 103、ルテニウム - 106、スカンジウム - 44、スカンジウム - 46、セレニウム - 75、銀 - 110m、銀 - 111、ナトリウム - 22、ストロンチウム - 85、ストロンチウム - 89、ストロンチウム - 90、硫黄 - 35、タンタル - 182、テクネチウム - 99m、テルル - 125、テルル - 132、タリウム - 204、トリウム - 228、トリウム - 232、タリウム - 170、錫 - 113、チタン - 44、タングステン - 185、バナジウム - 48、バナジウム - 49、イットルビウム - 169、イットリウム - 88、イットリウム - 90、イットリウム - 91、亜鉛 - 65及びジルコニウム - 95。

20

【0165】

前立腺癌についての免疫療法：

本発明は、前立腺癌を処理するための種々の免疫療法、例えば抗体治療、インビボワクチン及びエクスビボ免疫治療アプローチを提供する。1つのアプローチにおいては、本発明は、前立腺癌を処理するために組織的に使用され得るPROST 03抗体を提供する。例えば、接合されていないPROST 03抗体が、患者中に導入され、その結果、抗体は前立腺癌細胞上の又は中のPROST 03に結合し、そして補体 - 介在性細胞溶解、抗体 - 依存性細胞毒性、PROST 03の生理学的機能の変更及び/又はリガンド結合又はシグナルトランスダクション経路の阻害を包含する機構により、細胞及び腫瘍の破壊を介在する。毒性剤、例えばリシン又は放射性同位体に接合されるPROST 03抗体はまた、毒性別をPROST 03 - 担持の前立腺腫瘍細胞（接合された抗体の表面上に又はインターナリゼーションを通して）に直接的に供給し、そしてそれにより、腫瘍細胞を破壊するために治療的にも使用され得る。

30

40

【0166】

PROST 03抗体を用いての前立腺免疫治療は、次の他のタイプの癌に関して都合良く使用されて来た種々のアプローチから生成される教授に従うことができる：結腸癌（Arleenなど、Crit. Rev. Immunol. 18: 133 - 138, 1998）、多発性骨髄腫（Ozakiなど、Blood 90: 3179 - 3185, 1997; Tsunenariなど、Blood 90: 2437 - 2444, 1997）、胃癌（Kasprzykなど、Cancer Res. 52: 2771 - 2776, 1992）、B - 細胞リンパ腫（Funakoshiなど、Immun

50

ther. Emphosis Tumer Immunol. 19:93-101, 1996)、白血病 (Zhongなど., Leuk. Res. 20:581-589, 1996)、結腸直腸癌 (Mounなど., Cancer Res. 54:6160-6166, 1994; Veldersなど., Cancer Res. 55:4398-4403, 1995) 及び乳癌 (Shepardなど., J. Clin. Immunol. 11:117-127, 1991)。

【0167】

本発明はさらに、PROST 03ポリペプチド又はそのフラグメントを含むよう配合されたワクチンを提供する。抗-癌治療への使用のための体液及び細胞介在された免疫性を生成するためのワクチンへの腫瘍抗原の使用は、当業界において良く知られており、そしてヒトR5MA及び嚙歯動物PAP免疫原を用いて前立腺癌に使用されて来た (Hodg eなど., Int. J. Cancer 63:231-237, 1995; Fun gなど., J. Immunol. 159:3113-3117, 1997)。そのような方法は、PROST 03ポリペプチド又はそのフラグメント、又はPROST 03-コードの核酸分子、及びPROST 03免疫原を発現でき、そしてそれを適切に表すことができる組換えベクターを用いることによって容易に行われ得る。

【0168】

例えば、ウイルス遺伝子供給システムは、PROST 03-コードの核酸分子を供給するために使用され得る。本発明のこの観点の実施に使用され得る種々のウイルス遺伝子供給システムは、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：ワクシニア、鶏痘、カナリア痘、アデノウイルス、インフルエンザ、ポリオウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス及びシンドビスウイルス (Restifo, in Curr. Opin. Immunol. 8:658-663, 1996)。非ウイルス子供給システムはまた、抗腫瘍応答を誘発するために、患者中に導入される (すなわち、筋肉内)、PROST 03ポリペプチド又はそのフラグメントをコードする裸DNAを用いることによっても使用され得る (引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第6,214,804号を参照のこと)。

【0169】

1つの態様においては、十分な長さのヒトPROST 03 cDNAが使用され得る。もう1つの態様においては、ヒトPROST 03 cDNAフラグメントが使用され得る。もう1つの態様においては、特定のTリンパ球 (CTL) エピトープをコードするPROST 03核酸分子が使用され得る。CTLエピトープは、特定されたHLA対立遺伝子に最適に結合することができるPROST 03ポリペプチド内のペプチドを同定するために、特定のアルゴリズム (例えば、Epimer, Brown University) を用いて決定され得る。

【0170】

種々のエキスピボ方法がまた使用され得る。1つのアプローチは、患者の免疫系に抗原としてPROST 03ポリペプチドを提供するために樹状突起細胞を包含する。樹状突起細胞はMHCクラスI及びII、B7補刺激体及びIL-12を発現し、そして従って、抗原提供細胞を高く特殊化される。前立腺癌においては、前立腺-特異的膜抗原 (PSMA) のペプチドによりパルスされた自己由来の樹状突起細胞は、前立腺癌患者の免疫系を刺激するために相I臨床学的試験に使用される (Tjoaなど., Prostate 28:65-69, 1996; Murphyなど., Prostate 29:371-380, 1996)。樹状突起細胞は、MHCクラスI及びII分子のT細胞にPROST 03ポリペプチドを提供するために使用され得る。

【0171】

1つの態様においては、自己由来の樹状突起細胞が、MHC分子に結合することができるPROST 03ポリペプチドによりパルスされる。もう1つの態様においては、樹状突起細胞は、完全なPROST 03ポリペプチドによりパルスされる。さらにもう1つの態様は、当業界において知られている種々の実施ベクター、例えばアデノウイルス (Ar

10

20

30

40

50

thurなど., Cancer Gene Ther. 4: 17-25, 1997)、レトロウイルス(Hendersonなど., Cancer Res. 56: 3763-3770, 1996)、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、DNAトランスフェクション(Ribasなど., Cancer Res. 50: 2865-2869, 1997)及び腫瘍由来のRNAトランスフェクション(Ashleyなど., J. Exp. Med. 186: 1177-1182, 1997)を用いて、樹状突起細胞におけるPROST 03遺伝子の過剰発現の構築を包含する。

#### 【0172】

抗-イディオタイプ抗-PROST 03抗体はまた、PROST 03ポリペプチドを発現する細胞に対する免疫応答を誘発するためのワクチンとして抗癌療法に使用され得る。特に、抗-イディオタイプの抗体の生成は、当業界において良く知られており、そしてPROST 03ポリペプチド上のエピトープを模倣する抗-イディオタイプ抗-PROST 03抗体を生成するために容易に適合され得る(例えば、Wagnerなど., Hybridoma 16: 33-40, 1997; Foonなど., J. Clin. Invest. 96: 334-342, 1995; Hertynなど., Cancer Immunol. Immunother. 43: 65-76, 1996を参照のこと)。そのような抗-イディオタイプ抗体は、腫瘍抗原に対して向けられた他の抗-イディオタイプ抗体により現在実施されるように、抗-イディオタイプ治療に使用され得る。

10

#### 【0173】

遺伝子免疫化方法は、PROST 03を発現する癌細胞に対して向けられた予防又は治療製体液及び細胞免疫応答を生成するために使用され得る。本明細書に記載されるPROST 03-コードのDNA分子を用いて、PROST 03ポリペプチド/免疫原をコードするDNA及び適切な調節配列を含んで成る構造体が、個人の筋肉又は皮膚中に直接的に注入され、その結果、筋肉又は皮膚の細胞が前記構造体を摂取し、そしてコードされたPROST 03ポリペプチド/免疫原を発現する。PROST 03ポリペプチド/免疫原は、分泌されるべき細胞表面ポリペプチドとして発現され得る。PROST 03ポリペプチド/免疫原の発現は、前立腺癌に対する予防又は治療性体液及び細胞免疫性の生成をももたらす。当業界において知られている種々の予防及び治療遺伝子免疫化技法が使用され得る(再考のためには、インターネットアドレスwww.genweb.comでの情報及び公開される文献を参照のこと)。

20

30

#### 【0174】

アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスベクター及びリボザイム:

prost 03に対して相補的なアンチセンスポリヌクレオチドは、合成的に調製され得る。そのようなオリゴヌクレオチドは、細胞中へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの摂取を助けることができる脂質を伴って又はそれを伴わないで、細胞中に供給され得る。

他方では、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペス又はワクシニアウイルス、又は種々の細胞プラスミドに由来する発現ベクターはまた、アンチセンスprost 03を発現するであろう組換えベクターの構成及び供給のためにも使用され得る。例えば、Sambrookなど.(前記)及びAusubelなど.(前記)に記載される技法を参照のこと。

40

#### 【0175】

十分な長さのcDNA配列及び/又はその調節要素を含んで成るポリヌクレオチドは、遺伝子機能の調節のために、センス鎖(Yousoufian and Lodish, Mol. Cell. Biol. 13: 98-104, 1993)又はアンチセンス鎖(Eguchiなど., Annu. Rev. Biochem. 60: 631-652, 1991)における調査手段としてのPROST 03ポリヌクレオチドの研究による使用を可能にする。そのような技法は、現在当業界において良く知られており、そしてセンス又はアンチセンスオリゴマー、又はより大きなフラグメントが、制御領域の

50

コードにそっての種々の位置から企画され得る。

【0176】

PROST 03をコードする遺伝子は、高レベルの企画されたPROST 03ポリヌクレオチドフラグメントを発現する発現ベクターにより細胞又は組織をトランスフェクトすることによって停止され得る。そのような構造体は、未翻訳センス又はアンチセンス配列を有する細胞を満たす。DNA中への組み込みの存在下でさえ、そのようなベクターは、すべてのコピーが内因性ヌクレオチドにより無能にされるまで、RNA分子を転写し続けることができる。遷移的発現は、非複製ベクターにより1ヶ月又はそれ以上の間、続くことができ、そして適切な複製要素がベクターシステムの一部である場合、さらに長く続くことができる。

10

【0177】

上記で言及されたように、遺伝子発現の修飾は、PROST 03の領域、すなわちプロモーター、エンハンサー及びイントロンを制御するようアンチセンス分子、DNA又はRNAを企画することによって得られる。転写開始部位、例えばリーダー配列の-10~+10領域由来するオリゴヌクレオチドが好ましい。アンチセンス分子はまた、転写体のリボソームへの結合を妨げることによってmRNAの翻訳を阻止するよう企画され得る。同様に、阻害は、“三本鎖ヘリックス”塩基対合方法を用いて達成され得る。三本鎖ヘリックス対合は、ポリメラーゼ、転写因子、又は調節分子の結合のために十分に二本鎖ヘリックスを切開する能力を失う。三本鎖DNAを用いての最近の治療進歩は、Ge e, J. E. など、(In Huber and Car. Molecular and Immunologic Approaches. Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994)により再考されている。

20

【0178】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することができる酵素性RNA分子である(アメリカ特許第4,987,071号;WO93/23057号)。リボザイム作用の機構は、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、続くエンドヌクレアーゼ分解性切断を包含する。PROST 03をコードするRNAのエンドヌクレアーゼ分解性切断を特異的且つ効果的に触媒する構築されたハンマーヘッドモチーフのリボザイム分子は、本発明の範囲内である。いずれかの可能性あるRNA標的物内の特定のリボザイム切断部位は最初に、次の配列、GUA、GUU及びGUCを包含するリボザイム切断部位のための標的分子を走査することによって同定される。

30

【0179】

いったん同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する、15~20個のリボヌクレオチドの短いRNA配列は、オリゴヌクレオチドを操作可能にすることができる二次構造特徴について評価され得る。候補体標的物の適合性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、相補的オリゴヌクレオチドによるハイブリダイゼーションへの接近性を試験することによって評価され得る(Irieなど、, Advance. Pharmacol. 40: 207-257, 1997)。

【0180】

本発明のアンチセンス分子及びリボザイムは、RNA分子の合成について当業界において知られているいずれかの方法により調製され得る。それらは、オリゴヌクレオチドを化学的に合成するための技法、例えば固相ホスホラミジド化学合成を包含する。他方では、RNA分子は、インビトロ及びインビボ転写により、又はPROST 03をコードするDNA配列により生成され得る。いくつかのDNA配列は、適切なRNAポリメラーゼプロモーター、例えばT7又はSP6と共に、広範囲の種類ベクター中に組み込まれ得る。他方では、アンチセンスRNAを構成的に又は誘発的に合成するアンチセンスcRNA構造体は、細胞系、細胞又は組織中に導入され得る。

40

【0181】

RNA分子は、細胞内安定性及び半減期を高めるために修飾され得る。可能な修飾は、分子の5'及び/又は3'末端でのフランキング配列の付加、又は分子の主鎖内のホスホジ

50

エステルーゼ連鎖よりもむしろホスホチオエート又は2'-O-メチルの使用を包含するが、但しそれだけに限定されない。高められた安定性はまた、非従来の塩基、例えばイノシン及びキエオシン、及びアセチル-、チオ-、及び内因性エンドヌクレアーゼにより容易に認識されない、同様に修飾された形のアデニン、シチジン、グアニン、チミン及びウリジンの封入により達成され得る。

#### 【0182】

細胞又は組織中へのアンチセンスベクターを導入するための方法は、下記に論じられ、そしてインビボ、インビトロ及びエクスピボ治療のために同等に適切であるそれらの方法を包含する。エクスピボ治療に関しては、アンチセンスベクターが、患者から採取された細胞中に導入され、そして自己由来の移植片についてクローン的に増殖され、引用により本明細書に開示されるアメリカ特許第5,399,493号及び第5,437,994号に提供されるように、同じ患者中に戻される。トランスフェクション及びリボソームによる供給、又は他の脂質基材又は非脂質基材の剤は、当業界において良く知られている。

10

#### 【0183】

PROST 03に結合する剤を同定するためのアッセイ：

本発明はまた、PROST 03に結合する剤を同定するために使用され得るアッセイ及び方法にも関する。特に、PROST 03に結合する剤は、PROST 03に結合する、PROST 03リガンド又は他の剤、又は構成生物の能力及び/又はPROST 03活性を阻害し/刺激する能力により同定され得る。

#### 【0184】

他方では、PROST 03ポリペプチドに結合する剤は、酵母2-ハイブリッドシステム又は結合捕獲アッセイを用いて同定され得る。酵母2-ハイブリッドシステムにおいては、2-サブユニット転写因子の1つのサブユニット及びPROST 03ポリペプチドから構成される融合タンパク質をコードする発現単位が、酵母細胞に導入され、そして発現される。細胞はさらに、(1)その発現が、発現のための2つのサブユニット転写因子を必要とする検出可能マーカーをコードする発現単位、及び(2)転写因子の第2サブユニット及びDNAのクローン化されたセグメントから製造される融合タンパク質をコードする発現単位を含むよう修飾される。

20

#### 【0185】

DNAのクローン化されたセグメントが、PROST 03ポリペプチドに結合するタンパク質をコードする場合、発現はPROST 03及びコードされたタンパク質の相互作用をもたらす。これは、結合に接近して転写因子の2つのサブユニットを架橋し、転写因子の再構成を可能にする。これは、検出できるマーカーの発現をもたらす。酵母2-ハイブリッドシステムは特に、PROST 03の細胞結合パートナーのためのセグメントをコードするcDNAのライブラリーのスクリーニングにおいて有用である。

30

#### 【0186】

上記アッセイに使用され得るPROST 03ポリペプチドは、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：単離されたPROST 03ポリペプチド、PROST 03ポリペプチドのフラグメント、PROST 03ポリペプチドを発現するよう変更された細胞、又はPROST 03ポリペプチドを発現するよう変更された細胞の画分。さらに、PROST 03ポリペプチドは、PROST 03ポリペプチドの完全なポリペプチド又は定義されたフラグメントであり得る。PROST 03ポリペプチドが分子量又は活性のシフトにより、結合する剤についてアッセイされる限り、本アッセイが使用され得ることは、当業者に明らかであろう。

40

#### 【0187】

剤/細胞成分がPROST 03ポリペプチドに結合するかどうかを同定するために使用される方法は、主に、使用されるPROST 03ポリペプチドの性質に基づかれるであろう。例えば、ゲル遅延アッセイは、剤がPROST 03又はそのフラグメントに結合するかどうかを決定するために使用され得る。他方では、免疫検出及びバイオチップ技法が、PROST 03ポリペプチドとの使用のために採用され得る。当業者は、特定の剤

50

が P R O S T 0 3 ポリペプチドに結合するかどうかを決定するために多くの当業界において知られている技法を酔う容易に使用することができる。

【 0 1 8 8 】

剤及び細胞成分はさらに、細胞フリーシステム又は細胞アッセイシステムを用いて、P R O S T 0 3 ポリペプチドの活性を調節する能力について試験され得る。P R O S T 0 3 ポリペプチドの活性がより定義されるようになるので、同定された活性に基づいての機能的アッセイが使用され得る。

【 0 1 8 9 】

本明細書において使用される場合、剤は、その剤が P R O S T 0 3 活性を低める場合、P R O S T 0 3 活性をアンタゴナイズすると言われる。好ましいアンタゴニストは、い  
10  
ずれかの他の細胞タンパク質に影響を及ぼさず、P R O S T 0 3 を選択的にアンタゴナイズするであろう。さらに、好ましいアンタゴニストは、P R O S T 0 3 活性を、5 0 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、最も好ましくはすべての活性を低めるであろう。

【 0 1 9 0 】

上記方法においてアッセイされる剤は、ランダムに選択され、又は合理的に選択されるか又は企画され得る。本明細書において使用される場合、剤は、その剤が P R O S T 0 3 ポリペプチドの特定の配列を考慮しないでランダムに選択される場合、ランダムに選択されると言われる。ランダムに選択された剤の例は、化学的ライブラリー又はペプチド結合ライブラリー、又は生物又は植物抽出物の増殖ブイヨンの使用である。  
20

【 0 1 9 1 】

本明細書において使用される場合、剤は、その剤が標的物部位の配列及び/又は剤の作用に関するそのコンホメーションを考慮する非ランダムに基礎に基づいて選択される場合、合理的に選択され、又は企画されると言われる。剤は、P R O S T 0 3 ポリペプチドを製造するペプチド配列を用いることによって、合理的に選択され、又は合理的に企画され得る。例えば、合理的に選択されたペプチド剤は、そのアミノ酸配列が P R O S T 0 3 ポリペプチドのフラグメントと同一であるペプチドであり得る。

【 0 1 9 2 】

本発明の方法により試験される剤は、例えばペプチド、抗体、オリゴヌクレオチド、小分子及びブタミン誘導体、並びに炭水化物であり得る。当業者は、本発明のスクリーニング  
30  
方法に使用される剤の構造的性質に関して制限は存在しないことを容易に認識することができる。本発明の1つの種類の剤は、ペプチド剤であり、そのアミノ酸配列は、P R O S T 0 3 ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて選択される。

【 0 1 9 3 】

ペプチド剤は、当業界において知られているような、標準の固相(又は溶液相)ペプチド合成方法を用いて調製され得る。それらのペプチドをコードするDNAは、市販のオリゴヌクレオチド合成装置を用いて合成され得、そして標準の組換え生成システムを用いて組換え的に生成され得る。固相ペプチド合成を用いての生成は、遺伝子コードのアミノ酸が  
40  
包含されない場合、必要とされる。

【 0 1 9 4 】

本発明のもう1つの種類の剤は、P R O S T 0 3 ポリペプチドの決定位置と免疫反応性の抗体である。上記でされたように、抗体は、その抗体により標的化される P R O S T 0 3 ポリペプチドのそれらの部分を、抗原性領域として含む、ペプチドにより適切な哺乳類対象を免疫化することによって得られる。そのような剤は、第2世代阻害剤を同定し、そして P R O S T 0 3 活性を阻止するために競争結合研究において使用され得る。

【 0 1 9 5 】

本発明の方法により試験される細胞抽出物は例えば、細胞又は組織の水性抽出物、細胞又は組織の有機抽出物、又は部分的に精製された細胞画分であり得る。当業者は、本発明のスクリーニング方法に使用される細胞抽出物の源に関して制限は存在しないことを容易に理解することができる。  
50

PROST 03ポリペプチドを結合する剤、例えばPROST 03抗体は、PROST 03を調節し、適切な哺乳類細胞に抗癌剤を標的化し、又はPROST 03との相互作用を阻止する剤を同定するために使用され得る。PROST 03を発現する細胞は、PROST 03に結合する剤を用いて、標的化されるか同定され得る。

【0196】

PROST 03結合剤がいかん使用されるかは、PROST 03結合剤の性質に依存する。例えば、PROST 03結合は、接合された毒素、例えばジフテリア毒素、コレラ毒素、ワシン又はシュードモナス外毒素を、PROST 03を発現する細胞に供給し；PROST 03活性を調製し；PROST 03発現細胞を直接的に殺害し；又は競争結合剤をスクリーニングにおいて同定するために使用され得る。例えば、PROST 03阻害剤は、PROST 03発現細胞の増殖を直接的に阻害するために使用され得、そしてPROST 03結合剤が診断剤として使用され得る。

10

【0197】

医薬組成物及び投与：

本発明はまた、PROST 03ポリヌクレオチド、PROST 03ポリペプチド、抗体、アゴニスト、又はインヒビターを、単独で、又は少なくとも1つの他の剤、例えばいずれかの無菌の、生物適合性キャリアー、例えば塩溶液、緩衝溶液、デキストロース及び水（但し、それらだけには限定されない）において投与され得る安定化合物と組合して含んで成る医薬組成物にも関する。それらの分子のいずれかが、患者に、単独で、又は他の剤、薬剤又はホルモンと組合して、賦形剤又は医薬的に許容できるキャリアーと共に混合される医薬組成物として投与され得る。本発明の1つの態様においては、医薬的に許容できるキャリアーは、医薬的に不活性である。

20

【0198】

本発明はまた、医薬組成物の投与にも関する。そのような投与は経口又は非経口により行われる。非経口供給の方法は、局部、動脈内（腫瘍に直接的に）、筋肉内、皮下、骨髄内、鞘内、心室内、静脈内、腹膜内又は鼻腔内投与を包含する。活性生物の他に、それらの医薬組成物は、賦形剤、及び医薬的に使用され得る製剤中への活性化化合物の加工を促進する助剤を含んで成る医薬的に許容できる適切なキャリアーを含むことができる。配合及び投与についての技法に関する追加の詳細は、Remington's Pharmaceutical Science (Ed. Maack Publishing Co. Easton, Pa.)に見出され得る。

30

【0199】

経口投与のための医薬組成物は、経口投与のために適切な用量として、当業界において良く知られている医薬的に許容できるキャリアーを用いて配合され得る。そのようなキャリアーは、患者による摂取のための錠剤、ピル、糖剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液及び同様のものへの医薬組成物の配合を可能にする。

【0200】

経口使用のための医薬製剤は、固体賦形剤との活性化化合物の組み合わせを通して、任意には、得れる混合物を粉碎し、そして適切な助剤を添加した後、所望には、錠剤又は糖剤コアを得るために、前記顆粒の混合物を加工することにより得られる。適切な賦形剤は、炭水化物又はタンパク質充填剤、例えば糖、例えばラクトース、スクロース、マンニトール又はソルビトール；トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモ又は他の植物からの澱粉；セルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はナトリウムカルボキシメチルセルロース及びガム、例えばアラビアゴム及びトラガカントガム；及びタンパク質、例えばゼラチン及びコラーゲンである。所望には、砕解剤又は溶解剤、例えば架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、アルギンサン又はその塩、例えばアルキル酸ナトリウムが添加され得る。

40

【0201】

糖剤コアは、適切な被膜、例えばまた、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール及び/又は二酸化チタン、ラッカー溶液及

50

び適切な有機溶媒又は溶媒混合物を含むことができる、濃縮された糖溶液により供給される。色素又は顔料が、生成物の同定のために、又は活性化化合物の量、すなわち容量を特徴づけるために、錠剤又は糖剤被膜に添加され得る。

#### 【0202】

経口的に使用され得る医薬剤は、ゼラチンから製造された押し込み嵌めカプセル、及びゼラチン及び被膜、例えばグリセロール又はソルビトールから製造された軟質の密封されたカプセルを包含する。押し入れ嵌めカプセルは、充填剤又は結合剤、例えばラクトース又は澱粉、滑剤、例えばタルク又はステアリン酸マグネシウム、及び任意には安定剤と共に混合される活性成分を含むことができる。軟質カプセルにおいては、活性化化合物は、適切な液体、例えば脂肪油、液体パラフィン又は液体ポリエチレングリコールにおいて、安定剤を伴って又はそれを伴わないで、溶解され又は懸濁され得る。

10

#### 【0203】

非経口投与のための医薬剤は、活性化化合物の水溶液を含む。注射に関しては、本発明の医薬組成物は、水溶液、好ましくは生理学的に適合できる緩衝液、例えばハックス溶液、リンガー溶液又は生理学的緩衝液において配合され得る。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘度を高める物質、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール又はデキストランを含むことができる。さらに、活性化化合物の懸濁液は、適切な油状注射懸濁液として調製され得る。適切な親油性溶媒又はビークルは、脂肪油、例えばゴマ油、又は合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチル又はトリグリセリド又はリポソームを含む。任意には、懸濁液はまた、適切な安定剤、又は高濃度溶液の調製を可能にするために化合物の溶解を高める剤を含むことができる。

20

#### 【0204】

局部又は鼻腔内投与に関しては、透過されるべき特定のバリアーに適切な浸透剤が配合において使用される。そのような浸透剤は一般的に当業界において知られている。

#### 【0205】

キット：

本発明はさらに、本発明の前述の組成物中の1又は複数の成分により充填された1又は複数の容器を含んで成る医薬用パック及びキットに関する。そのような容器は、医薬又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制して、そしてヒト投与のための製品の製造、使用又は販売の許可を与える政府機関により処方される形で存在することができる。

30

#### 【0206】

製造及び貯蔵：

本発明の医薬組成物は、当業界において知られている態様で、例えば従来の混合、溶解、粒質化、糖剤製造、磨砕、乳化、カプセル封入、閉じ込め又は凍結乾燥工程により製造され得る。

#### 【0207】

医薬組成物は、塩として供給され得、そして酸、例えば塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、琥珀酸、等により形成され得る。塩は、その対応する遊離塩基形である、水性又は他のプロトン性溶媒においてより溶解できる傾向がある。他の場合、好ましい製剤は、使用の前、緩衝液と共に組合される、pH 4.5 ~ 5.5での1 mM ~ 50 mMのヒスチジン、0.1 ~ 2%のスクロース、2 ~ 7%のマンニトールにおける凍結乾燥粉末であり得る。

40

許容できるキャリアーに配合される本発明の化合物を含んで成る医薬組成物が調製された後、それらは適切な容器に配置され、そして示される病状の処理のためにラベルされるPROST 03の投与に関しては、そのようなラベリングは、投与の量、頻度及び方法を包含する。

#### 【0208】

治療的有効量：

本発明への使用のために適切な医薬組成物は、活性成分が意図される目的、すなわちPROST 03発現により特徴づけられる特定の疾病状態の処理を達成するための有効量で

50

含まれる組成物を包含する。有効量の決定は、当業者の能力の範囲内である。

いずれかの化合物に関して、治療的有效量は、まず、細胞培養アッセイ、例えば新形成細胞又は動物モデル、通常マウス、ウサギ、イヌ又はブタのいずれかにおいて評価され得る。動物モデルはまた、所望する濃度範囲及び投与の経路を得るためにも使用される。次に、そのような情報は、ヒトにおける有用な用量及び投与の経路を決定するために使用され得る。

#### 【0209】

治療的有效量とは、徴候又は病状を緩和する、タンパク質又はその抗体、アゴニスト又はインヒビターの量として言及される。そのような化合物の治療効率及び毒性、例えばED<sub>50</sub>（集団の50%において治療的に効果的な用量）及びLD<sub>50</sub>（集団の50%に対して致死的な量）は、細胞培養物又は実験動物において標準の医薬方法により決定され得る。治療効果及び毒性の用量化は、治療指数であり、そしてそれは比、ED<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub>として表され得る。大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイ及び動物研究から得られるデータが、ヒト使用のための用量範囲を決定することに使用される。そのような化合物の用量は、好ましくは、ほとんど毒性がないか又はまったく毒性がない、ED<sub>50</sub>を包含する循環濃度の範囲内にある。用量は、使用される投与形、患者の感受性及び投与の経路に依存して、この範囲内で変化する。

10

#### 【0210】

正確な用量は、処理されるべき患者の観点から、個々の医薬により選択される。用量及び投与は、十分なレベルの活性成分を供給し、又は所望する効果を維持するよう調節される。考慮され得る追加の要因は、疾病状態の重症度、例えば腫瘍サイズ及び位置；年齢、体重及び患者の性別；食事、投与の時点及び頻度、薬剤の組み合わせ、反応感度及び治療に対する耐性/応答を包含する。長く作用する医薬組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス速度に依存して、3～4日、1週ごとに、又は2週ごとに投与される。

20

#### 【0211】

通常用量は、投与の経路に依存して、0.1～100,000 µgから1gの合計用量まで変化することができる。特定の用量及び供給方法に関する案内は文献に提供されている。アメリカ特許第4,657,760号；第5,206,344号又は第5,225,212号を参照のこと。当業者は、タンパク質又はそれらのインヒビターのためによりもポリヌクレオチドのために異なった配合を用いるであろう。同様に、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの供給は、特定の細胞、病状、位置、等に対して特異的であろう。

30

#### 【0212】

##### 実施例

本発明はさらに、次の例により記載される。例は、特定の態様により本発明を例示するためにのみ提供される。それらの例は、本発明の特定の観点を例示するものであって、開示される発明の範囲を制限するものではない。

すべての例は、詳細に記載されていることを除いて、当業者に良く知られ、そして通常のことである標準の技法を用いて行われた。次の例の通常分子生物学技法は、標準の実験マニュアル、例えばSambrookなど、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor or Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989に記載のように行われ得る。

40

#### 【0213】

##### 例1. PROST 03のための追加の5'側配列のクローニング

Incyte's LifeSeqデータベースの調査は、前立腺において発現される遺伝子としてのprost 03の同定を導いた。前記データベースからのprost 03クローンを、部分コード配列を含むことが決定されている連続配列中にアセンブリーした。前記連続配列は、前記コード領域の5'末端を欠いていた。

#### 【0214】

PROST 03のための追加の5'側配列を、PCRを用いて、ヒト前立腺cDNAラ

50

イブラリー (Human Prostate 5' - Stretch cDNA library; Clontech) からクローン化した。一次増幅を、prost 03 特異的プライマー Prost 03 - 1 と共に Lambda GT11 前方向又は逆方向プライマーを用いて行った。一次及びネステッド PCR 反応の両者からの増幅された生成物を、TAKA クローニングキット (Invitrogen) を用いてクローン化した。個々のクローンを、PCR により再試験し、そして配列を決定した。

【0215】

新規 5' 側 prost 03 配列を、2 種のクローンから得、そして LifeSeq データベースの BLAST 調査に使用した。新規連続配列をアセンブリーし; この配列は、PROST 03 タンパク質のための完全コード領域を含むことが予測された。十分な長さのクローン (#3352331) を、Incyte から得、そしてその配列を確かめた。 10

【0216】

プライマー配列:

Lambda GT11 - 前方向プライマー: 5' - GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC C - 3' (配列番号 3);

Lambda GT11 - 逆方向プライマー: 5' - GAC ACC AGA CCA ACT GGT AAT G - 3' (配列番号 4);

PROST 03 - 1: 5' - CAC CTC CAG TGT CCC CTC GGT AT T TGG - 3' (配列番号 5);

PROST 03 - 2: 5' - CAC ACT GTG GGA CAG GCA TGT GG C ACC - 3' (配列番号 6); 20

十分な長さのポリペプチド配列が、FastA プログラムを用いて SWISS - PROT 及び SPTREMBL データベースを調べるために使用された。この調査の結果は、PROST 03 配列が、植物においてこれまで同定されている輸送体組、特にスクロース / プロトン輸送体組に対する類似性を示すことを示唆した。

【0217】

例 2. COS 細胞における PROST 03 の過渡的発現

PROST 03 をコードする cDNA を、3 部分連結方法を用いて、哺乳類発現ベクター pCIneo (Oromega) 中にサブクローン化した。pCIneo を EcoRI 及び SmaI により消化し、そして次に、ウシ腸アルカリホースファターゼにより処理した。prost 03 コード領域の 5' 側部分を、鑄型として Incyte クローン #3352331 を用いて、PCR により増幅した。5' 側プライマーを、コンセンサス Kozak 配列を含むより企画した。PCR フラグメントをゲル精製し、そして次に、EcoRI 及び SphI により消化した。prost 03 コード領域の 3' 側部分を、SphI 及び BsrBI による Incyte クローン #3352331 の消化、916 個の塩基対フラグメントの続くゲル精製により得た。次に、prost 03 DNA フラグメントを pCIneo ベクターと共に連結し、そして TOP10 細胞 (Invitrogen) を形質転換し、クローンを得た。 30

【0218】

次に、得られる発現プラスミド CI Pr3 を、Lipofectamine - Plus (Life Technologies) を用いて、COS 細胞中に一時的にトランスフェクトした。全細胞溶解物は、ウェスタンブロットにより分析される場合、PROST 03 タンパク質を含むことが示された。 40

5' 側 PCR プライマー: 5' - ACT GAA TTC GCC ACC ATG GTC CAG AGG CTG TGG - 3' (配列番号 7);

3' 側 PCR プライマー: 5' - CCA TCC AGC TGC ACA GCT CAG - 3' (配列番号 8)。

【0219】

例 3. prost 03 mRNA 発現

正常及び腫瘍組織からの種々のサンプルにおける及び細胞系における prost 03 m 50

RNAの発現を、Taqmanアッセイを用いての半定量性PCR(Perkin-Elmer)により決定した。改良されたGleason分類システムに従って等級付けされた前立腺正常、良性及び腫瘍組織サンプルを、Urology Department at Stanford University School of Medicine から得た。RNAを標準の方法によりそれらから単離した。他の腫瘍及び正常組織からのRNAを、市販源、例えばClontech及びBiochainから購入した。前立腺腫瘍細胞系(PC-3、LNCaP及びDU145)を、American Type Culture Collection から得、そして血清含有培地を用いての標準の方法により培養において増殖した。それらの細胞系に由来する異種移植片腫瘍を、ヌードマウスにおいて確立し、そして移植の約4~6週間後、マウスから収穫した。RNAを、標準方法により腫瘍から単離した。

10

## 【0220】

Taqmanに基づくPCR分析を、次の組のプライマー及びプローブを用いて行った：第1組：プライマー：CCTCCAGGCTCTGTCTGAT(配列番号9)及びATGGCGCACTGCAGGAAC(配列番号10)、及びプローブ6-FAM-TGCAGGCGTTCGGATGGGC-Tamra(配列番号11)；

第2組：プライマー：ATTCGGCACTCGAGCAGTCTA(配列番号12)及びTGAGGGCGGCTGAAGCT(配列番号13)、及びプローブ6-FAM-CAGGCATGTGGCACCCGGCA-Tamra(配列番号14)；並びに

第3組：プライマー：CAGCCAGTCTGTCACTGCCCTAT(配列番号15)及びTCGCTCTTGTCAAATACTACCTGTGTA(配列番号16)、及びプローブ6-FAM-CCAGCCTGCGGCGAGACACCA-Tamra(配列番号17)。

20

## 【0221】

それらのプライマー及びプローブを、Perkin Elmer's Primer Expressを用いて企画し、そしてSynthetic Geneticsにより合成した。PCR反応を、30~40サイクルを行い、そして前立腺RNAを用いて定量化し、相対的比較のための標準曲線を生成した。この分析は、prost 03 mRNAが高く前立腺に制限されたことを示した。

## 【0222】

例4. 抗体生成

ウサギポリクローナル抗血清を、PROST 03ポリペプチド配列に由来する8種の合成ポリペプチド配列に対して生ぜしめた。それらの配列が、表面エピトープをたぶん認識する抗血清を生成するために、それらの予測される細胞外配向のために選択された。システイン残基を、アミノ酪酸(Abu)により置換し、合成を助けた。特定のアミノ配列、PROST 03タンパク質上での位置及び3種のペプチドについての名称が下記に列挙される。

30

## 【0223】

名称	位置	アミノ酸配列
Pep 1	39 - 52	V P P L L L E V G V E E K F (配列番号18)
Pep 4	292 - 309	Y T D F V G E G L Y Q G V P R A E P (配列番号19)
Pep 5	308 - 323	E P G T E A R R H Y D E G V R M (配列番号20)
Pep 7	406 - 431	E K Q V F L P K Y R G D T G G A S S E D S L M T S F (配列番号21)
Pep 8	225 - 240	P T E P A E G L S A P S P L S P H (配列番号26)
Pep 9	109 - 121	L A G L L C P D P R P L E (配列番号22)
Pep 10	181 - 197	I D W D T S A L A P Y L G T Q E E (配列番号23)

40

50

P e p 1 1 5 4 4 - 5 5 3 D K S D L A K Y S A ( 配列番号 2 4 )  
 P e p 4 + 5 2 9 4 - 3 2 2 D F V G E G L Y Q G V P R A E G T E A R R H Y  
 D E G V R ( 配列番号 2 5 )

【 0 2 2 4 】

ペプチドを、免疫原として使用するために、追加のアミノ末端システインを通して、カサガイヘモシアニン ( K L H ) に共有結合した。同様に、ウシ血清アルブミン ( B S A ) 接合体を、E L I S A を通しての抗血清力価の分析のために調製した。

2 匹の動物を、個々のペプチドにより免疫化した。初期免疫化を、フロイント完全アジュバント ( 0 . 5 m g / 動物 ) において行い、続いて、フロイント不完全アジュバントにおいて 0 . 2 5 m g / 動物で 3 週間隔で定期的に筋肉内投与により追加免疫化した。定期的な試験用採血を取り、そして特異的 B S A - ペプチド接合体に対する抗体力価を E L I S A により測定し、そしてプレ免疫血清と比較した。

10

【 0 2 2 5 】

抗血清を、C O S 細胞において一時的に発現される P R O S T 0 3 に対して、E L I S A 及びウェスタンブロットを通して、P R O S T 0 3 特異性について試験した。ペプチド 7 , 8 , 1 0 , 1 1 及び 4 + 5 に対する抗血清が、P R O S T 0 3 を認識した。P R O S T 0 3 - 特異的抗血清を、L N C A P 腫瘍、L N C A P 細胞、P C 3 腫瘍、P C 3 細胞及びヒト前立腺腫瘍のいくつかの癌床学的サンプルから調製された溶解物に対して、さらに試験した。結合特異性を、相同及び異種ペプチドの存在下での結合により確認した。

20

【 0 2 2 6 】

P R O S T 0 3 に対するヒトモノクローナル抗体を、P R O S T 0 3 ペプチドによりトランスジェニックマウスを免疫化することによって生成した。それらの動物からの脾臓細胞を、骨髄腫細胞により融合し、ハイブリドーマ細胞を生成した。得られるハイブリドーマを、P R O S T 0 3 ペプチド及びタンパク質に対して向けられた抗体を生成するそれらのハイブリドーマによりスクリーンした。

【 0 2 2 7 】

例 5 . P R O S T 0 3 発現の免疫組織化学的染色

P R O S T 0 3 タンパク質の発現を、種々のヒト正常及び腫瘍組織、例えば乳房、結腸、肺、脳及び前立腺において、L i f e S p a n B i o s c i e n c e s , I n c . により決定した。さらに、骨及びリンパ節に転移する前立腺癌を、P R O S T 0 3 タンパク質発現を決定するために選択した。ホルマリン固定されたパラフィン - 包埋された組織を、一次抗体としての抗 - P R O S T 0 3 抗体と共にインキュベートし、そして主要検出システムは、f u s c h i a 着色された赤色沈着物 ( S K - 5 1 0 0 ) を生成するために使用された V e c t o r R e d 基質キット及び V e c t o r A B C - A P キット ( A K 5 0 0 1 ) から成った。

30

【 0 2 2 8 】

組織をまた、正の対照抗体 ( C D 3 1 ) により染色し、組織抗原が保存され、そして免疫組織化学分析のために入手できることを確かめた。C D 3 1 に対して陽性に染色された組織のみを、この研究の残りのために選択した。負の対照は、一次抗体の不在下で、隣接する断片に対して、完全な免疫組織学方法を行うことから成った。P R O S T 0 3 発現は、正常な前立腺、前立腺癌、及び骨及びリンパ節への転移に見られた。大部分の癌は、癌における種々のレベルのタンパク質発現を伴って、抗 - P R O S T 0 3 抗体による正の染色を示した。

40

【 0 2 2 9 】

本明細書に言及されるすべての出版物及び特許は、引用により本明細書に組み込まれる。本発明はその特定の態様により記載されて来たが、種々の変更が本発明の範囲内で行われ得ることは、当業者により理解されるべきである。さらに、多くの修飾が、本発明の範囲内の特定の状況、材料、物質の組織、方法、工程段階、目的物を適合するために行われ得る。すべての修飾は、本発明の範囲内で意図される。

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

図 1 は、生物学的又は免疫学的活性形の PROST 03 をコードする、prost 03 のポリヌクレオチド配列（配列番号 1）を示す。

## 【図 2】

図 2 は、PROST 03 の推定されるアミノ酸配列（配列番号 2）を示し、そして予測されるトランスメンブランドメインは下線が引かれている。トランスメンブランドメインは、MTMトランスメンブランドメイン推定のプログラムを用いて推定される。

## 【図 3】

図 3 は、PROST 03 及び DcSUT2、すなわちスクロース/ $H^+$  共輸送体のアミノ酸一列整列を示す。PROST 03 配列は底部上に存在する。個々の配列についての推定されるトランスメンブランドメインは下線が引かれている。

10

## 【図 4】

図 4 は、PROST 03 のポリヌクレオチド及び推定されるアミノ酸配列を示す。

## 【図 5】

図 5 は、Taqman に基づく PCR 分析による、ヒト組織における PROST 03 mRNA の発現を示す。ヒト組織（腫瘍及び正常）からの RNA が標準方法により単離された。prost 03 mRNA 発現を検出するためのプライマー及びプローブは、Perkin Elmer's Express ソフトウェアを用いて企画され、そして Synthetic Genetics により合成された。prost 03 mRNA は、前立腺組織において主に見出された。

20

## 【図 6】

図 6 は、ヒト前立腺組織における PROST 03 発現の免疫組織化学的染色を示す。正常及び腫瘍組織が、組織化学染色を用いて、PROST 03 発現について試験された。大部分の癌は、抗-PROST 03 抗体による正の染色を示した（例 5 を参照のこと）。

。



## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
1 November 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/81577 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, 15/11, C07K 14/705, 16/18, C12Q 1/68, A61K 38/00, 39/00, 48/00, 31/7088, G01N 33/50
- (21) International Application Number: PCT/US01/13323
- (22) International Filing Date: 26 April 2001 (26.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/200,065 27 April 2000 (27.04.2000) US  
Not furnished 20 April 2001 (20.04.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:  
US 60/200,065 (CIP)  
Filed on 27 April 2000 (27.04.2000)  
US Not furnished (CIP)  
Filed on 20 April 2001 (20.04.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); 13342 Berlin (DE).
- (72) Inventors: and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): LAU, Ted [US/US]; 3307 Encinal Avenue, Alameda, CA 94501 (US). LIN, Richard, J. [US/US]; 1026 Hill Meadow Place, Danville, CA 94526 (US). PARKES, Deborah [US/US]; 19050 Hampton Place, Hayward, CA 94541 (US). PARRY, Gordon [US/US]; 2255 Hackamore Court, Walnut Creek, CA 94596 (US). SCHNEIDER, Douglas, W. [US/US]; 3329 Walnut Lane, Lafayette, CA 94549 (US). STEINBRECHER, Renate [US/US]; 2255 Hackamore Court, Walnut Creek, CA 94596 (US). VAN HEUIT, Pamela, Toy [US/US]; 3965 Campolindo Drive, Moraga, CA 94556 (US). WU, John [US/US]; 87 Woodland Road, Carlisle, MA 01741 (US).
- (74) Agents: ZELANO, Anthony, J., Millen, White, Zelano & Branigan, P.C., Suite 1400, Arlington Courthouse Plaza 1, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 et al. (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/81577 A2

(54) Title: DNA ENCODING A NOVEL PROST 03 POLYPEPTIDE

(57) Abstract: The present invention relates to novel human polypeptides, designated PROST 03, which exhibit an expression pattern showing a high specificity toward prostate tissues, polynucleotides encoding the polypeptides, methods for producing the polypeptides, expression vectors and genetically engineered host cells for expression of the polypeptides. The invention further relates to methods for utilizing the polynucleotides and polypeptides in research, diagnosis, and therapeutic applications.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-1-

**DNA ENCODING A NOVEL PROST 03 POLYPEPTIDE**

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/200,065, filed April 27, 2000, which is incorporated herein in full by reference.

**FIELD OF THE INVENTION**

This invention relates, in part, to newly identified polynucleotides and polypeptides; variants and derivatives of the polynucleotides and polypeptides; methods of making the polynucleotides and polypeptides, and their variants and derivatives; antibodies directed toward the polypeptides, their variants and derivatives; and uses of the polynucleotides, polypeptides, variants, derivatives and antibodies. In particular, in these and in other regards, the invention relates to novel human polypeptides (designated PROST 03) which exhibit an expression pattern showing a high specificity toward prostate tissues, polynucleotides which encode these polypeptides, antibodies directed toward these polypeptides, and antisense polynucleotides that block PROST 03 expression.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

Prostate cancer is a frequently occurring disease in man, in that it is found in about one third of men over the age of 45. There is evidence for both genetic and environmental causes, with the majority of cases probably being the result of a combination of both factors. Studies of familial cancer have suggested that genetic predisposition plays a role in about 5-10% of all prostate cancers, and in about 45% of cases in men younger than 55.

There is evidence that prostate cancer develops as a multi-step disease, with one of the precursor lesions being prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). Early stages of the disease are androgen dependent, while later stages are hormone independent. A proliferative disorder of the prostate known as benign prostatic hyperplasia is often detected clinically but is probably not a stage in the development of cancer. It is, however, frequently associated with prostate cancer. Cancers in the prostate are often multifocal, generally slow growing, and heterogeneous. Late stage cancers frequently metastasize to the lymph nodes and to the bone.

Prostate cancer is usually diagnosed by physical examination and by serum levels of prostate specific antigen (PSA). Radical prostatectomy is the treatment of choice for localized disease. Advanced metastatic disease is treated currently by androgen ablation induced by orchiectomy or treatment with GnRH (gonadotrophin releasing hormone), and by anti-androgen therapy. However,

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-2-

advanced disease almost invariably becomes hormone resistant and there is no cure for progressive disease. Moreover, there are serious side effects associated with both radical prostatectomy and androgen ablation therapy. These include a high risk of incontinence and impotence associated with radical prostatectomy and bone fractures and osteoporosis associated with androgen ablation therapy.

There is, therefore, a considerable need for new therapeutic approaches for both early and late stage prostate cancer. There is also a significant need for new diagnostic agents, in particular agents that can discriminate stages of the disease, as this significantly influences the treatment options. For example, if disease has progressed beyond the prostate and has metastasized to the lymph nodes, radical prostatectomy is not undertaken as it has no effect on progression, but may have significant unwanted side effects. An agent that could detect metastasis, *in vivo*, would have considerable value. Proteins that, in their expression pattern, show specificity for prostate tissues, should be useful for both metastatic detection as well as targeting of therapeutic agents.

Changes in the expression of specific proteins have been demonstrated in prostate cancer including abnormal p53 expression in late stage prostate cancer, reduced levels of TGF- $\beta$  receptors, reduced levels of E-cadherin, C-Cam (a cell adhesion molecule), and several integrins. The expression of the oncogene bcl-2 is strikingly elevated in late stage androgen independent tumors, and prognosis for patients expression bcl-2 at elevated levels is relatively poor. While the previously mentioned changes in gene expression are well documented, no changes in expression have been identified that have been demonstrated to be causative for the disease. It would, therefore, be useful to identify new proteins whose expression is linked to the presence or development of prostate tumors, since they could serve as molecular targets for prostate cancer diagnosis and therapy.

Transport systems allow the uptake of essential nutrients and ions, excretion of end products of metabolism, and communication between cells and the environment (Mitchel, *Adv. Enzymol.* 29:33-87, 1963). Primary active transporters drive solute accumulation or extrusion of a variety of substances by using ATP hydrolysis, photon absorption, electron flow, substrate decarboxylation, or methyl transfer (Mitchel, *Fed. Proc.* 26:1370-1379, 1967). Over 100 families of transporters have been classified, with two of them occurring ubiquitously in all classifications of living organisms. One of these, the major facilitator superfamily (MFS) consists of membrane transport proteins involved in the symport, antiport or uniport of various substances (Griffith et al., *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:684-695, 1992; Marger et al., *Trends Biochem. Sci.* 18:13-21, 1993). Within the MFS, the distinct families of membrane transport proteins are evolutionarily related to each other (Henderson, *Bioenerg. Biomembr.* 22:525-569, 1990). The MFS members are currently classified into 17 (18) distinct families representing 300 MFS proteins. The proteins are involved in sugar uptake, drug resistance, uptake of Krebs-cycle intermediates, phosphate ester /phosphate antiport, and oligosaccharide uptake (Henderson et al., *Philos. Trans. Royal Soc. London Ser.B* 328:391-410, 1990). At a secondary structure level, hydrophathy

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-3-

considerations have suggested that with the exception of three, the families are all characterized by a 12 transmembrane-spanner (TMS) protein topology. In three families, two additional transmembrane-spanners are found (Paulsen et al., *Microbio. Rev.* 60: 575-608, 1996). It is proposed that the transmembrane-spanners traverse the plasma membrane in an alpha-helical conformation (Goswitz and Brooker, *Protein Science* 4:534-537, 1995). A well conserved MFS specific motif between TMS2 and TMS3 and the related but less well conserved motif between TMS8 and TMS9 is characteristic of virtually all MFS family members and seems to be of functional significance (Pao et al., *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62 (1):1-34, 1998). It has been hypothesized that C-terminal regions of MFS transporters are involved primarily in determining the substrate specificities of the proteins within the MFS and the N-terminal regions are involved primarily in the energization of transport (Griffith et al., *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 4: 684-695, 1992; Rouch et al., *Mol. Microbiol.*, 4:2051-2062, 1990). Family specific motifs have been identified within members of the MFS, providing a tool to place newly identified MFS proteins into their appropriate family group (Paulsen et al., *Gene* 124:1-11, 1993).

The sugar porter (SP) family represents the largest MFS family consisting of 133 sequenced members derived from bacteria, archaea, eukaryotic protists, fungi, animals and plants. The proteins have 12 TMSs and are very diverse in sequence and function. Under physiological conditions they function either by uniport or by H<sup>+</sup> symport. The symporters function in energized cells with inwardly directed polarity. It has been demonstrated that members of the sugar porter family can catalyze solute:solute antiport when substrates are present on both sides of the membrane. Substrates of the sugar porter family include glucose in bacteria, hexoses in plants, and sugars as well as organic cations and neurotransmitters in animals. The proteins exhibit a size range of 404-818 amino acid residues. The hydrophilic regions of the eukaryotic proteins may play a role in regulation or in cytoskeletal attachment and they are frequently subject to phosphorylation by ATP-dependant protein kinases.

Proteins of the sugar porter family are often involved in drug transport and changes in these proteins may play a role in the emergence of drug resistance (Lewis, *Trends Biochem.Sci.* 19: 119-123, 1994). It is possible that increased levels of transport proteins may lead to rapid export of accumulated drug, resulting in less effective chemotherapy. Reduction in the levels of such a protein or reduction in its activity might prove important to the maintenance of effective therapeutic drug levels within cells.

These data suggest that transporter proteins may be good candidates for use in diagnosis of cancer and therapeutic intervention. The novel PROST 03 polypeptide shows similarity to the sugar porter family of membrane transport proteins and may, therefore, have therapeutic and diagnostic utility for cancer.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-4-

**SUMMARY OF THE INVENTION**

The present invention provides a polynucleotide sequence which uniquely encodes a novel protein designated herein as PROST 03. The PROST 03 polypeptide is preferentially expressed in prostate tissues, both tumor and normal, and in prostatic carcinoma metastatic to bone and lymph node. In addition, the PROST 03 polypeptide shows similarity to a sucrose/H<sup>+</sup> symporter protein, DcSUT2 (Genbank o65803.sp\_plant), which suggests it is a cell-surface protein. It contains the transmembrane-spanner protein topology common to members of the MFS family of membrane transport proteins. The polynucleotide sequence, designated herein as *prost 03*, and described herein in Figure 1 (SEQ ID NO: 1), encodes the amino acid sequence for PROST 03, which is shown in Figure 2 (SEQ ID NO: 2). The prostate-specific nature of the expression of PROST 03 and its cell-surface location suggest that PROST 03 could, therefore, both provide a novel target for diagnostic agents to detect metastatic prostate cancer as well as provide a potential target for therapeutic intervention through the use of therapeutic agents linked to antibodies directed at the PROST 03 polypeptide.

It is an object of the present invention to provide polypeptides, *inter alia*, that have been identified as novel proteins which are preferentially expressed in prostate tissues. The polypeptides also appear to possess similarity to the sugar porter family of membrane transport proteins, as shown by comparison of the amino acid sequence set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and the known amino acid sequence of another sugar porter protein, DcSUT2.

It is a further object of the invention, moreover, to provide polynucleotides that encode such polypeptides, particularly polynucleotides that encode the polypeptide designated herein as PROST 03.

In accordance with this aspect of the invention there are provided isolated polynucleotides encoding PROST 03, including mRNAs, cDNAs, and, in further embodiments of this aspect of the invention, biologically, diagnostically, clinically or therapeutically useful variants, analogs or derivatives thereof, or fragments thereof, including fragments of the variants, analogs and derivatives.

Among the particularly preferred embodiments of this aspect of the invention are naturally occurring allelic variants of polynucleotides that encode variants of the polypeptide designated herein as PROST 03.

In accordance with this aspect of the invention there are provided novel polypeptides of human origin referred to herein as PROST 03 as well as biologically, diagnostically or therapeutically useful fragments, variants and derivatives thereof, variants and derivatives of the fragments, and analogs of the foregoing.

Among the particularly preferred embodiments of this aspect of the invention are variants of PROST 03 encoded by naturally occurring allelic variants of the *prost 03* polynucleotide.

It is another object of the invention to provide a method of producing the aforementioned

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-5-

polypeptides, polypeptide fragments, variants and derivatives, fragments of the variants and derivatives, and analogs of the foregoing. In a preferred embodiment of this aspect of the invention there are provided methods of producing the aforementioned PROST 03 polypeptides comprising culturing host cells having expressibly incorporated therein an exogenously-derived PROST 03-encoding polynucleotide under conditions for expression of human PROST 03 in the host.

In accordance with another object of the invention there are provided products, compositions, processes and methods that utilize the aforementioned polypeptides and polynucleotides for *inter alia* research, biological, clinical and therapeutic purposes.

In accordance with certain preferred embodiments of this aspect of the invention, there are provided products, compositions and methods, *inter alia*, for assessing PROST 03 expression in cells by determining PROST 03 polypeptides or PROST 03-encoding mRNA and assaying genetic variation and aberrations, such as defects or mutations, in genomic sequences containing *prost 03*.

In accordance with certain preferred embodiments of this and other aspects of the invention there are provided probes that hybridize to *prost 03* polynucleotide sequences.

It is a further object of the invention to provide antibodies that are highly selective for PROST 03 polypeptides, or fragments thereof, and which may be employed in a method for diagnosis and/or detection of PROST 03 expression, which may be associated with prostate cancer. In accordance with certain preferred embodiments of this aspect of the invention, antibodies are labeled in such a way as to produce a detectable signal. Particularly preferred would be an antibody labeled with a radiolabel, an enzyme, a chromophore or a fluorescer.

In a further aspect of the invention there are provided antibodies that are conjugated to a therapeutic agent for administration to cells *in vitro*, to cells *ex vivo* and to cells *in vivo*, or to a multicellular organism. Particularly preferred in this regard are therapeutic agents that are cytotoxic. In certain preferred embodiments in this regard is administration of such conjugated antibodies to a human patient for treatment of a disease state characterized by PROST 03 activity or expression such as prostate cancer.

In a further aspect of the invention there are therapeutic antibodies that are internalized.

In a further aspect of the invention, peptides and anti-idiotypic antibodies are provided which can be used to stimulate an immune response.

In a further aspect of the invention there are provided ribozymes and polynucleotides complementary to *prost 03* polynucleotides (i.e. antisense polynucleotides) for administration to cells *in vitro*, to cells *ex vivo* and to cells *in vivo*, or to a multicellular organism. Particularly preferred in this regard is administration of antisense molecules to a human patient for treatment of a disease state, such as prostate cancer or benign prostatic hyperplasia.

Other objects, features, advantages and aspects of the present invention will become apparent

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-6-

to those of skill from the following description. It should be understood, however, that the following description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only. Various changes and modifications within the spirit and scope of the disclosed invention will become readily apparent to those skilled in the art from reading the following description and from reading the other parts of the present disclosure.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIGURE 1: Polynucleotide sequence of *prost 03* (SEQ ID NO: 1), which encodes the biologically or immunologically active form of PROST 03.

FIGURE 2: Deduced amino acid sequence of PROST 03 (SEQ ID NO: 2), with the predicted transmembrane domains underlined. Transmembrane domains were predicted using the MTM transmembrane domain prediction program.

FIGURE 3: Amino acid alignment of PROST 03 and DcSUT2, a sucrose/H<sup>+</sup> symporter. The PROST 03 sequence is on the bottom. The predicted transmembrane domains for each sequence are underlined.

FIGURE 4: Polynucleotide and deduced amino acid sequences of PROST 03.

FIGURE 5: Expression of *prost 03* mRNA in human tissues by Taqman based PCR analysis. RNA from human tissues, both tumor and normal, was isolated by standard techniques. Primers and probe to detect *prost 03* mRNA expression were designed using Perkin Elmer's Primer Express software and synthesized by Synthetic Genetics. *Prost 03* mRNA is found primarily in prostate tissues.

FIGURE 6: Immunohistochemical staining of PROST 03 expression in human prostate tissues. Normal and tumor tissues were examined for PROST 03 expression using histochemical staining. The majority of carcinomas showed positive staining with anti-PROST 03 antibody (see Example 5).

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

##### Definitions

As used in the specification, examples and appended claims, unless specified to the contrary,

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-7-

the following terms have the meaning indicated.

"PROST 03" refers to the polypeptide having the amino acid sequence set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2); variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and fragments of the variants, analogs and derivatives. The terms "fragment," "derivative" and "analog" when referring to the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) mean a polypeptide which retains essentially the same biological and/or immunological activity as the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

"prost 03" refers to the polynucleotide having the sequence set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 1) and polynucleotides encoding polypeptides having the amino acid sequence of PROST 03 set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2); and to polynucleotides encoding PROST 03 variants, analogs, derivatives and fragments, and fragments of the variants, analogs and derivatives. Prost 03 also refers to such polynucleotides composed of RNA as well as to polynucleotides which are the complement of polynucleotides which encode the polypeptide sequence set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

"Polynucleotide(s)" generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxyribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. Thus, for instance, polynucleotides as used herein refers to, among others, single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, polynucleotide as used herein refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The strands in such regions may be from the same molecule or from different molecules. The regions may include all of one or more of the molecules, but more typically involve only a region of some of the molecules. One of the molecules of a triple-helical region often is an oligonucleotide.

As used herein, the term "polynucleotide" includes DNAs or RNAs as described above that contain one or more modified bases. Thus, DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons are "polynucleotides" as that term is intended herein. Moreover, DNAs or RNAs comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritium-labelled bases, to name just two examples, are polynucleotides as the term is used herein.

It will be appreciated that a great variety of modifications have been made to DNA and RNA that serve many useful purposes known to those of skill in the art. The term "polynucleotide" as it is employed herein embraces such chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells, including simple and complex cells, *inter alia*.

"Polypeptides", as used herein, includes all polypeptides as described below. The basic structure of polypeptides is well known and has been described in innumerable textbooks and other publications in the art. In this context, the term is used herein to refer to any peptide or protein

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-8-

comprising two or more amino acids joined to each other in a linear chain by peptide bonds. As used herein, the term refers to both short chains, which also commonly are referred to in the art as peptides, oligopeptides and oligomers, for example, and to longer chains, which generally are referred to in the art as proteins, of which there are many types.

It will be appreciated that polypeptides often contain amino acids other than the 20 amino acids commonly referred to as the 20 naturally occurring amino acids, and that many amino acids, including the terminal amino acids, may be modified in a given polypeptide, either by natural processes such as glycosylation and other post-translational modifications, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Even the common modifications that occur naturally in polypeptides are too numerous to list exhaustively here, but they are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature, and they are well known to those of skill in the art. Among the known modifications which may be present in polypeptides of the present invention are, to name an illustrative few, acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a polynucleotide or polynucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination.

Such modifications are well known to those of skill and have been described in great detail in the scientific literature. Several particularly common modifications, glycosylation, lipid attachment, sulfation, gamma-carboxylation of glutamic acid residues, hydroxylation and ADP-ribosylation, for instance, are described in most basic texts, such as, for instance, I. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1993. Many detailed reviews are available on this subject, such as, for example, those provided by Wold, F., in *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp 1-12, 1983; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 and Rattan et al., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992.

It will be appreciated, as is well known and as noted above, that polypeptides are not always entirely linear. For instance, polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be circular, with or without branching, generally as a result of posttranslational events, including natural processing events and events brought about by human manipulation which do not occur naturally. Circular, branched and branched circular polypeptides may be synthesized by non-translational natural

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-9-

processes and by entirely synthetic methods, as well.

Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. In fact, blockage of the amino or carboxyl group in a polypeptide, or both, by a covalent modification, is common in naturally occurring and synthetic polypeptides and such modifications may be present in polypeptides of the present invention, as well. For instance, the amino terminal residue of polypeptides made in *E. coli*, prior to proteolytic processing, almost invariably will be N-formylmethionine.

The modifications that occur in a polypeptide often will be a function of how it is made. For polypeptides made by expressing a cloned gene in a host, for instance, the nature and extent of the modifications in large part will be determined by the host cell posttranslational modification capacity and the modification signals present in the polypeptide amino acid sequence. For instance, as is well known, glycosylation often does not occur in bacterial hosts such as *E. coli*. Accordingly, when glycosylation is desired, a polypeptide should be expressed in a glycosylating host, generally a eukaryotic cell. Insect cells often carry out the same posttranslational glycosylations as mammalian cells and, for this reason, insect cell expression systems have been developed to efficiently express mammalian proteins having native patterns of glycosylation, *inter alia*. Similar considerations apply to other modifications.

It will be appreciated that the same type of modification may be present to the same or varying degree at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications.

In general, as used herein, the term polypeptide encompasses all such modifications, particularly those that are present in polypeptides synthesized by expressing a polynucleotide in a host cell.

"Polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein encompasses polynucleotides which include a sequence encoding a polypeptide of the present invention, particularly the PROST 03 polypeptide having the amino acid sequence set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2). The term encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, interrupted by introns) together with additional regions.

"Biological activity" refers to the structural, regulatory or biochemical functions of naturally occurring PROST 03 polypeptide.

"Immunologic activity" refers to the capability of the natural, recombinant or synthetic PROST 03, or any fragment thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies.

"Oligonucleotide(s)" refers to relatively short polynucleotides. Often the term refers to single-stranded deoxyribonucleotides, but it can refer as well to single- or double-stranded ribonucleotides,

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-10-

RNA:DNA hybrids and double-stranded DNAs, among others. Oligonucleotides, such as single-stranded DNA probe oligonucleotides, often are synthesized by chemical methods, such as those implemented on automated oligonucleotide synthesizers. However, oligonucleotides can be made by a variety of other methods, including *in vitro* recombinant DNA-mediated techniques and by expression of DNAs in cells and organisms. "Oligonucleotides" or "oligomers" or polynucleotide "fragment", "portion", or "segment" refers to a polynucleotide sequence of at least about 10 nucleotides and as many as about 60 nucleotides, preferably about 15 to 30 nucleotides, and more preferably about 20-25 nucleotides.

"Naturally occurring PROST 03" refers to PROST 03 produced by human cells that have not been genetically engineered and specifically contemplates various PROST 03 forms arising from post-translational modifications of the polypeptide including but not limited to acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, acylation, and cleavage.

"Variant(s)" of polynucleotides or polypeptides, as the term is used herein, are polynucleotides or polypeptides that differ from a reference polynucleotide or polypeptide, respectively. Variants in this sense are described below and elsewhere in the present disclosure in greater detail.

(1) A polynucleotide that differs in polynucleotide sequence from another, reference polynucleotide. Generally, differences are limited so that the polynucleotide sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical.

As noted below, changes in the polynucleotide sequence of the variant may be silent. That is, they may not alter the amino acids encoded by the polynucleotide. Where alterations are limited to silent changes of this type a variant will encode a polypeptide with the same amino acid sequence as the reference. Also as noted below, changes in the polynucleotide sequence of the variant may alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Such polynucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below.

(2) A polypeptide that differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions, fusions and truncations, which may be present in any combination. Recombinant variants encoding these same or similar polypeptides may be synthesized or selected by making use of the "redundancy" in the genetic code. Various codon substitutions, such as the silent changes which produce various restriction sites, may be introduced to optimize cloning into a plasmid or viral vector or expression in a particular prokaryotic or eukaryotic system. Mutations may also be introduced to modify the properties of the polypeptide, to change ligand-binding affinities, interchain affinities, or polypeptide degradation or turnover rate.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-11-

"Allelic variant" refers to an alternative form of the *prost 03* polynucleotide. Alleles result from a mutation, i.e., a change in the polynucleotide sequence, and generally produce altered mRNAs or polypeptides whose structure or function may or may not be altered. Any given gene may have none, one or many allelic forms. Common mutational changes which give rise to alleles are generally ascribed to natural deletions, additions or substitutions of nucleotides. Each of these types of changes may occur alone, or in combination with the others, or one or more times in a given sequence.

"Derivative" refers to polynucleotides or polypeptides derived from naturally occurring *prost 03* or PROST 03, respectively, by chemical modifications such as ubiquitination, labeling (e.g., with radionuclides, various enzymatic modifications), pegylation (derivatization with polyethylene glycol) or by insertion or substitution of amino acids such as ornithine (or substitution of the nucleotides which code for such as an amino acid), which do not normally occur in human proteins.

"Deletion" is defined as a change in either polynucleotide or amino acid sequences in which one or more polynucleotides or amino acid residues, respectively, are absent.

"Insertion" or "addition" is that change in a polynucleotide or amino acid sequence which has resulted in the addition of one or more polynucleotides or amino acid residues, respectively, as compared to the naturally occurring polynucleotide or amino acid sequence.

"Substitution" results from the replacement of one or more polynucleotides or amino acids by different polynucleotides or amino acids, respectively.

Preferably, amino acid substitutions are the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, or a threonine with a serine, i.e. conservative amino acid replacement. Insertions or deletions are typically in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be experimentally determined by systematically making insertions, deletions, or substitutions of amino acids in the polypeptide using recombinant DNA techniques and assaying the resulting recombinant variants for activity.

"Fragment" is a polypeptide having an amino acid sequence that entirely is the same as part but not all of the amino acid sequence of the aforementioned PROST 03 polypeptides and variants or derivatives thereof.

A polypeptide "fragment", "portion", or "segment" is a stretch of amino acid residues of at least about 5 amino acids, often at least about 7 amino acids, typically at least about 9 to 13 amino acids, and in various embodiments, at least about 17 or more amino acids.

"Recombinant" or "recombinant DNA molecule" refers to a polynucleotide sequence which is not naturally occurring, or is made by the artificial combination of two otherwise separated segments of sequence. By "recombinantly produced" is meant artificial combination often accomplished by either chemical synthesis means, or by the artificial manipulation of isolated segments of polynucleotides, e.g.,

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-12-

by genetic engineering techniques. Such manipulation is usually done to replace a codon with a redundant codon encoding the same or a conservative amino acid, while typically introducing or removing a sequence recognition site. Alternatively, it is performed to join together polynucleotide segments with desired functions to generate a single genetic entity comprising a desired combination of functions not found in the common natural forms. Restriction enzyme recognition sites, regulation sequences, control sequences, or other useful features may be incorporated by design. "Recombinant DNA molecules" include cloning and expression vectors. "Recombinant" may also refer to a polynucleotide which encodes a polypeptide and is prepared using recombinant DNA techniques.

"Isolated" means altered "by the hand of man" from its natural state; i.e., that, if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a naturally occurring polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living animal in its natural state is not "isolated", but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein. For example, with respect to polynucleotides, the term isolated means that it is separated from the chromosome and cell in which it naturally occurs. Polynucleotides and polypeptides may occur in a composition, such as media formulations, solutions for introduction of polynucleotides or polypeptides, for example, into cells, compositions or solutions for chemical or enzymatic reactions, for instance, which are not naturally occurring compositions, and, therein remain isolated polynucleotides or polypeptides within the meaning of that term as it is employed herein.

"Substantially pure" and "substantially homogenous" are used interchangeably and describe PROST 03 polypeptide, or fragments thereof, or a polynucleotide segment encoding same, where such polypeptide or polynucleotide is separated from components that naturally accompany it. A PROST 03 polypeptide or fragment thereof, or DNA segment encoding same is substantially free of naturally-associated components when it is separated from the native contaminants which accompany it in its natural state. Thus, a polypeptide that is chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the cell in which it naturally originates will be substantially free from its naturally-associated components. Similarly, a polynucleotide that is chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the cell in which it naturally originated will be substantially free from its naturally-associated components.

"Homologous", when used to describe a polynucleotide, indicates that two polynucleotides, or designated sequences thereof, when optimally aligned and compared, are identical, with appropriate nucleotide insertions or deletions, in at least 70% of the nucleotides, usually from about 75% to 99%, and more preferably at least about 98 to 99% of the nucleotides.

"Similarity", when used to describe a polypeptide, is determined by comparing the amino acid sequence and the conserved amino acid substitutes of one polypeptide to the sequence of a second

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-13-

polypeptide

"Polymerase chain reaction" or "PCR" refers to a procedure wherein specific pieces of DNA are amplified as described in U.S. Pat. No. 4,683,195, issued 28 July 1987. Generally, sequence information from the ends of the polypeptide fragment of interest or beyond needs to be available, such that oligonucleotide primers can be designed; these primers will point towards one another, and will be identical or similar in sequence to opposite strands of the template to be amplified. The 5' terminal nucleotides of the two primers will coincide with the ends of the amplified material. PCR can be used to amplify specific DNA sequences from total genomic DNA, cDNA transcribed from total cellular RNA, plasmid sequences, etc. (See generally Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263, 1987; Erlich, ed., *PCR Technology*, Stockton Press, NY, 1989).

"Stringency" typically occurs in a range from about  $T_m$  (melting temperature)-5°C (5° below the  $T_m$  of the probe) to about 20°C to 25°C below  $T_m$ . As will be understood by those of skill in the art, a stringent hybridization can be used to identify or detect identical polynucleotide sequences or to identify or detect similar or related polynucleotide sequences. As herein used, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences.

"Hybridization" as used herein, shall include "any process by which a polynucleotide strand joins with a complementary strand through base pairing" (Coombs, J., *Dictionary of Biotechnology*, Stockton Press, New York, N.Y., 1994).

"Therapeutically effective dose" refers to that amount of polypeptide or its antibodies, antagonists, or inhibitors, including antisense molecules and ribozymes, which ameliorate the symptoms or conditions of a disease state. Therapeutic efficacy and toxicity of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g.,  $ED_{50}$  (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and  $LD_{50}$  (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio between therapeutic and toxic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio,  $ED_{50}/LD_{50}$ .

"Treating" or "treatment" as used herein covers the treatment of a disease-state in a human patient, which disease-state is associated with prostate tumor growth.

#### Detailed Description of the Invention

The present invention relates to novel PROST 03 polypeptides, *prost 03* polynucleotides, and antibodies directed toward PROST 03 polypeptides, among other things, as described in greater detail below. In particular, the invention relates to novel PROST 03 polypeptides and the polynucleotides encoding these PROST 03 polypeptides, and relates especially to PROST 03 having the amino acid

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-14-

sequence set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and *prost 03* having the polynucleotide sequence set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 1). The present invention also encompasses PROST 03 variants. A preferred PROST 03 variant is one having at least 70% similarity (preferably at least 70% identity) to the polypeptide sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and more preferably at least 80% similarity (more preferably at least 90% identity) to the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and still more preferably at least 95% similarity (still more preferably at least 95% identity) to the polypeptide sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and also includes portions of such polypeptides with such portion of the polypeptide generally containing at least 10 amino acids and more preferably at least 50 amino acids.

The coding sequence for the predicted PROST 03 polypeptide begins 282 base pairs from the 5' end of the nucleotide sequence shown in Fig 1 (SEQ ID NO: 1). PROST 03 contains 12-13 transmembrane-spanner structural domains characteristic of membrane transport proteins of the MFS family.

The present invention is based in part on the structural similarity shown in Figure 3 between PROST 03 and a sucrose/H<sup>+</sup> symporter protein (DcSUT2).

The present invention is also based in part on the expression profile of PROST 03, as demonstrated by its expression in prostate tissue libraries and over-expression in prostate tumor libraries. This tissue profile is seen in analysis of mRNA expression in tissue samples from normal and tumor tissues by PCR-based Taqman analysis. This method of analysis demonstrated that mRNA encoding PROST 03 is over-expressed in prostate tissues as compared with other tissues.

#### Polynucleotides

In accordance with one aspect of the present invention, there are provided isolated polynucleotides that encode the PROST 03 polypeptide having the deduced amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

Using the information provided herein, such as the polynucleotide sequence set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 1), a polynucleotide of the present invention encoding a PROST 03 polypeptide may be obtained using standard cloning and screening procedures, such as those for cloning cDNAs using mRNA from cells of human tissue as starting material. Illustrative of the invention, the polynucleotide sequence in Figure 1 (SEQ ID NO: 1) was found in cDNA clones obtained from human prostate tissues. *Prost 03* was identified as a gene expressed in the prostate by mining Incyte's LifeSeq database. The nucleotide sequence was identified by searching the database for prostate tumor associated ESTs. The nucleotide sequence was found in the category of membrane transport molecules in the annotated database. Electronic Northern analysis of the distribution of *prost 03* polynucleotide sequences in the set of libraries revealed that *prost 03* mRNA was expressed at high levels in the prostate libraries and at

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-15-

lower levels in a number of other tissue libraries, including those from normal and tumor tissues.

Searching of the Incyte LifeSeq database gave rise to a cluster of cDNA clones which were obtained from Incyte for experimental use. Following the electronic assembly of *prost 03* clones into a contiguous polynucleotide sequence, and editing of the contiguous sequence, a partial coding sequence was identified in the predicted assembled polynucleotide. This sequence was missing the 5' end of the coding region.

Additional 5' sequence for *prost 03* was cloned from a human prostate cDNA library. This led to the identification of clones in the Incyte database that were predicted to contain the full-length coding region for PROST 03. The full-length polypeptide sequence was used to search the SWISS-PROT and SPTREMBL databases using the FastA program. The results of this search indicated that the PROST 03 sequence shows similarity to a set of transporters that has been previously identified in plants, in particular to a set of sucrose/proton transporters. In particular, similarity was found between PROST 03 and DcSUT2, a sucrose/H<sup>+</sup> symporter protein.

Incyte clones 3362030, 3458076 and 3352331 were obtained from Incyte for experimental work. These clones were fully sequenced and all contained the full coding sequence for the predicted PROST 03 protein. The sequence of clone 3352331 is shown in Figure 1 (SEQ ID NO: 1).

Polynucleotides of the present invention may be in the form of RNA, such as mRNA, or in the form of DNA, including, for instance, cDNA and genomic DNA obtained by cloning or produced by chemical synthetic techniques or by a combination thereof, or by methods described herein. The DNA may be double-stranded or single-stranded. Single-stranded DNA may be the coding strand, also known as the sense strand, or it may be the non-coding strand, also referred to as the anti-sense strand.

The sequence which encodes the polypeptide may be identical to the coding sequence of the polynucleotide shown in Figure 1 (SEQ ID NO: 1). It also may be a polynucleotide with a different sequence, which, as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, encodes the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

Polynucleotides of the present invention which encode the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) may include, but are not limited to, the coding sequence for the polypeptide itself; the coding sequence of the polypeptide, together with additional, non-coding sequences, including for example, but not limited to, introns and non-coding 5' and 3' sequences, such as the transcribed, non-translated sequences that play a role in transcription, mRNA processing (for example, splicing and polyadenylation signals) or additional coding sequences which code for additional amino acids, such as those which provide additional functionalities. Thus, for instance, the polypeptide may be fused to a marker sequence, such as a peptide, which facilitates purification of the fused polypeptide. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide,

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-16-

such as the tag provided in a pTrcHisB vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) among others, many of which are commercially available. As described in Gentz et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 821-824, 1989), for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein.

The polynucleotides may encode a polypeptide which is the polypeptide plus additional amino or carboxyl-terminal amino acids, or amino acids interior to the polypeptide (when the active form has more than one polypeptide chain, for instance). Such sequences may play a role in processing of a polypeptide from precursor to final form, may facilitate polypeptide trafficking, may prolong or shorten polypeptide half-life or may facilitate manipulation of a polypeptide for assay or production, among other things. As generally is the case *in situ*, the additional amino acids may be processed away from the polypeptide by proteolytic enzymes.

The present invention further relates to variants of the herein above described polynucleotides which encode for fragments, analogs and derivatives of the polypeptide having the deduced amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NO: 2). A variant of the polynucleotide may be a naturally occurring variant such as a naturally occurring allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Such non-naturally occurring variants of the polynucleotide may be made by mutagenesis techniques, including those applied to polynucleotides, cells or organisms.

Among variants in this regard are variants that differ from the aforementioned polynucleotides by polynucleotide substitutions, deletions or additions. The substitutions, deletions or additions may involve one or more polynucleotides. The variants may be altered in coding or non-coding regions or both. Alterations in the coding regions may produce conservative or non-conservative amino acid substitutions, deletions or additions.

Among the particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polynucleotides encoding polypeptides having the amino acid sequence of PROST 03 set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2); variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and fragments of the variants, analogs and derivatives.

Further particularly preferred in this regard are polynucleotides encoding PROST 03 variants, analogs, derivatives and fragments, and variants, analogs and derivatives of the fragments, which have the amino acid sequence of the PROST 03 polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, which do not alter the properties and activities of the PROST 03 polypeptide. Also especially preferred in this regard are conservative substitutions. Most highly preferred are polynucleotides encoding polypeptides having the amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) without substitutions.

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 70% identical to a polynucleotide encoding the PROST 03 polypeptide having the amino acid sequence set

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-17-

out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), and polynucleotides which are complementary to such polynucleotides. Alternatively, most highly preferred are polynucleotides that comprise a region that is at least 80% identical to a polynucleotide encoding the PROST 03 polypeptide and polynucleotides complementary thereto. In this regard, polynucleotides at least 90% identical to the same are particularly preferred, and among these particularly preferred polynucleotides, those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred among those with at least 95%, and among these, those with at least 98% and at least 99% are particularly highly preferred, with at least 99% being the more preferred.

Particularly preferred embodiments in this respect, moreover, are polynucleotides which encode polypeptides which retain substantially the same biological activity as the polypeptide encoded by the polynucleotide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO: 1).

The present invention further relates to polynucleotides that hybridize to the herein above-described sequences. In this regard, the present invention especially relates to polynucleotides which hybridize under stringent conditions to the herein above-described polynucleotides.

As discussed additionally herein regarding polynucleotide assays of the invention, for instance, polynucleotides of the invention as discussed above, may be used as a hybridization probes for cDNA and genomic DNA to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding PROST 03 and to isolate cDNA and genomic clones of other genes that have a high sequence similarity to the *prost 03* gene. Such probes generally will comprise at least 15 bases. Preferably, such probes will have at least 30 bases and may have at least 50 bases.

For example, the coding region of the *prost 03* gene may be isolated by screening libraries using synthetic oligonucleotide probes that have been designed using the known DNA sequence. For example, a labeled oligonucleotide having a sequence complementary to that of a polynucleotide of the present invention can be used to screen a library of cDNA or genomic DNA to identify clones that hybridize to the probe.

In sum, a polynucleotide of the present invention may encode a polypeptide, a polypeptide plus a leader sequence (which may be referred to as a prepolypeptide).

It will be appreciated that the invention also relates to, among others, polynucleotides encoding the polypeptide fragments, polynucleotides that hybridize to polynucleotides encoding polypeptide fragments, particularly those that hybridize under stringent conditions, and polynucleotides, such as PCR primers, for amplifying polynucleotides that encode polypeptide fragments. In these regards, preferred polynucleotides are those that correspond to preferred polypeptide fragments, as discussed below.

#### Polypeptides

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-18-

The present invention further relates to a PROST 03 polypeptide which has the deduced amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

The invention also relates to fragments, analogs and derivatives of these polypeptides. The terms fragment, derivative and analog when referring to the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) means a polypeptide which retains essentially the same biological activity as such a polypeptide.

The polypeptide of the present invention may be a recombinant polypeptide, a natural polypeptide or a synthetic polypeptide. In certain preferred embodiments, it is a recombinant polypeptide.

The fragment, derivative or analog of the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code, or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group, or (iii) one in which the polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (for example, polyethylene glycol) or (iv) one in which the additional amino acids are fused to the polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the polypeptide. Such fragments, derivatives and analogs are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

Among the particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polypeptides having the amino acid sequence of PROST 03 set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and variants, analogs and derivatives of the fragments.

Among preferred variants are those that vary from a reference by conservative amino acid substitutions. Such substitutions are those that substitute a given amino acid in a polypeptide by another amino acid of like characteristics. Typically seen as conservative substitutions are the replacements, one for another, among the aliphatic amino acids Ala, Val, Leu and Ile, interchange of the hydroxyl residues Ser and Thr, exchange of the acidic residues Asp and Glu, substitution between the amide residues Asn and Gln, exchange of the basic residues Lys and Arg and replacements among the aromatic residues Phe and Tyr.

Further particularly preferred in this regard are variants, analogs, derivatives and fragments, and variants, analogs and derivatives of the fragments, having the amino acid sequence of the PROST 03 polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, which do not alter the properties and activities of the PROST 03 polypeptide. Also especially preferred in this regard are conservative substitutions. Most highly preferred are polypeptides having the amino acid sequence of Figure 2

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-19-

(SEQ ID NO: 2) without substitutions.

The polypeptides of the present invention also include the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) as well as polypeptides which have at least 70% similarity (preferably at least 70% identity) to the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and more preferably at least 80% similarity (more preferably at least 90% identity) to the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and still more preferably at least 95% similarity (still more preferably at least 95% identity) to the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and also include portions of such polypeptides with such portion of the polypeptide generally containing at least 10 amino acids and more preferably at least 50 amino acids.

As known in the art "similarity" between two polypeptides is determined by comparing the amino acid sequence and its conserved amino acid substitutes of one polypeptide to the sequence of a second polypeptide.

Fragments or portions of the polypeptides of the present invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptides by peptide synthesis; therefore, the fragments may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides.

#### Fragments

Also among preferred embodiments of this aspect of the present invention are polypeptides comprising fragments of PROST 03, most particularly fragments of the PROST 03 of Figure 2 (SEQ ID NO: 2), and fragments of variants and derivatives of the PROST 03 of Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

In this regard a fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that entirely is the same as part but not all of the amino acid sequence of the aforementioned PROST 03 polypeptides and variants or derivatives thereof.

Such fragments may be "free-standing," i.e., not part of or fused to other amino acids or polypeptides, or they may be comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region. When comprised within a larger polypeptide, the presently discussed fragments most preferably form a single continuous region. However, several fragments may be comprised within a single larger polypeptide. For instance, certain preferred embodiments relate to a fragment of a PROST 03 polypeptide of the present invention comprised within a precursor polypeptide designed for expression in a host and having heterologous pre- and propolypeptide regions fused to the amino terminus of the PROST 03 fragment and an additional region fused to the carboxyl terminus of the fragment. Therefore, fragments in one aspect of the meaning intended herein, refers to the portion or portions of a fusion polypeptide or fusion protein derived from PROST 03.

As representative examples of polypeptide fragments of the invention, there may be mentioned those which have from about 10 to about 553 amino acids.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-20-

In this context "about" includes the particularly recited range and ranges larger or smaller by several, a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid at either extreme or at both extremes. For instance, about 553 amino acids in this context means a polypeptide fragment of 10 plus or minus several, a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acids to 553 plus or minus several a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid residues, i.e., ranges as broad as 10 minus several amino acids to 553 plus several amino acids to as narrow as 10 plus several amino acids to 553 minus several amino acids.

Highly preferred in this regard are the recited ranges plus or minus as many as 5 amino acids at either or at both extremes. Particularly highly preferred are the recited ranges plus or minus as many as 3 amino acids at either or at both the recited extremes. Especially particularly highly preferred are ranges plus or minus 1 amino acid at either or at both extremes or the recited ranges with no additions or deletions. Most highly preferred of all in this regard are fragments from about 10 to about 553 amino acids.

Among especially preferred fragments of the invention are truncation mutants of PROST 03. Truncation mutants of PROST 03 include variants or derivatives of the sequence of Figure 2 (SEQ ID NO: 2), except for deletion of a continuous series of residues (that is, a continuous region, part or portion) that includes the amino terminus of the sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), or a continuous series of residues that includes the carboxyl terminus or, as in double truncation mutants, deletion of two continuous series of residues, one including the amino terminus and one including the carboxyl terminus. Fragments having the size ranges set out above also are preferred embodiments of truncation fragments, which are especially preferred among fragments generally.

Especially preferred in this aspect of the invention are fragments characterized by biological and/or immunological attributes of PROST 03. Such fragments include those containing the predicted loop domains and amino and carboxy terminal domains, which include those fragments used to generate antibodies, as described in Example 4.

Certain preferred regions in these regards are set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), and include, but are not limited to, regions of the aforementioned types identified by analysis of the amino acid sequence set out in Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

Further preferred regions are those that mediate activities of PROST 03. Most highly preferred in this regard are fragments that have a chemical, biological or other activity of PROST 03, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Highly preferred in this regard are fragments that contain regions that are homologs in sequence, or in position, or in both sequence and position to active regions of related polypeptides, such as the other proteins of the MFS family, which includes PROST 03.

Vectors, host cells, and expression systems

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-21-

The present invention also relates to vectors which include polynucleotides of the present invention, host cells which are genetically engineered with vectors of the invention and the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Such techniques are described in Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 and Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

Host cells can be genetically engineered to incorporate polynucleotides and express polypeptides of the present invention. For instance, polynucleotides may be introduced into host cells using well known techniques of infection, transduction, transfection, transvection and transformation. The polynucleotides may be introduced alone or with other polynucleotides. Such other polynucleotides may be introduced independently, co-introduced or introduced joined to the polynucleotides of the invention.

Thus, for instance, polynucleotides of the invention may be transfected into host cells with another, separate, polynucleotide encoding a selectable marker, using standard techniques for co-transfection and selection in, for instance, mammalian cells. In this case, the polynucleotides generally will be stably incorporated into the host cell genome.

Alternatively, the polynucleotides may be joined to a vector containing a selectable marker for propagation in a host. The vector construct may be introduced into host cells by the aforementioned techniques. Generally, a plasmid vector is introduced as DNA in a precipitate, such as a calcium phosphate precipitate, or in a complex with a charged lipid. Electroporation also may be used to introduce polynucleotides into a host. If the vector is a virus, it may be packaged *in vitro* or introduced into a packaging cell and the packaged virus may be transduced into cells. A wide variety of techniques suitable for making polynucleotides and for introducing polynucleotides into cells in accordance with this aspect of the invention are well known and routine to those of skill in the art. Such techniques are reviewed at length in Sambrook et al. cited above, which is illustrative of the many laboratory manuals that detail these techniques. In accordance with this aspect of the invention, the vector may be, for example, a plasmid vector, a single or double-stranded phage vector, a single or double-stranded RNA or DNA viral vector. Such vectors may be introduced into cells as polynucleotides, preferably DNA, by well known techniques for introducing DNA and RNA into cells. The vectors, in the case of phage and viral vectors, also may be and preferably are introduced into cells as packaged or encapsidated virus by well known techniques for infection and transduction. Viral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case viral propagation generally will occur only in complementing host cells.

Preferred among vectors, in certain respects, are those for expression of polynucleotides and polypeptides of the present invention. Generally, such vectors comprise cis-acting control regions

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-22-

effective for expression in a host operatively linked to the polynucleotide to be expressed. Appropriate trans-acting factors either are supplied by the host, supplied by a complementing vector or supplied by the vector itself upon introduction into the host.

In certain preferred embodiments in this regard, the vectors provide for specific expression. Such specific expression may be inducible expression or expression only in certain types of cells or both inducible and cell-specific. Particularly preferred among inducible vectors are vectors that can be induced for expression by environmental factors that are easy to manipulate, such as temperature and nutrient additives. A variety of vectors suitable to this aspect of the invention, including constitutive and inducible expression vectors for use in prokaryotic and eukaryotic hosts, are well known and employed routinely by those of skill in the art.

The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media, which may be modified as appropriate for, *inter alia*, activating promoters, selecting transformants or amplifying genes. Culture conditions, such as temperature, pH and the like, previously used with the host cell selected for expression generally will be suitable for expression of polypeptides of the present invention as will be apparent to those of skill in the art.

A great variety of expression vectors can be used to express a polypeptide of the invention. Such vectors include chromosomal, episomal and virus-derived vectors e.g., vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from yeast episomes, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses, retroviruses, and alphaviruses such as Sindbis virus, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements such as cosmids and phagemids, all may be used for expression in accordance with this aspect of the present invention. Generally, any vector suitable to maintain, propagate or express polynucleotides to express a polypeptide in a host may be used for expression in this regard.

The appropriate DNA sequence may be inserted into the vector by any of a variety of well-known and routine techniques. In general, a DNA sequence for expression is joined to an expression vector by cleaving the DNA sequence and the expression vector with one or more restriction endonucleases and then joining the restriction fragments together using T4 DNA ligase. Procedures for restriction and ligation that can be used to this end are well known and routine to those of skill. Suitable procedures in this regard, and for constructing expression vectors using alternative techniques, which also are well known and routine to those of skill, are set forth in great detail in Sambrook et al. cited elsewhere herein.

The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to appropriate expression control sequence(s), including, for instance, a promoter to direct mRNA transcription. Representatives of such promoters include the phage lambda PL promoter, the *E. coli* lac, trp, tac, and trc promoters,

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-23-

the SV40 early and late promoters, the human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter, and promoters of retroviral LTRs, to name just a few. It will be understood that numerous promoters not mentioned are suitable for use in this aspect of the invention, are well known and may readily be employed by those of skill in the manner illustrated by the discussion and the examples herein.

In general, expression constructs will contain sites for transcription initiation and termination, and, in the transcribed region, a ribosome binding site for translation. The coding portion of the transcripts expressed by the constructs will include a translation initiating AUG at the beginning and a termination codon appropriately positioned at the end of the polypeptide to be translated.

In addition, the constructs may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, in accordance with many commonly practiced procedures, such regions will operate by controlling transcription, such as repressor binding sites and enhancers, among others.

Vectors for propagation and expression generally will include selectable markers. Such markers also may be suitable for amplification or the vectors may contain additional markers for this purpose. In this regard, the expression vectors preferably contain one or more selectable marker genes to provide a phenotypic trait for selection of transformed host cells. Preferred markers include dihydrofolate reductase, neomycin, puromycin, or hygromycin resistance for eukaryotic cell culture, and tetracycline, theomycin, kanamycin or ampicillin resistance genes for culturing *E. coli* and other bacteria.

The vector containing the appropriate DNA sequence as described elsewhere herein, as well as an appropriate promoter, and other appropriate control sequences, may be introduced into an appropriate host using a variety of well known techniques suitable to expression therein of a desired polypeptide. Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces* and *Salmonella typhimurium* cells; fungal cells, such as yeast cells; insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS and Bowes melanoma cells; and plant cells, preferably insect cells BTI-TN-5B1-4. Hosts for a great variety of expression constructs are well known, and those of skill will be enabled by the present disclosure readily to select a host for expressing a polypeptides in accordance with this aspect of the present invention.

Various mammalian cell culture systems can be employed for expression, as well. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblast (Gluzman et al., *Cell* 23: 175, 1991). Other cell lines capable of expressing a compatible vector include for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa, human kidney 293 and BHK cell lines. In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the polynucleotide sequence coding for PROST 03 may be ligated into an adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a nonessential E1 or E3 region of the viral genome will result in a viable virus capable of expressing PROST 03 in infected host cells (Logan and Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-24-

81:3655-59, 1984). In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, may be used to increase expression in mammalian host cells.

More particularly, the present invention also includes recombinant constructs, such as expression constructs, comprising one or more of the sequences described above. The constructs comprise a vector, such as a plasmid or viral vector, into which such a sequence of the invention has been inserted. The sequence may be inserted in a forward or reverse orientation. In certain preferred embodiments in this regard, the construct further comprises regulatory sequences, including, for example, a promoter, operably linked to the sequence. Large numbers of suitable vectors and promoters are known to those of skill in the art, and there are many commercially available vectors suitable for use in the present invention.

The following vectors, which are commercially available, are provided by way of example. Among vectors preferred for use in bacteria are pQE70, pQE60 and pQE-9, available from Qiagen USA (Valencia, CA); pBS vectors, Phagescript® vectors, Bluescript® vectors, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, available from Stratagene (LaJolla, CA); and ptrc99a, pK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 available from Pharmacia Biotech (Piscataway, N.J.). Among preferred eukaryotic vectors are pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXT1 and pSG available from Stratagene; and PSVK3, pBPV, pMSG and pSVL available from Pharmacia Biotech. Most preferred is the pCIneo vector available from Promega. These vectors are listed solely by way of illustration of the many commercially available and well known vectors that are available to those of skill in the art for use in accordance with this aspect of the present invention. It will be appreciated that any other plasmid or vector suitable for, for example, introduction, maintenance, propagation or expression of a polynucleotide or polypeptide of the invention in a host may be used in this aspect of the invention.

Promoter regions can be selected from any desired gene using vectors that contain a reporter transcription unit lacking a promoter region, such as a chloramphenicol acetyl transferase ("cat") transcription unit, downstream of restriction site or sites for introducing a candidate promoter fragment; i.e., a fragment that may contain a promoter. As is well known, introduction into the vector of a promoter-containing fragment at the restriction site upstream of the cat gene engenders production of CAT activity, which can be detected by standard CAT assays. Vectors suitable to this end are well known and readily available. Two such vectors are pKK232-B and pCM7. Thus, promoters for expression of polynucleotides of the present invention include not only well known and readily available promoters, but also promoters that readily may be obtained by the foregoing technique, using a reporter gene.

Among known bacterial promoters suitable for expression of polynucleotides and polypeptides in accordance with the present invention are the *E. coli* lacI and lacZ promoters, the T3 and T7 promoters, the T5 tac promoter, the lambda PR, PL promoters, the trp promoter, and the trc hybrid

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-25-

promoter, which is derived from the trp and lac promoters. Among known eukaryotic promoters suitable in this regard are the CMV immediate early promoter, the HSV thymidine kinase promoter, the early and late SV40 promoters, the promoters of retroviral LTRs, such as those of the Rous sarcoma virus ("RSV") and metallothionein promoters, such as the mouse metallothionein-I promoter.

Selection of appropriate vectors and promoters for expression in a host cell is a well known procedure and the requisite techniques for expression vector construction, introduction of the vector into the host and expression in the host are routine skills in the art.

Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication, a promoter derived from a highly-expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence, and a selectable marker to permit isolation of vector containing cells after exposure to the vector.

The present invention also relates to host cells containing the above-described constructs discussed above. The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell, or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. Constructs in host cells can be used in a conventional manner to produce the gene product encoded by the recombinant sequence.

Polypeptides can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention. Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook et al., cited elsewhere herein.

Transcription of the DNA encoding the polypeptides of the present invention by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp that act to increase transcriptional activity of a promoter in a given host cell-type. Examples of enhancers include the SV40 enhancer, which is located on the late side of the replication origin at bp 100 to 270, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers.

Polynucleotides of the invention, encoding the heterologous structural sequence of a polypeptide of the invention generally will be inserted into the vector using standard techniques so that it is operably linked to the promoter for expression. The polynucleotide will be positioned so that the transcription start site is located appropriately 5' to a ribosome binding site. The ribosome binding site will be 5' to the AUG that initiates translation of the polypeptide to be expressed. Generally, there will be no other open reading frames that begin with an initiation codon, usually AUG, and lie between the ribosome binding site and the initiating AUG. Also, generally, there will be a translation stop codon at the end of the polypeptide and there will be a polyadenylation signal and a transcription termination signal appropriately disposed at the 3' end of the transcribed region.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-26-

For secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, into the periplasmic space or into the extracellular environment, appropriate secretion signals may be incorporated into the expressed polypeptide. The signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals. The polypeptide may be expressed in a modified form, such as a fusion protein, and may include not only secretion signals but also additional heterologous functional regions. Thus for instance, a region of additional amino acids, particularly charged amino acids, may be added to the N-terminus of the polypeptide to improve stability and persistence in the host cell, during purification or during subsequent handling and storage. Also, special regions also may be added to the polypeptide to facilitate purification. Such regions may be removed prior to final preparation of the polypeptide. The addition of peptide moieties to polypeptides to engender secretion or excretion, to improve stability and to facilitate purification, among others, are familiar and routine techniques in the art. For example, when large quantities of PROST 03 are needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited to, the multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as Bluescript® (Stratagene), in which the *prost 03* coding sequence may be ligated into the vector in frame with sequence for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of  $\beta$ -galactosidase so that a hybrid protein is produced; pIN vectors (Van Heede and Shuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509, 1989) and the like. PTcrHis vectors (Invitrogen, Carlsbad, CA) may be used to express foreign polypeptides as fusion proteins containing a polyhistidine (6xHis) tag for rapid purification. Proteins made in such systems are designed to include cleavage sites, such as an enterokinase cleavage site, so that the cloned polypeptide of interest can be released from the fusion peptide moiety at will.

Following transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, inducible promoters, if present, can be induced by appropriate means (e.g., temperature shift or exposure to chemical inducer) and cells cultured for an additional period.

Cells typically then are harvested by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification.

Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents, such methods are well known to those skilled in the art.

The PROST 03 polypeptide can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography ("HPLC") is employed for purification. Well known techniques for refolding protein may be employed to regenerate active conformation when the

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-27-

polypeptide is denatured during isolation and or purification. Various other methods of protein purification well known in the art include those described in Deutscher, M., *Methods in Enzymology*, Vol 182, Academic Press, San Diego, 1982; and Scopes, R., *Protein Purification: Principles and Practice* Springer-Verlag, New York, 1982.

Alternatively, the polypeptides of the present invention can be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Merrifield, J., *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963). *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City, Calif) in accordance with the instructions provided by the manufacturer. Various fragments of PROST 03 may be chemically synthesized separately and combined using chemical methods to produce the full length molecule.

Polypeptides of the present invention include naturally purified products, products of chemical synthetic procedures, and products produced by recombinant techniques from a prokaryotic or eukaryotic host, including, for example, bacterial, yeast, higher plant, insect and mammalian cells. Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated or may be non-glycosylated. In addition, polypeptides of the invention may also include an initial modified methionine residue, in some cases as a result of host-mediated processes.

#### Uses of PROST 03 polypeptides and the polynucleotides which encode them

PROST 03 polynucleotides and PROST 03 polypeptides may be used in accordance with the present invention for a variety of applications, particularly those that make use of the chemical and biological properties of PROST 03. Additional applications relate to diagnosis and to treatment of diseases of cell proliferation, such as prostate cancer. These aspects of the invention are illustrated further by the following discussion and are described further within the body of the specification.

The rationale for the use of the polynucleotide and polypeptide sequences of the present invention is based on the preferential expression of PROST 03 in prostate tissues as compared with other tissues and on the chemical and structural similarity between the PROST 03 disclosed herein and sugar porter molecules, which suggest that PROST 03 is a cell-surface protein. PROST 03 and molecules related to PROST 03 may be used in the diagnosis and treatment of conditions, disorders or diseases associated with inappropriate growth of prostate tissue. These would include, but are not limited to, cancer and metastatic tumor growth in prostate as well as other tumor tissues.

PROST 03 polynucleotide sequences can be used as DNA probes, and as targets for antisense and ribozyme therapy, or as templates for the production of antisense polynucleotides.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-28-

PROST 03 polypeptides can be used to generate antibodies to PROST 03 which may be useful in detecting the levels of PROST 03 polypeptide in cells and tissues and in targeting drugs to primary and metastatic tumors.

PROST 03 polypeptides may be used to stimulate an immune response to PROST 03 containing cells.

Polynucleotides encoding PROST 03 may be useful in diagnostic assays for detecting the levels of polynucleotides encoding PROST 03 in cells and tissues.

In conditions associated with expression of PROST 03, such as prostate cancer, it may be advantageous to suppress expression or activity of PROST 03 for therapeutic gain. PROST 03 expression could be suppressed by administration of antisense oligonucleotides or ribozymes. Furthermore, antibodies that bind to PROST 03 polypeptides and effect PROST 03 activity can be administered to treat diseases or conditions associated with PROST 03 activity. In addition, small molecule agonists and antagonists may be administered to effect PROST 03 activity.

#### Polynucleotide assays

This invention is also related to the use of the *prost 03*-related polynucleotides to detect complementary polynucleotides such as, for example, as a diagnostic reagent. Detection of *prost 03* polynucleotides associated with a disease state will provide a tool for the development of *in vitro* and *in vivo* diagnostics that can add or define a diagnosis of a disease or susceptibility to a disease which results from tissue specific expression of PROST 03.

Individuals carrying mutations in the gene encoding PROST 03 may be detected at the DNA level by a variety of techniques. Polynucleotide samples for diagnosis may be obtained from a patient's cells, such as from blood, urine, saliva, tissue biopsy and autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR prior to analysis (Saiki et al., *Nature*, 324: 163-166, 1986). RNA or cDNA may also be used in the same ways. As an example, PCR primers complementary to the polynucleotide sequence encoding PROST 03 can be used to identify and analyze *prost 03* expression and mutations. For example, deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to radiolabeled *prost 03* RNA or alternatively, radiolabeled *prost 03* antisense DNA sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase A digestion or by differences in melting temperatures.

Sequence differences between a reference gene and genes having mutations also may be revealed by direct DNA sequencing. In addition, cloned DNA segments may be employed as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of such methods can be greatly enhanced by appropriate use of PCR or another amplification method. For example, a sequencing primer is used with double-

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-29-

stranded PCR product or a single-stranded template molecule generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures with radiolabeled polynucleotide or by automatic sequencing procedures with fluorescent tags.

Genetic testing based on DNA sequence differences may be achieved by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences may be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures (see, e.g., Myers et al., *Science*, 230: 1242, 1985).

Sequence changes at specific locations also may be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method (e.g., Catton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:4397-4401, 1985).

Thus, the detection of a specific DNA sequence may be achieved by methods such as hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing or the use of restriction enzymes, (e.g., restriction fragment length polymorphisms ("RFLP") and Southern blotting of genomic DNA).

In addition to more conventional gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations also can be detected by *in situ* analysis.

#### Polypeptide assays

The present invention also relates to diagnostic assays such as quantitative and diagnostic assays for detecting levels of PROST 03 polypeptide in cells and tissues and body fluids, including determination of normal and abnormal levels. Thus, for instance, a diagnostic assay in accordance with the invention for detecting over-expression of PROST 03 polypeptide compared to normal control tissue samples may be used to detect the presence of neoplasia, for example, prostate cancer. Such diagnostic tests may be used to detect metastatic tumor growth, as well. Assay techniques that can be used to determine levels of a polypeptide, such as a PROST 03 polypeptide of the present invention, in a sample derived from a host are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays (RIA), competitive-binding assays, western Blot analysis and enzyme-linked immunoabsorbant assays (ELISA), and fluorescent activated cell sorting (FACS). Among these ELISAs frequently are preferred. An ELISA assay initially comprises preparing an antibody specific to PROST 03, preferably a monoclonal antibody. In addition a reporter antibody generally is prepared which binds to the monoclonal antibody. The reporter antibody is attached to a detectable reagent such as a radioactive, fluorescent or enzymatic reagent, in this example horseradish peroxidase enzyme.

To carry out an ELISA a sample is removed from a host and incubated on a solid support, e.g. a

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-30-

polystyrene dish, that binds the polypeptides in the sample. Any free polypeptide binding sites on the dish are then covered by incubating with a non-specific protein such as bovine serum albumin. Next, the monoclonal antibody is incubated in the dish during which time the monoclonal antibodies attach to any PROST 03 polypeptides attached to the polystyrene dish. Unbound monoclonal antibody is washed out with buffer. The reporter antibody linked to horseradish peroxidase is placed in the dish resulting in binding of the reporter antibody to any monoclonal antibody bound to PROST 03. Unattached reporter antibody is then washed out. Reagents for peroxidase activity, including a colorimetric substrate are then added to the dish. Immobilized peroxidase, linked to PROST 03 through the primary and secondary antibodies, produces a colored reaction product. The amount of color developed in a given time period indicates the amount of PROST 03 polypeptide present in the sample. Quantitative results typically are obtained by reference to a standard curve.

These and other assays are described, among other places, in Hampton et al. (*Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, Minn, 1990) and Maddox et al. (*J. Exp. Med.* 158:12111, 1983).

#### Antibodies

The invention further relates to antibodies that specifically bind to PROST 03, herein referred to as PROST 03 antibodies. PROST 03 expression is highly restricted to prostate tissues, both tumor and normal. In addition, PROST 03 expression is strong in prostatic carcinoma metastatic to bone and lymph node. These features combined with its potential cell surface location represent characteristics of an excellent marker for screening, diagnosis, prognosis, follow-up assays and imaging methods. In addition, these characteristics indicate that PROST 03 may be an excellent target for therapeutic methods such as targeted antibody therapy, immunotherapy, and gene therapy. As used herein, the term "specifically binds to" refers to the interaction of an antibody and a polypeptide, in which the interaction is dependent upon the presence of a particular structure (i.e., the antigenic determinant or epitope) on the polypeptide; in other words, the antibody is recognizing and binding to a specific polypeptide structure rather than to proteins in general.

The PROST 03 polypeptides, their fragments or other derivatives, or analogs thereof, or cells or cell membranes containing them can be used as an immunogen to produce antibodies thereto (Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). In addition, a PROST 03 encoding nucleic acid molecule and recombinant vectors capable of expressing PROST 03 can be used as immunogens to produce antibodies (Gurunathan et al., *Ann. Rev. Immunol.* 18:927-74, 2000; Shedlock and Weiner, *J. Leukoc. Biol.* 68:793-806, 2000). These antibodies can be, for example, polyclonal or monoclonal antibodies. The present invention also includes chimeric, single chain, humanized, and human antibodies, as well as Fab fragments, or the product of a Fab expression library. Various procedures

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-31-

known in the art may be used for the production of such antibodies and fragments.

Antibodies generated against the polypeptides corresponding to a sequence of the present invention can be obtained by direct injection of the polypeptides into an animal or by administering the polypeptides to an animal, preferably a nonhuman. The antibody so obtained will then bind the polypeptides itself. In this manner even a sequence encoding only a fragment of the polypeptides can be used to generate antibodies binding the native polypeptides. Such antibodies can then be used to isolate the polypeptide from tissue expressing that polypeptide.

For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include the hybridoma technique (Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-497, 1975), the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72, 1983) and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer*, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, 1984; Neuberger et al., *Nature* 312:604-608, 1984; Takeda et al., *Nature* 314:452-454, 1985). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778) can be adapted to produce PROST 03-specific single chain antibodies.

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837, 1989) and Winter and Milstein (*Nature* 349:293-299, 1991).

Antibody fragments which contain specific binding sites for PROST 03 may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to the F(ab')<sub>2</sub> fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')<sub>2</sub> fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse et al., *Science* 256:1270-1281, 1989).

The amino acid sequence of PROST 03 presented herein may be used to select specific regions of the PROST 03 polypeptide for generating antibodies. As will be understood by those skilled in the art, the regions or epitopes of a PROST 03 polypeptide to which an antibody is directed may vary with the intended application. For example, antibodies intended for use in an immunoassay for the detection of membrane-bound PROST 03 on prostate cells should be directed toward accessible epitopes on the PROST 03 polypeptide. Regions of the PROST 03 polypeptide that show immunogenic structure, as well as other regions and domains, can readily be identified using various other methods known in the art, such

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-32-

as Chou-Fasman, Garnier-Robson, or Jameson-Wolf analysis. Fragments containing these residues are particularly suited in generating anti-PROST 03 antibodies. Particularly useful fragments include, but are not limited to, the sequences VPPLLEVGVEEK (SEQ ID NO: 18), YDFVGEGLYQGVPRAE (SEQ ID NO: 19), EPGTEARRHYDEGVRM (SEQ ID NO: 20), EKQVFLPKYRGDTGGASEDSLMTSF (SEQ ID NO: 21), PTEPAEGLSAPSLSPH (SEQ ID NO: 26), LAGLLCPDPRPLE (SEQ ID NO: 22), IDWDTALAPYLGTQEE (SEQ ID NO: 23), DKSDLAKYSA (SEQ ID NO: 24), and DFVGEGLYQGVPRAE (SEQ ID NO: 25). Generation of polyclonal antibodies to these regions is described in Example 4.

PROST 03 antibodies of the invention may be particularly useful in diagnostic assays, imaging methodologies, and therapeutic methods for the management of prostate cancer. The invention provides various immunological assays useful for the detection of PROST 03 polypeptides and for the diagnosis of prostate cancer. Such assays generally comprise one or more PROST 03 antibodies capable of recognizing and binding a PROST 03 polypeptide. The most preferred antibodies will selectively bind to PROST 03 and will not bind (or bind weakly) to non-PROST 03 polypeptides. The assays include various immunological assay formats well known in the art, including but not limited to various types of radioimmunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays, and the like. In addition, immunological imaging methods capable of detecting prostate cancer are also provided by the invention, including but not limited to radioscintigraphic imaging methods using labeled PROST 03 antibodies. Such assays may be clinically useful in the detection, monitoring and prognosis of prostate cancer.

The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing the polypeptide or to purify the polypeptide of the present invention by attachment of the antibody to a solid support for isolation and/or purification by affinity chromatography.

Additionally, PROST 03 antibodies may be used to isolate PROST 03 positive cells using cell sorting and purification techniques. In particular, PROST 03 antibodies may be used to isolate prostate cancer cells from xenograft tumor tissue, from cells in culture, etc. using antibody-based cell sorting or affinity purification techniques. Other uses of the PROST 03 antibodies of the invention include generating anti-idiotypic antibodies that mimic the PROST 03 polypeptide.

The PROST 03 antibodies can be used for detecting the presence of prostate cancer or tumor metastasis. The presence of such PROST 03-containing cells within various biological samples, including serum, prostate and other tissue biopsy specimens, may be detected with PROST 03 antibodies. In addition, PROST 03 antibodies may be used in various imaging methodologies such as immunoscintigraphy with Tc-99m (or other isotope) conjugated antibody. For example, an imaging protocol similar to the one recently described using an In-111 conjugated anti-PSMA antibody may be used to detect recurrent and metastatic prostate carcinomas (Sodee et al., *Clin. Nuc. Med.* 21: 759-

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-33-

766, 1997).

The PROST 03 antibodies of the invention may be labeled with a detectable marker or conjugated to a second molecule, such as a cytotoxic agent, and used for targeting the second molecule to a PROST 03 positive cell (Vitetta, E.S. et al., *Immunotoxin Therapy*, in DeVita, Jr, V.T. et al., eds, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 4<sup>th</sup> ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636, 1993). Examples of cytotoxic agents include, but are not limited to ricin, doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethidium bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin(PE) A, PE40, abrin, and glucocorticoid and other chemotherapeutic agents, as well as radioisotopes. Suitable detectable markers include, but are not limited to, a radioisotope, a fluorescent compound, a bioluminescent compound, chemiluminescent compound, a metal chelator or an enzyme. Suitable radioisotopes include the following: Antimony-124, Antimony-125, Arsenic-74, Barium-103, Barium-140, Beryllium-7, Bismuth-206, Bismuth-207, Cadmium-109, Cadmium-115m, Calcium-45, Cerium-139, Cerium-141, Cerium-144, Cesium-137, Chromium-51, Cobalt-56, Cobalt-57, Cobalt-58, Cobalt-60, Cobalt-64, Erbium-169, Europium-152, Gadolinium-153, Gold-195, Gold-199, Hafnium-175, Hafnium-181, Indium-111, Iodine-123, Iodine-131, Iridium-192, Iron-55, Iron-59, Krypton-85, Lead-210, Manganese-54, Mercury-197, Mercury-203, Molybdenum-99, Neodymium-147, Neptunium-237, Nickel-63, Niobium-95, Osmium-185+191, Palladium-103, Platinum-195m, Praseodymium-143, Promethium-147, Protactinium-233, Radium-2226, Rhenium-186, Rubidium-86, Ruthenium-103, Ruthenium-106, Scandium-44, Scandium-46, Selenium-75, Silver-110m, Silver-111, Sodium-22, Strontium-85, Strontium-89, Strontium-90, Sulfur-35, Tantalum-182, Technetium-99m, Tellurium-125, Tellurium-132, Thallium-204, Thorium-228, Thulium-232, Thallium-170, Tin-113, Titanium-44, Tungsten-185, Vanadium-48, Vanadium-49, Ytterbium-169, Yttrium-88, Yttrium-90, Yttrium-91, Zinc-65, and Zirconium-95.

#### Immunotherapy for Prostate Cancer

The invention provides various immunotherapeutic methods for treating prostate cancer, including antibody therapy, *in vivo* vaccines, and *ex vivo* immunotherapy approaches. In one approach, the invention provides PROST 03 antibodies which may be used systemically to treat prostate cancer. For example, unconjugated PROST 03 antibodies may be introduced into a patient such that the antibody binds to PROST 03 on, in or associated with prostate cancer cells and mediates the destruction of the cells, and the tumor, by mechanisms which may include complement-mediated cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, altering the physiologic function of PROST 03, and/or the inhibition of ligand binding or signal transduction pathways. PROST 03 antibodies conjugated to toxic agents such as ricin or radioisotopes may also be used therapeutically to deliver the toxic agent directly to PROST 03-bearing prostate tumor cells (either on the surface or through internalization of the

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-34-

conjugated antibodies) and thereby destroy the tumor cells.

Prostate cancer immunotherapy using PROST 03 antibodies may follow the teachings generated from various approaches which have been successfully employed with respect to other types of cancer, including but not limited to colon cancer (Arlén et al., *Crit. Rev. Immunol.* 18: 133-138, 1998), multiple myeloma (Ozaki et al., *Blood* 90: 3179-3186, 1997; Tsunenari et al., *Blood* 90: 2437-2444, 1997), gastric cancer (Kasprzyk et al., *Cancer Res.* 52: 2771-2776, 1992), B-cell lymphoma (Funakoshi et al., *Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 19: 93-101, 1996), leukemia (Zhong et al., *Leuk. Res.* 20: 581-589, 1996), colorectal cancer (Moun et al., *Cancer Res.* 54: 6160-6166, 1994; Velders et al., *Cancer Res.* 55: 4398-4403, 1995), and breast cancer (Shepard et al., *J. Clin. Immunol.* 11: 117-127, 1991).

The invention further provides vaccines formulated to contain a PROST 03 polypeptide or fragment thereof. The use of a tumor antigen in a vaccine for generating humoral and cell-mediated immunity for use in anti-cancer therapy is well known in the art and has been employed in prostate cancer using human PSMA and rodent PAP immunogens (Hodge et al., *Int. J. Cancer* 63: 231-237, 1995; Fong et al., *J. Immunol.* 159: 3113-3117, 1997). Such methods can be readily practiced by employing a PROST 03 polypeptide, or fragment thereof, or a PROST 03-encoding nucleic acid molecule and recombinant vectors capable of expressing and appropriately presenting the PROST 03 immunogen.

For example, viral gene delivery systems may be used to deliver a PROST 03-encoding nucleic acid molecule. Various viral gene delivery systems which can be used in the practice of this aspect of the invention include, but are not limited to, vaccinia, fowlpox, canarypox, adenovirus, influenza, poliovirus, adeno-associated virus, lentivirus, and Sindbis virus (Restifo, in *Curr. Opin. Immunol.* 8: 658-663, 1996). Non-viral delivery systems may also be employed by using naked DNA encoding a PROST 03 polypeptide or fragment thereof introduced into the patient (i.e., intramuscularly) to induce an immune response (see U.S. Patent No. 6,214,804 which is incorporated in full by reference). In one embodiment, the full-length human *prost 03* cDNA may be employed. In another embodiment, human *prost 03* cDNA fragments may be employed. In another embodiment, *prost 03* nucleic acid molecules encoding specific T lymphocyte (CTL) epitopes may be employed. CTL epitopes can be determined using specific algorithms (e.g., Epimer, Brown University) to identify peptides within a PROST 03 polypeptide which are capable of optimally binding to specified HLA alleles.

Various *ex vivo* strategies may also be employed. One approach involves the use of dendritic cells to present a PROST 03 polypeptide as antigen to a patient's immune system. Dendritic cells express MHC class I and II, B7 costimulator, and IL-12, and are thus highly specialized antigen presenting cells. In prostate cancer, autologous dendritic cells pulsed with peptides of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) are being used in a Phase I clinical trial to stimulate prostate cancer

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-35-

patients' immune systems (Tjoo et al., *Prostate* 28: 65-69, 1996; Murphy et al., *Prostate* 29: 371-380, 1996). Dendritic cells can be used to present PROST 03 polypeptides to T cells in the context of MHC class I and II molecules. In one embodiment, autologous dendritic cells are pulsed with PROST 03 polypeptides capable of binding to MHC molecules. In another embodiment, dendritic cells are pulsed with the complete PROST 03 polypeptide. Yet another embodiment involves engineering the overexpression of the *prost 03* gene in dendritic cells using various implementing vectors known in the art, such as adenovirus (Arthur et al., *Cancer Gene Ther.* 4: 17-25, 1997), retrovirus (Henderson et al., *Cancer Res.* 56: 3763-3770, 1996), lentivirus, adeno-associated virus, DNA transfection (Ribas et al., *Cancer Res.* 57: 2865-2869, 1997), and tumor-derived RNA transfection (Ashley et al., *J. Exp. Med.* 186: 1177-1182, 1997).

Anti-idiotypic anti-PROST 03 antibodies can also be used in anti-cancer therapy as a vaccine for inducing an immune response to cells expressing a PROST 03 polypeptide. Specifically, the generation of anti-idiotypic antibodies is well known in the art and can be readily adapted to generate anti-idiotypic anti-PROST 03 antibodies that mimic an epitope on a PROST 03 polypeptide (see, for example, Wagner et al., *Hybridoma* 16: 33-40, 1997; Foon et al., *J. Clin. Invest.* 96: 334-342, 1995; Herlyn et al., *Cancer Immunol Immunother* 43: 65-76, 1996). Such an anti-idiotypic antibody can be used in anti-idiotypic therapy as presently practiced with other anti-idiotypic antibodies directed against tumor antigens.

Genetic immunization methods may be employed to generate prophylactic or therapeutic humoral and cellular immune responses directed against cancer cells expressing PROST 03. Using the PROST 03-encoding DNA molecules described herein, constructs comprising DNA encoding a PROST 03 polypeptide/immunogen and appropriate regulatory sequences may be injected directly into muscle or skin of an individual, such that the cells of the muscle or skin take up the construct and express the encoded PROST 03 polypeptide/immunogen. The PROST 03 polypeptide/immunogen may be expressed as a cell surface polypeptide or be secreted. Expression of the PROST 03 polypeptide/immunogen results in the generation of prophylactic or therapeutic humoral and cellular immunity against prostate cancer. Various prophylactic and therapeutic genetic immunization techniques known in the art may be used (for a review, see information and references published at internet address [www.genweb.com](http://www.genweb.com)).

#### Anti-sense oligonucleotides, antisense vectors, and ribozymes

Anti-sense polynucleotides complementary to *prost 03* may be prepared synthetically. Such oligonucleotides may be delivered into cells with or without lipids that may assist uptake of the anti-sense oligonucleotides into cells.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-36-

Alternatively, expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids, may also be used for construction and delivery of recombinant vectors which will express anti-sense *prost 03*. See, for example, the techniques described in Sambrook et al. (*supra*) and Ausubel et al. (*supra*).

The polynucleotides comprising the full length cDNA sequence and/or its regulatory elements enable researchers to use *prost 03* polynucleotides as an investigative tool in sense strands (Yousoufian and Lodish, *Mol. Cell. Biol.* 13:98-104, 1993) or antisense strands (Eguchi, et al., *Annu. Rev. Biochem.* 60:631-652, 1991) for the regulation of gene function. Such technology is now well known in the art, and sense or antisense oligomers, or larger fragments, can be designed from various locations along the coding or control regions.

Genes encoding PROST 03 can be turned off by transfecting a cell or tissue with expression vectors which express high levels of a desired *prost 03* polynucleotide fragment. Such constructs can flood cells with untranslatable sense or antisense sequences. Even in the absence of integration into the DNA, such vectors may continue to transcribe RNA molecules until all copies are disabled by endogenous nucleases. Transient expression may last for a month or more with a non-replicating vector and even longer if appropriate replication elements are part of the vector system.

As mentioned above, modification of gene expression can be obtained by designing antisense molecules, DNA or RNA, to control regions of *prost 03*, i.e., the promoters, enhancers, and introns. Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g. between -10 and +10 regions of the leader sequence, are preferred. The antisense molecules may also be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes. Similarly, inhibition can be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing compromises the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or regulatory molecules. Recent therapeutic advances using triplex DNA were reviewed by Gee, J.E. et al. (In Huber and Car, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994).

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA (U.S. Patent No. 4,987,071; WO 93/23057). The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Within the scope of the invention are engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of RNA encoding PROST 03. Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences, GUA, GUU and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site may be evaluated for secondary structural features which may render the oligonucleotide inoperable. The suitability of candidate targets may also be evaluated by

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-37-

testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays (Irie et al., *Advance. Pharmacol.* 40:207-257, 1997).

Antisense molecules and ribozymes of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of RNA molecules. These include techniques for chemically synthesizing oligonucleotides such as solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription or by DNA sequences encoding PROST 03. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP6. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly can be introduced into cell lines, cells or tissues.

RNA molecules may be modified to increase intracellular stability and half-life. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences at the 5' and/or 3' ends of the molecules or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the backbone of the molecule. Increased stability can also be achieved by the inclusion of nontraditional bases such as inosine and queosine as well as acetyl-, methyl-, thio- and similarly modified forms of adenine, cytidine, guanine, thymine, and uridine which are not as easily recognized by endogenous endonucleases.

Methods for introducing antisense vectors into cells or tissues include those methods discussed *infra* and which are equally suitable for *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* therapy. For *ex vivo* therapy, antisense vectors are introduced into cells taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient as presented in U.S. Pat. Nos. 5,399,493 and 5,437,994, disclosed herein by reference. Delivery by transfection and by liposome or other lipid based or non-lipid based agents are well known in the art.

#### Assays for Identifying Agents Binding to PROST 03

The present invention also relates to assays and methods which can be used to identify agents that bind to PROST 03. Specifically, agents that bind to PROST 03 can be identified by the ability of the PROST 03 ligand or other agent or constituent to bind to PROST 03 and/or the ability to inhibit/stimulate PROST 03 activity.

Alternatively, agents that bind to a PROST 03 polypeptide can be identified using a yeast two-hybrid system or a binding capture assay. In the yeast two hybrid system, an expression unit encoding a fusion protein made up of one subunit of a two subunit transcription factor and the PROST 03 polypeptide is introduced and expressed in a yeast cell. The cell is further modified to contain (1) an expression unit encoding a detectable marker whose expression requires the two subunit transcription factor for expression and (2) an expression unit that encodes a fusion protein made up of the second subunit of the transcription factor and a cloned segment of DNA. If the cloned segment of DNA

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-38-

encodes a protein that binds to the PROST 03 polypeptide, the expression results in the interaction of PROST 03 and the encoded protein. This brings the two subunits of the transcription factor into binding proximity, allowing reconstitution of the transcription factor. This results in expression of the detectable marker. The yeast two hybrid system is particularly useful in screening a library of cDNA encoding segments for cellular binding partners of PROST 03.

PROST 03 polypeptides which may be used in the above assays include, but are not limited to, an isolated PROST 03 polypeptide, a fragment of a PROST 03 polypeptide, a cell that has been altered to express a PROST 03 polypeptide, or a fraction of a cell that has been altered to express a PROST 03 polypeptide. Further, the PROST 03 polypeptide can be the entire polypeptide or a defined fragment of the PROST 03 polypeptide. It will be apparent to one of ordinary skill in the art that so long as the PROST 03 polypeptide can be assayed for agent binding, e.g. by a shift in molecular weight or activity, the present assay can be used.

The method used to identify whether an agent/cellular component binds to a PROST 03 polypeptide will be based primarily on the nature of the PROST 03 polypeptide used. For example, a gel retardation assay can be used to determine whether an agent binds to PROST 03 or a fragment thereof. Alternatively, immunodetection and biochip technologies can be adopted for use with the PROST 03 polypeptide. A skilled artisan can readily employ numerous art-known techniques for determining whether a particular agent binds to a PROST 03 polypeptide.

Agents and cellular components can be further tested for the ability to modulate the activity of a PROST 03 polypeptide using a cell-free assay system or a cellular assay system. As the activities of the PROST 03 polypeptide become more defined, functional assays based on the identified activity can be employed.

As used herein, an agent is said to antagonize PROST 03 activity when the agent reduces PROST 03 activity. The preferred antagonist will selectively antagonize PROST 03, not affecting any other cellular proteins. Further, the preferred antagonist will reduce PROST 03 activity by more than 50%, more preferably by more than 90%, most preferably eliminating all PROST 03 activity.

Agents that are assayed in the above method can be randomly selected or rationally selected or designed. As used herein, an agent is said to be randomly selected when the agent is chosen randomly without considering the specific sequences of the PROST 03 polypeptide. An example of randomly selected agents is the use of a chemical library or a peptide combinatorial library, or growth broth of an organism or plant extract.

As used herein, an agent is said to be rationally selected or designed when the agent is chosen on a nonrandom basis that takes into account the sequence of the target site and/or its conformation in connection with the agent's action. Agents can be rationally selected or rationally designed by utilizing the peptide sequences that make up the PROST 03 polypeptide. For example, a rationally selected

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-39-

peptide agent can be a peptide whose amino acid sequence is identical to a fragment of a PROST 03 polypeptide.

The agents tested in the methods of the present invention can be, as examples, peptides, antibodies, oligonucleotides, small molecules and vitamin derivatives, as well as carbohydrates. A skilled artisan can readily recognize that there is no limit as to the structural nature of the agents used in the present screening method. One class of agents of the present invention are peptide agents whose amino acid sequences are chosen based on the amino acid sequence of the PROST 03 polypeptide.

Peptide agents can be prepared using standard solid phase (or solution phase) peptide synthesis methods, as is known in the art. In addition, the DNA encoding these peptides may be synthesized using commercially available oligonucleotide synthesis instrumentation and produced recombinantly using standard recombinant production systems. The production using solid phase peptide synthesis is necessitated if no-gene-encoded amino acids are to be included.

Another class of agent of the present invention are antibodies immunoreactive with critical positions of the PROST 03 polypeptide. As described above, antibodies are obtained by immunization of suitable mammalian subjects with peptides, containing as antigenic regions, those portions of the PROST 03 polypeptide intended to be targeted by the antibodies. Such agents can be used in competitive binding studies to identify second generation inhibitory agents as well as to block PROST 03 activity.

The cellular extracts tested in the methods of the present invention can be, as examples, aqueous extracts of cells or tissues, organic extracts of cells or tissues or partially purified cellular fractions. A skilled artisan can readily recognize that there is no limit as to the source of the cellular extract used in the screening method of the present invention.

Agents that bind a PROST 03 polypeptide, such as a PROST 03 antibody, can be used to modulate the activity of PROST 03, to target anticancer agents to appropriate mammalian cells, or to identify agents that block the interaction with PROST 03. Cells expressing PROST 03 can be targeted or identified by using an agent that binds to PROST 03.

How the PROST 03 binding agents will be used depends on the nature of the PROST 03 binding agent. For example, a PROST 03 binding agent can be used to: deliver conjugated toxins, such as diphtheria toxin, cholera toxin, ricin or pseudomonas exotoxin, to a PROST 03 expressing cell; modulate PROST 03 activity; to directly kill a PROST 03 expressing cell; or in screens to identify competitive binding agents. For example, a PROST 03 inhibitory agent can be used to directly inhibit the growth of PROST 03 expressing cells whereas a PROST 03 binding agent can be used as a diagnostic agent.

Pharmaceutical Compositions and Administration

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-40-

The present invention also relates to pharmaceutical compositions which may comprise *prost 03* polynucleotides, PROST 03 polypeptides, antibodies, agonists, antagonists, or inhibitors, alone or in combination with at least one other agent, such as stabilizing compound, which may be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. Any of these molecules can be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs or hormones, in pharmaceutical compositions where it is mixed with excipient(s) or pharmaceutically acceptable carriers. In one embodiment of the present invention, the pharmaceutically acceptable carrier is pharmaceutically inert.

The present invention also relates to the administration of pharmaceutical compositions. Such administration is accomplished orally or parenterally. Methods of parenteral delivery include topical, intra-arterial (directly to the tumor), intramuscular, subcutaneous, intramedullary, intrathecal, intraventricular, intravenous, intraperitoneal, or intranasal administration. In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Further details on techniques for formulation and administration may be found in the latest edition of *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.).

Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for ingestion by the patient.

Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose such as methyl, cellulose, hydroxypropylmethylcellulose, or sodium carboxymethylcellulose; and gums including arabic and tragacanth; and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents may be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate.

Dragee cores are provided with suitable coatings such as concentrated sugar solutions, which may also contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or dragee coatings for product identification or to characterize the quantity of active compound, i.e. dosage.

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin,

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-41-

as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a filler or binders such as lactose or starches, lubricants such as talc or magnesium stearate, and optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid paraffin, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of active compounds. For injection, the pharmaceutical compositions of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hank's solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions may contain substances which increase viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

For topical or nasal administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

#### Kits

The invention further relates to pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the invention. Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, reflecting approval by the agency of the manufacture, use or sale of the product for human administration.

#### Manufacture and Storage.

The pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured in a manner that is known in the art, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes.

The pharmaceutical composition may be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation may be a lyophilized powder in 1mM-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, 2%-7% mannitol at a pH range of 4.5 to 5.5 that is combined with buffer prior to use.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-42-

After pharmaceutical compositions comprising a compound of the invention formulated in an acceptable carrier have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. For administration of PROST 03, such labeling would include amount, frequency and method of administration.

Therapeutically Effective Dose.

Pharmaceutical compositions suitable for use in the present invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an effective amount to achieve the intended purpose, i.e. treatment of a particular disease state characterized by PROST 03 expression. The determination of an effective dose is well within the capability of those skilled in the art.

For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays, e.g., neoplastic cells, or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model is also used to achieve a desirable concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

A therapeutically effective dose refers to that amount of protein or its antibodies, antagonists, or inhibitors which ameliorate the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., ED<sub>50</sub> (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD<sub>50</sub> (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio between therapeutic and toxic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, ED<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub>. Pharmaceutical compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations what include the ED<sub>50</sub> with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage is chosen by the individual physician in view of the patient to be treated. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active moiety or to maintain the desired effect. Additional factors that may be taken into account include the severity of the disease state, eg, tumor size and location; age, weight and gender of the patient; diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long acting pharmaceutical compositions might be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks depending on half-life and clearance rate of the particular formulation.

Normal dosage amounts may vary from 0.1 to 100,000 micrograms, up to a total dose of about 1 g, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature. See U.S. Pat. Nos. 4,657,760; 5,206,344; or 5,225,212. Those

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-43-

skilled in the art will employ different formulations for polynucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells, conditions, locations, etc.

## EXAMPLES

The present invention is further described by the following examples. The examples are provided solely to illustrate the invention by reference to specific embodiments. These exemplifications, while illustrating certain specific aspects of the invention, do not portray the limitations or circumscribe the scope of the disclosed invention.

All examples were carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. Routine molecular biology techniques of the following examples can be carried out as described in standard laboratory manuals, such as Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

## Example 1: Cloning of additional 5' sequence for PROST 03

Mining of Incyte's LifeSeq database led to the identification of *prost 03* as a gene expressed in prostate. The *prost 03* clones from the database were assembled into a contiguous sequence that was determined to contain a partial coding sequence. The contiguous sequence was missing the 5' end of the coding region.

Additional 5' sequence for PROST 03 was cloned from a human prostate cDNA library (Human Prostate 5'-Stretch cDNA library; Clontech) using PCR. Primary amplifications were performed using lambdaGT11 forward or reverse primers with the *prost 03* specific primer *Prost 03-1*. Nested PCR reactions were performed using lambdaGT11 reverse primer with *Prost 03-2*. Amplified products from both primary and nested PCR reactions were cloned using a TA cloning kit (Invitrogen). Individual clones were re-tested by PCR and sequenced.

New 5' *prost 03* sequence was obtained from two clones and used in a BLAST search of the LifeSeq database. A new contiguous sequence was assembled; this sequence was predicted to contain the complete coding region for PROST 03 protein. A full-length clone (#3352331) was obtained from Incyte and the sequence was confirmed.

Primer Sequences:

LambdaGT11-forward primer: 5'- GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC C -3' (SEQ ID NO: 3)

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-44-

LambdaGT11-reverse primer: 5'- GAC ACC AGA CCA ACT GGT AAT G -3' (SEQ ID NO: 4)

PROST 03-1: 5'- CAC CTC CAG TGT CCC CTC GGT ATT TGG -3' (SEQ ID NO: 5)

PROST 03-2: 5'- CAC ACT GTG GGA CAG GCA TGT GGC ACC -3' (SEQ ID NO: 6)

The full-length polypeptide sequence was used to search the SWISS-PROT and SPTREMBL databases using the FastA program. The results of this search indicated that the PROST 03 sequence shows similarity to a set of transporters that has been previously identified in plants, in particular to a set of sucrose/proton transporters.

#### Example 2: Transient expression of PROST 03 in COS cells

The cDNA encoding PROST 03 was subcloned into the mammalian expression vector pCIneo (Promega) using a three-part ligation strategy. pCIneo was digested with EcoRI and SmaI and then treated with calf intestine alkaline phosphatase. The 5' portion of the *prost 03* coding region was amplified by PCR using Incyte clone #3352331 as template. The 5' primer was designed to contain a consensus Kozak sequence. The PCR fragment was gel purified and then digested with EcoRI and SphI. The 3' portion of the *prost 03* coding region was obtained by digestion of Incyte clone #3352331 with SphI and BsrBI, followed by gel purification of the 916 base pair fragment. The *prost 03* DNA fragments were then ligated with the pCIneo vector and transformed into TOP10 cells (Invitrogen) to obtain clones.

The resulting expression plasmid, CIPr3, was then transiently transfected into COS cells using Lipofectamine-Plus (Life Technologies). Whole cell lysates were demonstrated to contain PROST 03 protein when analyzed by Western blot.

5' PCR primer: 5'- ACT GAA TTC GCC ACC ATG GTC CAG AGG CTG TGG -3' (SEQ ID NO: 7)

3' PCR primer: 5'- CCA TCC AGC TGC ACA GCT CAG -3' (SEQ ID NO: 8)

#### Example 3: *Prost 03* mRNA Expression

The expression of *prost 03* mRNA in a variety of samples from normal and tumor tissues and in cell lines, was determined by semi-quantitative PCR using a Taqman assay, (Perkin-Elmer). Prostate normal, benign and tumor tissue samples that had been graded according to a modified Gleason grading system were obtained from the Urology Department at Stanford University School of Medicine.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-45-

RNA was isolated from these by standard procedures. RNA from other tumor and normal tissues was purchased from commercial sources, including Clontech, and Biochain. Prostate tumor cell lines, (PC-3, LNCaP and DU145), were obtained from American Type Culture Collection and propagated in culture by standard methods using serum containing medium. Xenograft tumors derived from these cell lines were established in nude mice and harvested from the mice approximately 4-6 weeks after implantation. RNA was isolated from the tumors by standard procedures.

Taqman based PCR analysis was performed using the following sets of primers and probes:  
 Set 1: primers CCTCCCAGGCTCTGTCTGAT (SEQ ID NO: 9) and ATGGCGCACTGCAGGAAC (SEQ ID NO: 10) and probe 6-FAM-TGCAGGCGTTCGGATGGGC-Tamra (SEQ ID NO: 11);  
 Set 2: primers ATTCGGCACTCGAGCAGTCTA (SEQ ID NO: 12) and TGAGGGCGGCTGAAGCT (SEQ ID NO: 13) and probe 6-FAM-CAGGCATGTGGCACCGGCA-Tamra (SEQ ID NO: 14); and  
 Set 3: primers CAGCCAGTCTGTCACTGCCTAT (SEQ ID NO: 15) and TCGCTCTTGTCAAATACTACCTGTGTA (SEQ ID NO: 16) and probe 6-FAM-CCAGCCTGCGGCAGACACCA-Tamra (SEQ ID NO: 17).

These primers and probe were designed using Perkin Elmer's Primer Express software and were synthesized by Synthetic Genetics. PCR reactions were carried out for 30-40 cycles and quantified using prostate RNA to generate a standard curve for relative comparison. This analysis demonstrated that *prost 03* mRNA was highly prostate tissue restricted

#### Example 4: Antibody Generation

Rabbit polyclonal antisera were raised against eight synthetic polypeptide sequences derived from the PROST 03 protein sequence. These sequences were selected because of their predicted extracellular orientation, in order to generate antisera that are more likely to recognize surface epitopes. Cysteine residues were replaced with aminobutyric acid to aid synthesis. The specific amino acid sequences, positions on the PROST 03 protein and designations for the peptides are listed below.

<i>Designation</i>	<i>Position</i>	<i>Amino Acid Sequence</i>
Pep1	39 – 52	VPPLLELVGVEEKF (SEQ ID NO: 18)
Pep4	292 – 309	YTDFVGEGLYQGVPRAEF (SEQ ID NO: 19)
Pep5	308 – 323	EPGTEARRHYDEGVRM (SEQ ID NO: 20)
Pep7	406 – 431	EKQVFLPKYRGDTGGASSEDLSMTSF (SEQ ID NO: 21)
Pep8	225 - 240	PTEPAEGLSAPSLSPH (SEQ ID NO: 26)

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-46-

Pep9	109 – 121	LAGLLCPDPRPLE (SEQ ID NO: 22)
Pep10	181 – 197	IDWDTSALAPYLGTQEE (SEQ ID NO: 23)
Pep11	544 – 553	DKSDLAKYSA (SEQ ID NO: 24)
Pep 4+5	294 – 322	DFVGEGLYQGVPRAEGETEARRHYDEGVR (SEQ ID NO: 25)

Peptides were covalently coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH), via an additional amino- or carboxyl-terminal cysteine, for use as immunogen. Similarly, a bovine serum albumin (BSA) conjugate was prepared for the analysis of antisera titers via ELISA.

Two animals were immunized with each peptide. Initial immunizations were performed in Freund's complete adjuvant (0.5 mg/animal), followed by boosts at three week intervals with 0.25 mg/animal in Freund's incomplete adjuvant applied intramuscularly. Periodic test bleeds were taken and antibody titers against the specific BSA-peptide conjugate were measured by ELISA and compared with preimmune sera.

Antisera were tested for PROST 03 specificity via ELISA and Western blotting on PROST 03 transiently expressed in COS cells. Antisera against Peptides 7, 8, 10, 11 and 4+5 recognized PROST 03. PROST 03-specific antisera were further tested on lysates prepared from: LNCAP tumors, LNCAP cells, PC3 tumors, PC3 cells and several clinical samples of human prostate tumors. Binding specificity was verified by binding in the presence of the homologous and heterologous peptides.

Human monoclonal antibodies against PROST 03 were generated by immunizing transgenic mice with PROST 03 peptides. Splenocytes of these animals were fused with myeloma cells to produce hybridoma cells. The resulting hybridomas were screened by ELISA for those producing antibodies directed against PROST 03 peptides and protein.

#### Example 5: Immunohistochemical staining of PROST 03 Expression

The expression of PROST 03 protein was determined by LifeSpan Biosciences, Inc. in a variety of human normal and tumor tissues, including breast, colon, lung, brain and prostate. In addition, prostatic carcinoma metastatic to bone and lymph node were chosen to determine PROST 03 protein expression. Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were incubated with anti-PROST 03 antibody as a primary antibody and the principal detection system consisted of a Vector ABC-AP kit (AK5001) with a Vector Red substrate kit, which was used to produce a fuschia-colored red deposit (SK-5100). Tissues were also stained with a positive control antibody (CD31) to ensure that tissue antigens were preserved and accessible for immunohistochemical analysis. Only tissues that stained positive for

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-47-

CD31 were chosen for the remainder of this study. Negative controls consisted of performing the entire immunohistochemistry procedure on adjacent sections in the absence of primary antibody. PROST 03 expression was seen in normal prostate, prostate carcinoma and metastasis to bone and lymph node. The majority of carcinomas showed positive staining with anti-PROST 03 antibody with variable levels of protein expression in the carcinoma.

\*\*\*\*\*

All publications and patents mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. While the present invention has been described with reference to the specific embodiments thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes may be made and equivalents may be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. In addition, many modifications may be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the objective, spirit and scope of the present invention. All such modifications are intended to be within the scope of the claims appended hereto.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-48-

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide which is at least 70% identical to a member selected from the group consisting of:
  - (a) a polynucleotide encoding a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) and
  - (b) a polynucleotide which is complementary to the polynucleotide of (a).
2. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is DNA.
3. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is RNA.
4. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is genomic DNA.
5. The polynucleotide of Claim 2 wherein the polynucleotide encodes the polypeptide comprising amino acids 1 to 553 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2).
6. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide comprises the sequence as set forth in Figure 1 (SEQ ID NO: 1) from nucleotide 1 to nucleotide 3320.
7. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide comprises the sequence as set forth in Figure 1 (SEQ ID NO: 1) from nucleotide 282 to nucleotide 1943.
8. A vector comprising the polynucleotide of Claim 2.
9. A host cell comprising the vector of Claim 8.
10. A method of producing a polypeptide comprising expressing from the host cell of Claim 9 the polypeptide encoded by the polynucleotide.
11. The method of Claim 10 wherein the polypeptide comprises amino acid 1 to amino acid 553 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2).
12. A method of producing a polypeptide wherein the polypeptide comprises the amino acid

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-49-

sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), the method comprising the steps of:

- (a) culturing the host cell of Claim 9 under conditions whereby the polypeptide is expressed; and
- (b) recovering the polypeptide from the culture.

13. A method for producing a cell which expresses a polypeptide comprising genetically engineering the cell with the vector of Claim 8.

14. A polypeptide comprising a member selected from the group consisting of:

- (a) a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2); and
- (b) a polypeptide which is at least 70% identical to the polypeptide of (a).

15. The polypeptide of Claim 14 wherein the polypeptide comprises amino acids 1 to 553 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

16. An isolated antibody, or antibody fragment, which specifically binds to a polypeptide comprising a member selected from the group consisting of:

- (a) a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2);
- (b) a polypeptide comprising amino acid 181 to amino acid 197 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 23);
- (c) a polypeptide comprising amino acid 225 to amino acid 240 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 26);
- (d) a polypeptide comprising amino acid 294 to amino acid 322 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 25);
- (e) a polypeptide comprising amino acid 406 to amino acid 431 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 21);
- (f) a polypeptide comprising amino acid 544 to amino acid 553 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 24); and
- (g) a polypeptide which is at least 70% identical to the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e), or (f).

17. The antibody of Claim 16, wherein the antibody specifically binds to the amino acid sequence IDWDTSALAPYLGTEEE (SEQ ID NO: 23).

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-50-

18. The antibody of Claim 16 wherein the antibody specifically binds to the amino acid sequence PTEPAEGLSAPSLSPH (SEQ ID NO: 26).
19. The antibody of Claim 16, wherein the antibody specifically binds to the amino acid sequence DFVGEGLYQGVPRAGTEARRHYDEGVR (SEQ ID NO: 25).
20. The antibody of Claim 16, wherein the antibody specifically binds to the amino acid sequence EKQVFLPKYRGDTGGASSEDSLMTSF (SEQ ID NO: 21).
21. The antibody of Claim 16, wherein the antibody specifically binds to the amino acid sequence DKSDLAKYSA (SEQ ID NO: 24).
22. The antibody of Claim 16, wherein the antibody is a polyclonal antibody.
23. The antibody of Claim 16, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
24. An immunoconjugate comprising an isolated antibody, or antibody fragment, which specifically binds to a polypeptide comprising a member selected from the group consisting of:
- (a) a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2);
  - (b) a polypeptide comprising amino acid 181 to amino acid 197 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 23);
  - (c) a polypeptide comprising amino acid 225 to amino acid 240 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 26);
  - (d) a polypeptide comprising amino acid 294 to amino acid 322 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 25);
  - (e) a polypeptide comprising amino acid 406 to amino acid 431 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 21);
  - (f) a polypeptide comprising amino acid 544 to amino acid 553 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 24); and
  - (g) a polypeptide which is at least 70% identical to the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f)
- conjugated to a therapeutic agent.

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-51-

25. The immunoconjugate of Claim 24, wherein the therapeutic agent is a cytotoxic agent.
26. The immunoconjugate of Claim 25, wherein the cytotoxic agent is selected from the group consisting of ricin, doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethidium bromide, mitomycin, etoposid, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphtheria toxin, *Pseudomonas* exotoxin (PE) A, PE40, ricin, abrin, glucocorticoid and radioisotopes.
27. The immunoconjugate of Claim 24, wherein the antibody fragments are selected from the group consisting of Fv, F(ab') and F(ab')<sub>2</sub> fragments.
28. A method for selectively destroying a cell expressing the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) comprising reacting the immunoconjugate of Claim 24 with the cell so that the therapeutic agent of the immunoconjugate can destroy the cell.
29. A method of treating a disease-state in a human patient which disease-state is associated with expression of PROST 03 and wherein the method comprises administering to the patient a therapeutically effective amount of the immunoconjugate of Claim 24.
30. A method of treating a disease-state in a human patient which disease-state is associated with inappropriate expression of PROST 03 and wherein the patient is in need of decreased levels of a polypeptide comprising a member selected from the group consisting of:
- (a) a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2); and
  - (b) a polypeptide which is at least 70% identical to the polypeptide of (a) and wherein the method comprises administering to the patient a therapeutically effective amount of a ribozyme which specifically cleaves RNA encoding the polypeptide.
31. A method of treating a disease-state in a human patient which disease-state is associated with inappropriate expression of PROST 03 and wherein the patient is in need of decreased levels of a polypeptide having the amino acid sequence as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), and wherein the method comprises administering to the patient a therapeutically effective amount of a polynucleotide which is complementary to a polynucleotide encoding the polypeptide or a portion thereof.
32. A diagnostic method wherein the method comprises analyzing a sample derived from a

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-52-

host for the presence of a polypeptide comprising a member selected from the group consisting of:

- (a) a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2);
- (b) a polypeptide comprising amino acid 181 to amino acid 197 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 23);
- (c) a polypeptide comprising amino acid 225 to amino acid 240 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 26);
- (d) a polypeptide comprising amino acid 294 to amino acid 322 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 25);
- (e) a polypeptide comprising amino acid 406 to amino acid 431 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 21);
- (f) a polypeptide comprising amino acid 544 to amino acid 553 as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 24); and
- (g) a polypeptide which is at least 70% identical to the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f).

33. The method of Claim 32, wherein analyzing comprises contacting the sample with the antibody or antibody fragment of Claim 16, which specifically binds to the polypeptide and detecting binding of the antibody to the polypeptide in the sample.

34. A diagnostic method wherein the method comprises analyzing for the presence of a polynucleotide comprising a polynucleotide which is at least 70% identical to a member selected from the group consisting of:

- (a) a polynucleotide encoding a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2); and
- (b) polynucleotide which is complementary to the polynucleotide of (a).

35. A method for diagnosing in a subject a metastasis associated with the polypeptide of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) comprising:

- (a) obtaining from the subject a tissue and/or fluid sample;
- (b) contacting the sample with the antibody of Claim 16; and
- (c) detecting the binding of the antibody with the polypeptide in the sample.

36. The method of Claim 35, wherein the antibody is labeled so as to directly or indirectly produce a detectable signal with a compound selected from the group consisting of a radiolabel, an

WO 01/81577

PCT/US01/13323

-53-

enzyme, a chromophore and a fluorescer.

37. A vaccine comprising an amount of a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), dispersed in a physiologically acceptable, nontoxic vehicle, which amount is effective to induce an immune response in a human against prostate cancer associated with PROST 03 expression.

38. A vaccine comprising a DNA sequence encoding a polypeptide, or a biologically or immunologically active fragment thereof, comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), wherein said DNA is operably linked to a promoter, and where, following administration in vivo into a tissue of a mammal, sufficient uptake of said DNA into cells occurs, and sufficient expression of the polypeptide or fragment occurs, so as to produce an immunogenic amount of said polypeptide or fragment, which amount is effective to immunize a human against prostate cancer associated with PROST 03 expression.

FIGURE 1

1 GAACCAGCCT GCACGCGCTG GCTCCGGGTG ACAGCCCGGC GCCTCGGCCA  
51 GGATCTGAGT GATGAGACGT GTCCCCACTG AGGTGCCCCA CAGCAGCAGG  
101 TGTGAGCAT GGGCTGAGAA GCTGGACCGG CACCAAAGGG CTGGCAGAAA  
151 TGGGCCCTG GCTGATTCCT AGGCAGTGG CGGCAGCAAG GAGGAGAGGC  
201 CGCAGCTTCT GGAGCAGAGC CGAGACGAAG CAGTTCTGGA GTGCCCTGAC  
251 GGGCCCTGA GCCCTACCCG CCTGGCCAC TATGTTCCAG AGGCTGTGGG  
301 TGAGCGCCT GCTGCGGCAC CGGAAAGCCC AGCTCTTGCT GGTCAACCTG  
351 CTAACCTTG GCCTGGAGGT GTGTTTGCC GCAGGCATCA CCTATGTGCC  
401 GCCTCTGCTG CTGGAAGTGG GGTGAGAGGA GAAGTTTATG ACCATGTGTG  
451 TGGCATTGG TCCAGTGTG GGCCTGGTCT GTGTCCCGCT CCTAGGCTCA  
501 GCCAGTGACC ACTGGCGTGG ACGCTATGGC CGCCCGCGC CCTTCATCTG  
551 GGCAGTGTCC TTGGGCATCC TGCTGAGCCT CTTTCTCATC CCAAGGCGG  
601 GCTGGCTAGC AGGGCTGCTG TGCCCGGATC CCAGGCCCT GGAGCTGGCA  
651 CTGCTCATCC TGGCGTGGG GCTGCTGGAC TTCTGTGGC AGGTGTGCTT  
701 CACTCCACTG GAGGCCCTGC TCTGTGACCT CTTCGGGAC CCGAACCCT  
751 GTCGCCAGGC CTAATCTGTC TATGCCCTTA TGATCAGTCT TGGGGCTGC  
801 CTGGGCTACC TCCGCTGTC CATTGACTGG GACACCAAGT CCCTGGCCCC  
851 CTACCTGGGC ACCCAGGAGG AGTGCCCTCT TGGCCTGCTC ACCCTCATCT  
901 TCCTCACCTG CGTAGCAGCC ACACTGCTGG TGGCTGAGGA GGCAGCGCTG  
951 GGGCCACCG AGCCAGCAGA AGGGCTGTGG GCCCCCTCT TGTGCCCCCA  
1001 CTGCTGTCCA TGCCGGGCC GCTTGGCTTT CCGGAACCTG GGGCCCTGC  
1051 TTCCCGGCT GCACCACTG TGCTGCGCA TGCCCGCAC CCTGCGCCGG  
1101 CTCTTGTGG CTGAGCTGTG CAGCTGGATG GCACCTATGA CCTTCAAGCT  
1151 GTTTTACAG GATTTCTGTG GCGAGGGCT GTACCAGGC GTGCCACAG  
1201 CTGAGCCGGG CACCGAGGCC CGGAGACACT ATGATGAAG CGTTCGGATG  
1251 GGCAGCCTGG GCTGTTCCT GCAGTGCACC ATCTCCCTGG TCTTCTCTCT  
1301 GGTGATGGAC CGGCTGTGTC AGCGATTGCG CACTCGAGCA GTCTATTGG  
1351 CCAAGTGGGC AGCTTTCCT GTGGCTGCGG GTGCCACATG CCTGTCCCAC  
1401 AGTGTGGCG TGGTACAGC TTCAGCCGCC CTCACCGGT TCACCTCTTC

## FIGURE 1 - continued

1451 AGCCCTGCAG ATCCTGCCCT ACACACTGGC CTCCTCTAC CACCGGAGAG  
1501 AGCAGGTGTT CCTGCCAAA TACCGAGGG ACACTGGAGG TGCTAGCAGT  
1551 GAGGACAGCC TGATGACCAG CTTCCTGCCA GGCCTAAGC CTGGAGCTCC  
1601 CTTCCTAAT GGACACGTGG GTGCTGGAGG CAGTGGCCTG CTCGCCCTC  
1651 CACCCGCGCT CTGGGGGGCC TCTGCCTGTG ATGTCTCCGT ACGTGTGTG  
1701 GTGGGTGAGC CCACCGAGGC CAGGGTGGTT CCGGGCCGGG GCATCTGCCT  
1751 GGACCTCGCC ATCCTGGATA GTGCCTTCTT GCTGTCCCAG GTGGCCCCAT  
1801 CCCTGTTTAT GGGCTCCATT GTCCAGCTCA GCCAGTCTGT CACTGCCATAT  
1851 ATGGTGTCTG CCGCAGGCC TGGTCTGGTC GCCATTACT TTGCTACACA  
1901 GGTAGTATTT GACAAGAGCG ACTTGGCCAA ATACTCAGCG TAGAAAACCT  
1951 CCAGCACATT GGGGTGGAGG GCCTGCCTCA CTGGTCCCA GCTCCCCGCT  
2001 CCTGTTAGCC CCAAGGGGCT GCCGGGCTGG CCGCCAGTTT CTGTTGCTGC  
2051 CAAAGTAATG TGGCTCTCTG CTGCCACCTT GTGCTGCTGA GGTGCGTAGC  
2101 TGCACAGCTG GGGGCTGGGG CGTCCCTCTC CTCTCTCCCC AGTCTCTAGG  
2151 GCTGCCCTGAC TGGAGGCCTT CCAAGGGGGT TTCAGTCTGG ACTTATACAG  
2201 GGAGGCCRGA AGGGCTCCAT GCACTGGAAT GCGGGGACTC TGCAGGTGGA  
2251 TTACCCAGGC TCAGGGTTAA CAGCTAGCCT CCTAGTTGAG ACACACCTAG  
2301 AGAAGGGTTT TTGGGAGCTG AATAAACTCA GTCACCTGGT TTCCCATCTC  
2351 TAAGCCCTT AACCTGCAGC TTCGTTTAA GTAGCTCTTG CATGGGAGTT  
2401 TCTAGGATGA AACACTCCTC CATGGGATT GAACATATGA AAGTTATTTG  
2451 TAGGGGAGA GTCTGAGGG GCAACACACA AGAACCAGGT CCCCTCAGCC  
2501 CACAGCACTG TCTTTTGGCT GATCCACCCC CCTCTTACCT TTTATCAGGA  
2551 TGTGGCCTGT TGGTCTTCT GTTGCCATCA CAGAGACACA GGCATTAAA  
2601 TATTTAACTT ATTTATTAA CAAAGTAGAA GGGATCCAT TGCTAGCTTT  
2651 TCTGTGTTGG TGTCTAATAT TTGGTAGGG TGGGGGATCC CCAACAATCA  
2701 GGTCCCCTGA GATAGCTGGT CATGGGCTG ATCAITGCCA GAATCTTCTT  
2751 CTCTGGGGT CTGGCCCCC AATATGCCTA ACCCAGGACC TTGGAATTC  
2801 TACTCATCCC AAATGATAAT TCCAAATGCT GTTACCCAG GTTAGGGTGT

**FIGURE 1 - continued**

2851 TGAAGGAAGG TAGAGGGTGG GGCTTCAGGT CTCACGGCT TCCCTAACCA  
2901 CCCCTCTTCT CTTGGCCGAG CCTGGTTCCC CCCACTTCCA CTCCTCTCTA  
2951 CTCTCTCTAG GACTGGGCTG ATGAGGCAC TGCCCAAAAT TTCCTTACC  
3001 CCCAACTTTC CCCTACCCCC AACTTTCCCC ACCAGCTCCA CAACCCTGTT  
3051 TGGAGTACT GCAGGACCAG AAGCACAAG TGCGTTTCC CAAGCCTTTG  
3101 TCCATCTCAG CCCCAGAGT ATATCTGTG TGGGGAAAT TCACACAGAA  
3151 ACTCAGGAGC ACCCCCTGCC TGAGCTAAG GAGGICTTAT CTCTCAGGGG  
3201 GGGGTTTAAG TGCCGTTTGC AATAATGTCG TCTTATTTAT TTAGCGGGGT  
3251 GAATATTTTA TACTGTAAGT GAGCAATCAG AGTATAATGT TTATGGTGAC  
3301 AAAATTAAG GCTTCTTAT

WO 01/81577

4/12

PCT/US01/13323

## FIGURE 2

1 MVQRLWVSRL LRHRKAQLLL VNLITFGLEV CLAAGITYVP PLLEEVGVER  
51 KFMTMVLGIG FVLGLVCVPL LGSASDRWRG RYGRRRPFIN ALSLGILLSL  
101 FLIPRAGWLA GLLCPDRPL ELALLILGVG LLDPCGQVCF TPIEALLSDL  
151 FRDPDHCRQA YSVYAFMISL GGCLGYLLPA IDWDTALAP YLGTQBECLF  
201 GLLTLLIFLTC VARTLLVAEE AALGPTEPAP GLSAPSLSPH CCPCRARLAF  
251 RNLGALLPRL HQLCCRPRT LRRLFVAELC SWMALMTFTL FYTDFVGEGL  
301 YQGVPRAEFG TEARRHYDEG VRMGLGLFL QCAISLVFSL VMDRLVQRFG  
351 TRAVYLASVA AFPVAAGATC LSHSVAVVTA SAALTGFIFS ALQILPYTLA  
401 SLYHREKQVF LPKYRGDTGG ASSEDSLMTS FLPGPKPGAP FPNGHVQAGG  
451 SGLLPPPPAL CGASACDVSV RVVVGEPTSA RVVPGRGICL DLAILDSAPL  
501 LSQVAPSLFM GSIVQLSQSV TAYMVAAGL GLVAIYFATQ VVFDKSDLAK  
551 YSA

FIGURE 3

```

DcSUT2 1 MENTKELNKPQPPSSAAMQLQTPVQKIPTATWKLVLVAIAAGVQFGWA 50
PROST03 1 .....MVQRLWVSRLLRHRKAQLLLVNLTFGLEVCVA 33
51 LQLSLLTPYVQLLGIPIHKWAAYIWLGGPISGMLVQPIVGYYSRHCQSSFG 100
34 AGITYVPPLELVGVEEKFMTWVLGIGPVGLVCVPLLSASDHWGRYQ 83
101 RRRPFIASGAGCVAI SVILIGFAADISYKAGDDMSKTLKPRAVTVFVIGF 150
84 RRRPFIWALSLGILLSLFLIPRAGWLAGLLCPDP...RPLELALLLGV 129
151 WILDVANNLQGPCRALLADLCSGDTRMRSSANAFYSFFMAVGNILGYAA 200
130 GLLDFCGQVCFPLEALLSDLFR.DPDHCRQAYSVYAFMISLGCLGYLL 178
201 GSYN.NLYKLPFFSKTHACDLYCANLKSCFIISIALLIITVVALSVVRE 249
179 PAIDWDTALAPYLGTOECLFGLLTLIFLTCVAATLLVAEEAALGPTEP 228
250 NSGPPDDADAAEBPPSSGKIPV.FGELLGALKDL...PRFMLLLIYV 293
229 AEGLSAPSLSPHCCPCRARLAFRNIGALLPRHLQCCMRPRTLRLRFVAE 278
294 CLNWIWAFPPFILPDTDMGREIYGGT.....AGQKLYDQCVRAGALGL 337
279 LCSWMLMTFTLFTYDFVGEGLYQGVPRABFGTEARRHYDECVRMGSLGL 328
338 LLNSVVLGLTSLIAYEYLVGVGVKILMGVNFILAIGLVMTVVVSKVAQ 387
329 ELQCAISLVFSLVMDRLVQRFGRVAV.....YASVAAPFVAA 366
388 HQREHSANGQLLPPSAGVKAGALSFLSILGIPLSITYSIPFALASIYSSG 437
367 GATCLSHSVAVVTASAAITGFTFSALQILPYTLASLYHREKQVFLPKYRG 416
438 SGAGQGLSLGVLNLAIIVFQMVSVLAGPFDLSFGGGLPAFVVGAI SAA 487
417 DTGGASSEDSLMTSFLFGPKGAPFPNGHVAGGSGLLPPPPALCGASAC 466
488 ISGVLAI VLLPKPSKDAASKLSLSGTYH..... 515
467 DVSVRVVGBPTEARVVPGRGICLDLAILDLSAFLLSQVAPSLFMGSIIVQL 516

```

FIGURE 4

```

1 GAACCAAGCCTGCACGGCTGGCTCCGGGTGACAGCCGGCGGCTCGGCCAGGATCTGAGT 60
  CTGGTTCGAGCGTGGCGGACCGAGGCCACTGTTCGGCGCGCGAGCCGCTCTAGACTCA
61 GATGAGACGTGTCCCACTGAGGTGCCCAAGCAGCAGGTTGTAGCATGGCTGAGAA
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTACTCTGCACAGGGGTGACTCCACGGGGTGTCTGTCTCCACAACCTCTACCCGACTCTT
120
121 GCTGGACCGGCACCAAGGGCTGGCAGAAATGGGCGCTGGCTGATTCCTAGGCAGTTGG
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGACTGGCGGTGGTTCCCGACCTCTTACCCGCGGACCGACTAAGGATCCGTCAACC
180
181 CGCAGCAAGGAGGAGAGCCCGAGCTTCTGGAGCAGAGCCGAGACGAAAGCACTCTGGA
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCGTCTCTCTCTCTCCGCGCTCGAAGACTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCAAGACTT
240
241 GTGCTGAAAGCCCTGAGCCCTACCCGCTTGGCCACTATGCTCCAGAGGCTGTGGG
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACGGACTTGGCGGGGACTCGGATGGGCGGACCGGGTGATACAGGTCTCCGACACCC
300
c
  M V Q R L W V -
301 TGAGCCGCTGCTGGCCACCGAAAGCCAGCTCTTGTGGTCAACCTGCTAACCTTTG
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTCGCGGACGACGCGCTGGCTTTCGGTTCGAGAACGACAGTTGGAGATTTGGAAC
c
  S R L L R H R K A Q L L L V N L L T F G -
361 GCTGGAGGTGTGTTTGGCCAGGCACTACCTATGTGCGCCTCTGCTCTGAAAGTGG
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGAACCTCCACACAACCGGCTCCGTAGTGGATACACGGCGGAGACGACGACTTCACC
420
c
  L E V C L A A G I T Y V P P L L L E V G -
421 GGTAGAGGAGAGTTCATGACCAATGTTGCTGGCATTTGGTCCAGTCTGGGCTGCTCT
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCACTCTCTCTTCAAGTACTGTTACACGACCCGTAACCAAGTTCACGACCCGGACCCAGA
c
  V E E K F M T M V L G I G P V L G L V C -
481 GTGTCGCTCCTAGGCTCAGCCAGTGAACACTGGCGTGGACGCTATGCGCCGCGCGGC
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACAGGCGGAGGATCCGAGTGGTCACTGGTGAACCGACTGGGATACCGCGGCGGCGG
c
  V P L L G S A S D H W R G R Y G R R R P -
541 CCTTCATCTGGGCACTGTCTTGGGCATCTGCTGAGCCTTTCTCATCCCAAGGGCCG
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGAACTAGAACCCGTGACAGGAACCCGTAGGACGACTCGGAGAAAGATAGGGTTCCCGGC
600
c
  F I W A L S L G I L L S L F L I P R A G -
661 GCTGGCTAGCAGGCTGCTGTGCCCAGATCCCAGGCCCTGGAGCTGGCACATGCTCATCC
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGACCGATCTCTCCGACGACCGGCTAGGGTCCGGGACCTCGACCGTGAAGATAGG
c
  W L A G L L C P D P R P L E L A L L I L -
721 TGGCGTGGGCTGCTGACTTCTGTGGCCAGGTGCTTCACTCCACTGGAGGCCCTGC
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCCGCAACCCGACGACTGAAGACACCGGTCCACACGAGTGAAGTGAACCTCCGAGCG
c
  G V G L L D F C G Q V C F T P L E A L L -

```

FIGURE 4 - continued

```

TCTCTGACCTCTTCGGGACCCGGACCACTGTGCCAGGCCACTCTGTCTATGCTTCA
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAGACTGGGAGAGGGCCCTTGGSCCTGGTGCACGCGGTCCGGATGAGACGATACGSAAGT
c   S D L F R D P D H C R Q A Y S V Y A F M -
T G A T C G T C T T G G G G C T G C C T G G G T A C C T C C T G C C T G C C A T T G A C T G G G A C C C A G G
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A C T A G T C A G A A C C C C G A C G A C C C G A T G G A G G A C G G A C G G T A A C T G A C C C T G T G T C A C
c   I S L E G G C L G Y L L P A I D W D T S A -
C C C T G G C C C C T A C C T G G G C A C C A G G A G A T G C C T C T T T G G C C T G C T A C C C T C A T C T
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
G G A C C G G G G A T G G A C C C G T G G T C C T C C A C G G A G A A C C G G A C G A G T G G G A G T A G A
c   L A P Y L G T Q E E C L F G L L T L I F -
T C C T C A C C T G C G T A G C A G C C A C T G C T G G T G G C T G A G G A G S C A G C G C T G G G C C C C A C G
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A G G A G T G G A C G C A T C G T C G S T G T A C G A C C A C C G A C T C C T C G T C G C A C C C G G S T G S C
c   L T C V A A T L L V A E E A A L G P T E -
A G C C A G C A G A G G G C T G T C G S C C C C T C C T T G T C G C C C A C T G C T G T C A T G C C G G G C C C
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
T C G G T C G T C T C C C G A C A C C G S G G A G A C A G C G G G T G A C G A C A G G T A C G G C C C G G
c   F A R G L S A P S L S P H C C F C R R A R -
G C T T G G C T T T C C G A A C C T G G G C G C C T G C T C C C C G G C T G C A C C A G C T G T C T G C D G C A
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
C G A A C C G A A A G G C C T T G G A C C G C G G A C G A A G G G C C G A C G T G G T C G A C A G A C G G C G T
c   L A F R N L G A L L P R L H Q L C C R M -
T G C C C C G A C C C T G C G C G S C T C T T C G T G S C T G A G C T G T G C A G C T G G A T G C C A C T C A T G A
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A C G S G G C G T G G G A C G C G G C C G A A G C A C C G A C T C G A C A C G T C G A C C T A C C G T G A G T A C T
c   F R T L R R L F V A E L C S W M A L M T -
C C T F C A C G C T G T T T A C A C G G A T T C G T G G C G A G G G G C Y G T A C C A G G G G T G C C C A G A G
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
G G A A G T G C G A C A A A T G T G C C T A A A G C A C C C G C T C C C C G A C A T G T C C C G C A C G G G T C T
c   F T L F Y T D F V G E G L Y Q G V P R A -
C T G A C C C G G C A C C G A G G C C G S A G A C A T A T G A T G A A G G C G T T C G G A T G G G C A G C C T G G
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
G A C T C G S C C C T G G C T C C G S C C T C T G T A T A C T A C T T C G C A A G C C T A C C C G T C G G A C C
c   E P G T E A R R H Y D E G V R M G S L G -
G G C T G T C C T G C A G T G C C A T C C C C T G T C T C T C T G G T C A T G G A C C G G C T G S T G C
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
C C A C A G G A C G T C A C G C G T A G A G G A C C A G A G A G A C C A G T A C C T G G C C G A C C A C G
c   L F L Q C A I S L V F S L V M D R L V Q -
A G C G A T T C G G C A C T C G A G C A G T A T T T G G C A G T G T G G C A G C T T T C C C T G F G S C T G C C G
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
T C G C T A A G C C G T G A G C T C G T C A G A T A A A C C G G T C A C A C C G T C G A A A G G G A C A C C G A C G G C
c   R F G T R A V Y L A S V A A F P V A A G -

```

FIGURE 4 - continued

```

1381 GTGCCCATGSCCTGTCCACAGTGTGGCCGTGTGACAGCTTCAGCCGCCCTCACCGGGT 1440
CACGGTGTACGGACAGGGTGTACACACGGCACCACTGTGAAAGTCGGCGGGAGTGGCCCA
c A T C L S H S V A V V T A S A A L T G F -
1441 TCACCTTCTCAGCCCTGCAGATCTTGCCTACACACTGGCTCCCTCTACCACCGGGAGA
1500 AGTGGAGAGTCCGGACGCTTAGGACGGGATGTGTGACCGGAGGGAGATGGTGGCCCTCT
c T F S A L Q I L P Y T L A S L Y H R E K -
1501 AGCAGGTGTTCTGCCCAAATACCGAGGGGACACTGGAGTGTAGCAGTGGAGACAGCC
1560 TGGTCCACRAGGACGGGTATTATGGCTCCCTGTGACCTCCACGATGCTACTCCTGTGCGS
c Q V F L P K Y R G D T G G A S S E D S L -
1561 TGATGACRAGCTTCTGCCAGGCCCTAAGCTGGAGTCCCTTCCCTAATGSAACACTGG
1620 ACTACTGGTCGAGGACGGTCCGGGATTCGGACCTCGAGGGAAGGGATTACCTGTGCACC
c M T S F L P G P K P G A P F P N G H V G -
1621 GTGCTGGAGGCAGTGGCTGTCTCCACCTCCACCCGGCTCTGGCGGGCCCTTCCTGTG
1680 CACGACCTCCGTCCCGGACAGGGTGGAGGTGGCGGAGACGCCCGGAGACGGACAC
c A G G S G L L P P P P A L C G A S A C D -
1681 ATGTCCTCCGTACGTGTGGTGGTGGTGGGCCACCGAGGCCAGGGTGGTTCCGGCCGGG
1740 TACAGAGGCATGCAACACCACTCCGCTCCGCTCCGCTCCACCAAGGCCCGGCC
c V S V R V V V G E P T E A R V V P G R G -
1741 GCATCTGCCCTGGACCTCGCCATCTGGATAGTGCCTTCTGCTGCCAGTGGCCCAT
1800 CGTAGACGGACCTGGAGCGGTAGGACCTATCACGGAAGGACGACAGGTCCACCGGGTIA
c I C L D L A I L D S A F L L S Q V A P S -
1801 CCCGTATTATGGGCTCCATTGTCCAGCTCAGCCAGTCTGTCACTGCCATATGGTGTCTG
1860 GGGACAAATACCGAGGTACAGGTTCGAGTCCGTCAACAGTACGGATATACCAACAGAC
c L P M G S I V Q L S Q S V T A Y M V S A -
1861 CCGCAGGCCCTGGGTCTGGTCCCATTTACTTTGCTACACAGGTAGTATTGACAAAGAGCG
1920 GCGCTCCGACCCAGACRAGCGTAAATGAACGATGTGCCATCATRAACTGTTCTCGC
c A G L G L V A I Y F A T Q V V F D K S D -
1921 ACTTGGCCAAATFACTCAGCGTAGAAAACCTCCAGCACATGGGGTGGAGGGCTTCGCTCA
1980 TGAACCGTATTATGAGTCCGATCTTTGAAGTTCGTGTAACCCCACTCCCGGACGGAGT
c L A K Y S A *
1981 CTGGGTCCAGCTCCCGCTCCTGTAGCCCAATGGGGCTGCCGGCTGGCCCGCAGTTT
2040 GACCCAGGGTTCAGGGGCGAGGACAAATCGGGGTACCCCGACGGCCCGACCGGCGGTCAAA

```

FIGURE 4 - continued

2041 CTGTTGCTGCCAAAGTAAATGTTGGCTCTCTGCTGCCACCCCTGTGCTGCTGAGGTGCGTAGC 2100  
 GACAACGACGGTTTCATTACCCGAGAGACGACGGTGGGACACGACGACTCCACGCATCG  
 2101 TGCACAGCTGGGGGCTGGGGCGTCCCTCTCCTCTCCCCAGTCTCTAGGGCTGCCTGAC 2160  
 ACGTGTGACACCCCGACCCCGCAGGGAGAGAGAGGGTCCAGAGATCCCGACGGACTG  
 2161 TGGAGGCCTTCCAAGGGGTTTCAGTCTGGACTTATACAGGGAGGCCGAGAGGGCTCCAT 2220  
 ACCTCGGAAAGTTCGCCCAAGTCCAGACTGAAATGTCCCTCCGGTCTTCCCGAGGTA  
 2221 GCACGTGAATGCGGGGACTCTGACAGTGGATTACCCAGGCTCAGGGTTACAGCTAGCCT 2280  
 CGTGACCTTACGCCCTGAGACGTCCACTAATGGTCCGAGTCCCAATTGTGATCGGA  
 2281 CCTAGTTGAGACACACCTAGAGAAAGGTTTTTGGGAGCTGAATAAACTCAGTCACTGGT 2340  
 GGATCAACTCTGTGTGGTCTCTTCCRAAAAACCTCGACTTATTTGAGTCACTGGACCA  
 2341 TTCCCATCTPAAGCCCTTAACCTGAGCTTCGTTAAATGTAAGTCTTGCATGGGAGTT 2400  
 AAGGTAGAGATTGCGGGAAATGGAAGTCCGAAAGCAAAATACATCGAGAACGTACCTCAA  
 2401 TCTAGGATGAAACACTCCCTCATTGGGATTTGAACATATGAAGTTAATTTAGGGGGAAGA 2460  
 AGATCCTACTTTGTGAGGAGGTACCTTAACTTGTATACTTTCAATAAAGCATCCCTTCT  
 2461 GTCCGTAGGGGCAACACAAAGAACCAGTCCCTCAGCCACAGCACTGTCTTTTGTCT 2520  
 CAGGACTCCCGTTGTGTCTTGTGCTCAGGGGAGTGGGTGTCTGACAGAAAACGA  
 2521 GATCCACCCCTCTTACCTTTATCAGGATGTGGCTGTGGTCTCTGTGTGCCATCA 2580  
 CTAGTGGGGGGAATGGAAAATAGTCTACACCGGACAAACAGGAGACAAAGGTAGT  
 2581 CAGAGACACAGCATTAAATATTAATTTAATTTAATTAACAAAGTAGAAGGGAATCCAT 2640  
 GTCTCTGTGTCGTAATTTATAAATTAATAAATAAATTTTTCATCTCCCTTAGGTA  
 2641 TGCTAGCTTTTCTGTGTGGTCTAAATTTGGGTAGGGTGGGGATCCCAACAAATCA 2700  
 ACGATCGAAAGACACACACAGATTATAAACCATCCACCCCTAGGGTGTGTAGT  
 2701 GGTCCCTGAGATAGCTGGTCAATGGGCTGATCATGGCAGAATCTTCTTCCGGGGT 2760  
 CAGGGGACTCTATCGACCAGTAAACCGACTAGTACGGTCTTAGAAGAGAGGACCCCA  
 2761 CTGGCCCCAAAATGCCTAACCCAGGACCTTGGAAATCTACTCATCCCAATGATAAT 2820  
 GACCAGGGGTTTACGGATTGGTCTTGAACCTTTAAGATGAGTAGGGTTACTATTA  
 2821 TCCAAATGCTGTATCCCAAGGTAGGGTGTGAGGAGAGTGGGGTGGGGCTTCCAGT 2880  
 AGGTTACGACATGGGTTCCATCCCACTTCCCTCCATCTCCCAACCCGAAAGTCCA  
 2881 CTCACGGCTTCCCTAACCCCTCTCTCTGSCCCAGCCTGGTCCCCCACTTCCA 2940  
 GAGTTCCGAGGGATTGGTGGGAGAGAGAACCGGTCGGHCCAGGGGGTGAAGST  
 2941 CTCCTCTACTCTCTAGGACTGGGCTGATGAGGCACTGCCAAAATTCCTCCTACC 3000  
 GAGGGAGATGAGAGAGATCCTGACCCGACTACTCCGTGACGGGTTTAAAGGGATGG

WO 01/81577

10/12

PCT/US01/13323

## FIGURE 4 - continued

```

3001 CCCAACTTCCCTACCCCAACTTCCCCACCAGCTCCACAACCCGTTTGGAGCTACT 3060
      GGGTTGAAAGGGGATGGGGTTGAAAGGGGTGGTCCGAGGTGGGACAAACCTCGATGA

3061 GCAGGACGAGAGCACAAGTGCCTTCCCAAGCCTTGTCCATCTAGCCCCCAGAT 3120
      CBTCCGTGCTTCGTGTTTCCACGCCAAAGGGTTCGGAAACAGGTAGAGTCGGGGTCTCA

3121 ATATCTGTGCTTGGGAACTCACACAGAACTCAGGAGCACCCCTGCTGAGCTAAGG 3180
      TATAGACCGAACCCCTTAGAGTGTGCTTTGAGTCTCTGGGGGACGGACTCGATTCC

3181 GAGGTCTTATCTCTCAGGGGGGGTTTANGTCCGCTTGGCAATAATGCTCTTATTTAT 3240
      CTCAGATAGAGAGTCCCCCCAAATTCACGGCAACGTTATACAGCAGATAAATA

3241 TTAGCGGGTGAATATTTTATACTGTAAAGTGAATCAGAGTATAATGTTTATGTTGAC 3300
      AATCGCCCACTTATAAAATATGACATTCACCTGTTAGTCTCATATTCAAATACCCTG

3301 AAATTAAGGCTTCTTAT 3320
      TTTAATTTCCGAAGAATA

```

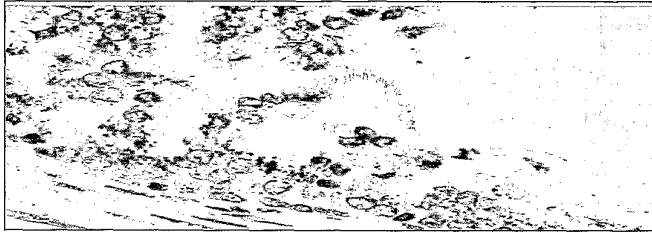


WO 01/81577

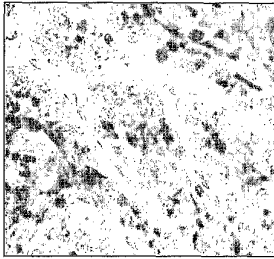
12/12

PCT/US01/13323

Fig. 6: Immunohistochemical staining of PROST 03 expression: PROST 03 expressing cells are shown in red.



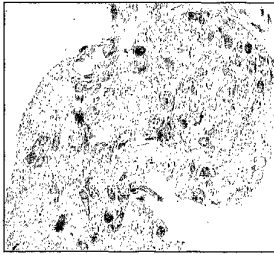
6a: Normal Prostate



6b: Prostate Carcinoma



6c: Lymph Node, Metastatic Prostate Carcinoma



6d: Bone Marrow, Metastatic Prostate Carcinoma



6e: Bone, Metastatic Prostate Carcinoma

WO 01/81577

PCT/US01/13323

SEQUENCE LISTING

<110> Lau, Ted  
 Lin, Rick  
 Parkes, Debbie  
 Parfy, Gordon  
 Schneider, Douglas  
 Steinbrecher, Renate  
 Van Heuit, Pam T  
 Wu, John

<120> DNA Encoding a Novel PROST 03

<130> 51831AWOM1

<140>

<141>

<150> 60/200,065

<151> 2000-04-27

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3320

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (282)..(1943)

<400> 1

```

gaaccagcct gcaagcgctg gctccgggtg acagccgcgc gcctcggcca ggatctgagt 60
gatgagacgt gtcccactg aggtgccccca cagcagcagg tgttgagcat gggctgagaa 120
gctggaccgg caccaaaggg ctggcagaaa tgggcgcctg gctgattcct aggcagtgg 180
cggcagcaag gaggagaggg cgcagcttct ggagcagagc cgagacgaag cagttctgga 240
gtgcctgaac ggccccctga gccctaccgg cctggcccac t atg gtc cag agg ctg 296
                                     Met Val Gln Arg Leu
                                     1 5

tgg gtg agc cgc ctg ctg cgg cac cgg aaa gcc cag ctc ttg ctg gtc 344
Tyr Val Ser Arg Leu Leu Arg His Arg Lys Ala Gln Leu Leu Leu Val
                                     10 15 20

aac ctg cta acc ttt ggc ctg gag gtg tgt ttg gcc gca ggc atc acc 392
Asn Leu Leu Thr Phe Gly Leu Glu Val Cys Leu Ala Ala Gly Ile Thr
                                     25 30 35

tat gtg ccg cct ctg ctg ctg gaa gtg ggg gta gag gag aag ttc atg 440
Tyr Val Pro Pro Leu Leu Leu Glu Val Gly Val Glu Glu Lys Phe Met
                                     40 45 50

```

WO 01/81577

PCT/US01/13323

```

acc atg gtg ctg ggc att ggt cca gtg ctg ggc ctg gtc tgt gtc ccg 488
Thr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys Val Pro
55 60 65

ctc cta ggc tca gcc agt gac cac tgg cgt gga cgc tat gcc cgc cgc 536
Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly Arg Arg
70 75 80 85

cgg ccc ttc atc tgg gca ctg tcc ttg ggc atc ctg ctg agc ctc ttt 584
Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser Leu Phe
90 95 100

ctc atc cca agg gcc ggc tgg cta gca ggg ctg ctg tgc ccg gat ccc 632
Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro
105 110 115

agg ccc ctg gag ctg gca ctg ctc atc ctg ggc gtg ggg ctg ctg gac 680
Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu Leu Asp
120 125 130

ttc tgt ggc cag gtg tgc ttc act cca ctg gag gcc ctg ctc tct gac 728
Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu Ser Asp
135 140 145

ctc ttc cgg gac ccg gac cac tgt cgc cag gcc tac tct gtc tat gcc 776
Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ala
150 155 160 165

ttc atg atc agt ctt ggg ggc tgc ctg ggc tac ctc ctg cct gcc att 824
Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Ile
170 175 180

gac tgg gac acc agt gcc ctg gcc ccc tac ctg ggc acc cag gag gag 872
Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu Glu
185 190 195

tgc ctc ttt ggc ctg ctc acc ctc atc ttc ctc acc tgc gta gca gcc 920
Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val Ala Ala
200 205 210

aca ctg ctg gtg gct gag gag gca gcg ctg ggc ccc acc gag cca gca 968
Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu Pro Ala
215 220 225

gaa ggg ctg tcg gcc ccc tcc ttg tcg ccc cac tgc tgt cca tgc cgg 1016
Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro Cys Arg
230 235 240 245

gcc cgc ttg gct ttc cgg aac ctg ggc gcc ctg ctt ccc cgg ctg cac 1064
Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg Leu His
250 255 260

cag ctg tgc tgc cgc atg ccc cgc acc ctg cgc cgg ctc ttc gtg gct 1112
Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe Val Ala
265 270 275

```

WO 01/81577

PCT/US01/13323

gag ctg tgc agc tgg atg gca ctc atg acc ttc acg ctg ttt tac acg 1160  
 Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe Tyr Thr  
 280 285 290

gat ttc gtg ggc gag ggg ctg tac cag ggc gtg ccc aga gct gag cgg 1208  
 Asp Phe Val Gly Glu Tyr Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu Ser  
 295 300 305

ggc acc gag gcc cgg aga cac tat gat gaa ggc gtt cgg atg ggc agc 1256  
 Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met Gly Ser  
 310 315 320 325

ctg ggg ctg ttc ctg cag tgc gcc atc tcc ctg gtc ttc tct ctg gtc 1304  
 Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser Leu Val  
 330 335 340

atg gac cgg ctg gtg cag cga ttc ggc act cga gca gtc tat ttg gcc 1352  
 Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr Leu Ala  
 345 350 355

agt gtg gca gct ttc cct gtg gct gcc ggt gcc aca tgc ctg tcc cac 1400  
 Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu Ser His  
 360 365 370

agt gtg gcc gtg gtg aca gct tca gcc gcc ctc acc ggg ttc acc ttc 1448  
 Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe Thr Phe  
 375 380 385

tca gcc ctg cag atc ctg ccc tac aca ctg gcc tcc ctg tac cac cgg 1496  
 Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr His Arg  
 390 395 400 405

gag aag cag gtg ttc ctg ccc aaa tac cga ggg gac act gga ggt gct 1544  
 Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Ala  
 410 415 420

agc agt gag gac agc ctg atg acc agc ttc ctg cca gcc oct aag cct 1592  
 Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro Lys Pro  
 425 430 435

gga gct ccc ttc cct aat gga cac gtg ggt gct gga gcc agt gcc ctg 1640  
 Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu  
 440 445 450

ctc cca cct cca ccc gcg ctc tgc ggg gcc tct gcc tgt gat gtc tcc 1688  
 Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp Val Ser  
 455 460 465

gta cgt gtg gtg gtg ggt gag ccc acc gag gcc agg gtg gtt ccg gcc 1736  
 Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val Pro Gly  
 470 475 480 485

cgg gcc atc tgc ctg gac ctc gcc atc ctg gat agt gcc ttc ctg ctg 1784  
 Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe Leu Leu  
 490 495 500

WO 01/81577

PCT/US01/13323

tcc cag gtg gcc cca tcc ctg ttt atg ggc tcc att gtc cag ctg agc 1832  
 Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln Leu Ser  
 505 510 515

cag tct gtc act gcc tat atg gtg tct gcc gca ggc ctg ggt ctg gtc 1880  
 Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu Val  
 520 525 530

gcc att tac ttt gct aca cag gta gta ttt gac aag agc gac ttg gcc 1928  
 Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp Leu Ala  
 535 540 545

aaa tac tca gcg tag aaaacttcca gcacattggg gtggagggcc tgcctcactg 1983  
 Lys Tyr Ser Ala  
 550

ggteccagct ccccgctcct gttagcccca tggggctgoc gggctggccg ccagtttctg 2043  
 ttgctgccaa agtaatgtgg ctctctgtgt ccacctgtg ctgctgaggt gcgtagctgc 2103  
 acagctgggg gtggtggcgt cctctctctc tctcccagct ctctagggt cctgactgg 2163  
 aggccttcca aggggtttc agtctgact tatacagga ggcocagaag gctccatgca 2223  
 ctggaatgcg gggactctgc agtggaatta cccagctca ggttaacag ctgacctct 2283  
 agttgagaca cacctagaga aggtttttg ggagctaat aaactcagtc acctggttc 2343  
 ccatctctaa gcccttaac ctgcagcttc gtttaagtga gctctgcat gggagttct 2403  
 aggatgaaac actcctccat gggattgaa catatgaaag ttattgtag ggaagagtc 2463  
 ctgaggggca acacacaaga accaggtccc ctccagccac agcactgtct ttttctgat 2523  
 ccacccccct cttacctttt atcaggatgt ggcctgttgg tcttctggt gccatcacag 2583  
 agacacagcg atttaaatat ttaacttatt tatttaacaa agtgaaggg aatccattgc 2643  
 tagcttttct gtgttggtgt ctaaatattg gtaggggtgg gggatcccca acaatcaggt 2703  
 cccctgagat agctggtcat tgggtgctc attgcccagaa tcttctctc ctgggtctg 2763  
 gcccccacaa atgcctaacc caggacctg gaaattctac tcatcccaaa tgataattcc 2823  
 aaatgctgtt acccaagggt aggggttga aggaagtag aggggtgggc ttcaggtctc 2883  
 aacggctcc ctaaccaccc ctctctctct ggcacagct ggttccccc acttccactc 2943  
 cctctactc tctctaggac tgggtctgag aaggcactgc ccaaaatttc cctaccccc 3003  
 aacttcccc taccoccaac tttcccccac agctccacaa cctgttttgg agctactgca 3063  
 ggaccagaag cacaaagtgc ggtttcccaa gcccttctcc atctcagccc ccagagtata 3123  
 tctgtgcttg gggaaatcca cacagaaact caggagcacc cctgctctga gctaagggag 3183  
 gcttatctc tcaggggggg gtttaagtgc cgtttgcaat aatgtcgtct tatttattt 3243

WO 01/81577

PCT/US01/13323

gcgggggtgaa tattttatatac tgtaagttag caatcagagt ataagtgtta tggtagacaaa 3303  
 attaaaggct ttctttat 3320

<210> 2  
 <211> 553  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Val Gln Arg Leu Trp Val Ser Arg Leu Leu Arg His Arg Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Leu Leu Val Asn Leu Leu Thr Phe Gly Leu Glu Val Cys Leu  
 20 25 30  
 Ala Ala Gly Ile Thr Tyr Val Pro Pro Leu Leu Glu Val Gly Val  
 35 40 45  
 Glu Glu Lys Phe Met Thr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly  
 50 55 60  
 Leu Val Cys Val Pro Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Tyr Gly Arg Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile  
 85 90 95  
 Leu Leu Ser Leu Phe Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu  
 100 105 110  
 Leu Cys Pro Asp Pro Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly  
 115 120 125  
 Val Gly Leu Leu Asp Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu  
 130 135 140  
 Ala Leu Leu Ser Asp Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala  
 145 150 155 160  
 Tyr Ser Val Tyr Ala Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr  
 165 170 175  
 Leu Leu Pro Ala Ile Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu  
 180 185 190  
 Gly Thr Gln Glu Glu Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu  
 195 200 205  
 Thr Cys Val Ala Ala Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly  
 210 215 220  
 Pro Thr Glu Pro Ala Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His  
 225 230 235 240

WO 01/81577

PCT/US01/13323

Cys Cys Pro Cys Arg Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu  
 245 255  
 Leu Pro Arg Leu His Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg  
 260 270  
 Arg Leu Phe Val Ala Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe  
 275 285  
 Thr Leu Phe Tyr Thr Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val  
 290 300  
 Pro Arg Ala Glu Pro Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly  
 305 320  
 Val Arg Met Gly Ser Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu  
 325 335  
 Val Phe Ser Leu Val Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg  
 340 350  
 Ala Val Tyr Leu Ala Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala  
 355 365  
 Thr Cys Leu Ser His Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu  
 370 380  
 Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala  
 385 400  
 Ser Leu Tyr His Arg Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly  
 405 415  
 Asp Thr Gly Gly Ala Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu  
 420 430  
 Pro Gly Pro Lys Pro Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala  
 435 445  
 Gly Gly Ser Gly Leu Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser  
 450 460  
 Ala Cys Asp Val Ser Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala  
 465 480  
 Arg Val Val Pro Gly Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp  
 485 495  
 Ser Ala Phe Leu Leu Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser  
 500 510  
 Ile Val Gln Leu Ser Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala  
 515 525  
 Gly Leu Gly Leu Val Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp  
 530 540

WO 01/81577

PCT/US01/13323

Lys Ser Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Ala  
545 550

<210> 3  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3  
ggtggcgagc actcctggag cc 22

<210> 4  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4  
gacaccagac caactgtaa tg 22

<210> 5  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5  
cacctccagt gtcccctcgg tatttgg 27

<210> 6  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6  
cacactgtgg gacaggcatg tggcacc 27

<210> 7  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

WO 01/81577

PCT/US01/13323

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7
actgaattcg ccaccatggt ccagaggctg tgg          33

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
ccatccagct gcacagctca g          21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9
cctcccagc tctgtctgat          20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10
atggcgcact gcaggaac          18

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: probe

<400> 11
tgcaggcgtt cggatgggc          19

<210> 12
<211> 21

```

WO 01/81577

PCT/US01/13323

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12  
attcggcact cgagcagtct a 21

<210> 13  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13  
tgagggcggc tgaagct 17

<210> 14  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: probe

<400> 14  
cagccatgtg gcaccggca 19

<210> 15  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15  
cagccagtct gtcactgcct at 22

<210> 16  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 16  
tcgtctttgt caastactac ctgtgta 27

WO 01/81577

PCT/US01/13323

<210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: probe

<400> 17  
 ccagcctgcg gcagacacca 20

<210> 18  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18  
 Val Pro Pro Leu Leu Leu Glu Val Gly Val Glu Glu Lys Phe  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19  
 Tyr Thr Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Pro

<210> 20  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20  
 Glu Pro Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met  
 1 5 10 15

<210> 21  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe  
 20 25

WO 01/81577

PCT/US01/13323

<210> 22  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro Arg Pro Leu Glu  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 Ile Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu  
 1 5 10 15

Glu

<210> 24  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Asp Lys Ser Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Ala  
 1 5 10

<210> 25  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25  
 Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu Gly  
 1 5 10 15

Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg  
 20 25

<210> 26  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26  
 Pro Thr Glu Pro Ala Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His  
 1 5 10 15



WO 01/81577 A3



LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**Published:**  
— with international search report

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

**(88) Date of publication of the international search report:**  
23 May 2002

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/13323
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61K31/7088 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N C12Q A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 37093 A (CORIXA CORP) 27 August 1998 (1998-08-27) see SEQ ID NO: 110 and 113 (pp. 79, 80, 83 and 84) page 1 -page 22; claims 1-11,17-25	1-38
X	WO 98 50567 A (ABBOTT LAB) 12 November 1998 (1998-11-12) see SEQ ID NO: 15,16,36,37,39 (pp.94,95,100,101) page 1 -page 53; claims 1-39; examples 1-3,10,11,13-20	1-38
X	WO 99 67384 A (SPRINZAK EINAT A ;INCYTE PHARMA INC (US); KLINGLER TOD M (US); VOL) 29 December 1999 (1999-12-29) see SEQ ID NO: 4 (Fig. 3,4,6,7) page 1 -page 38; claims 6-16	1-38
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 January 2002		Date of mailing of the international search report 21/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Oderwald, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/13323

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 34802 A (HARLOCKER SUSAN L ;CORIXA CORP (US); DAY CRAIG H (US); JIANG YUQIU) 17 May 2001 (2001-05-17) see SEQ ID NO: 110, 113, 520, 542, 546-548, 551 (pp. 46, 47, 49, 50) page 1 -page 55; claims 1-36; figures 3-11; examples 1, 2, 6, 2, 7, 12, 17-19	1-38

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/US 01/3323

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 28 (in so far as in vivo methods are concerned), 29-31 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claim 34 (in so far as in vivo methods are concerned) is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/13323

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9837093	A	27-08-1998	US 6261562 B1	17-07-2001
			AU 731840 B2	05-04-2001
			AU 6181898 A	09-09-1998
			BR 9808881 A	11-09-2001
			CN 1252837 T	10-05-2000
			EP 1005546 A2	07-06-2000
			HU 0002095 A2	28-10-2000
			NO 994069 A	22-10-1999
			PL 335348 A1	25-04-2000
			TR 9902053 T2	21-04-2000
			US 6262245 B1	17-07-2001
			WO 9837093 A2	27-08-1998
			US 6329505 B1	11-12-2001
			ZA 9801585 A	04-09-1998
WO 9850567	A	12-11-1998	US 6130043 A	10-10-2000
			WO 9850567 A1	12-11-1998
			US 6252047 B1	26-06-2001
WO 9967384	A	29-12-1999	AU 4823599 A	10-01-2000
			EP 1088072 A2	04-04-2001
			WO 9967384 A2	29-12-1999
WO 0134802	A	17-05-2001	US 6329505 B1	11-12-2001
			AU 1656501 A	06-06-2001
			AU 6158700 A	30-01-2001
			WO 0104143 A2	18-01-2001
			WO 0134802 A2	17-05-2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 15/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/82	
C 0 7 K 14/82	C 0 7 K 16/32	
C 0 7 K 16/32	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/54	
	C 1 2 P 21/08	

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

- (72) 発明者 ラウ, テッド  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 0 1, アラメダ, エンシナル アベニュー 3 3 0 7
- (72) 発明者 リン, リチャード ジェイ.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 2 6, ダンビル, ヒル メドー プレイス 1 0 2 6
- (72) 発明者 パークス, デボラ  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 4 1, ヘイワード, ハンプトン プレイス 1 9 0 5 0
- (72) 発明者 バリー, ゴードン  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 9 6, ウォルナット クリーク, ハッカモア コート 2 2 5 5
- (72) 発明者 シュナイダー, ダグラス ダブリュ.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 4 9, ラファイエット, ウォルナット レーン 3 3 2 9
- (72) 発明者 スタインブレッチャー, レナーテ  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 9 6, ウォルナット クリーク, ハッカモア コート 2 2 5 5
- (72) 発明者 バン ヒューイット, パメラ トイ  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 5 6, モラガ, キャンポリンドー ドライブ 3 9 6 5
- (72) 発明者 ウー, ジョン  
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 1 7 4 1, カーライル, ウッドランド ロード 8 7
- F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA36 CA04 CA11 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12  
 EA04 GA11 HA12  
 4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QX02

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA05 DA14  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA45 CA46  
4C084 AA01 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA30 DC01 NA14  
ZA812 ZB212 ZB262  
4C085 AA14 BB01 CC03 EE01  
4C086 AA01 BC42 BC43 CB07 DA38 EA17 EA18 NA14 ZA81 ZB21  
ZB26  
4C087 AA01 BC83 NA14 ZA81 ZB21 ZB26  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 DA86 EA28  
EA31 EA50 EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	编码新型PROST 03多肽的DNA		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004504811A</a>	公开(公告)日	2004-02-19
申请号	JP2001578648	申请日	2001-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	先灵公司		
申请(专利权)人(译)	先灵股份公司		
[标]发明人	ラウテッド リンリチャードジェイ パークステボラ パリーゴードン シュナイダーダグラスダブリュ スタインプレッチャーレナーテ バンヒューイットパメラトイ ウージョン		
发明人	ラウ,テッド リン,リチャード ジェイ. パークス,デボラ パリー,ゴードン シュナイダー,ダグラス ダブリュ. スタインプレッチャー,レナーテ バン ヒューイット,パメラ トイ ウー,ジョン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/46 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P15/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/ /32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1 /68		
CPC分类号	A61K31/7088 A61K38/00 A61K2039/505 A61P15/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/28 C07K16/3069 C07K2317/34		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P15/00 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/ /21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D C12N5/00.A A61K37/02 A61K37/54 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024 /DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063 /QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084 /BA23 4C084/CA18 4C084/CA30 4C084/DC01 4C084/NA14 4C084/ZA812 4C084/ZB212 4C084 /ZB262 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/BC42 4C086/BC43 4C086/CB07 4C086/DA38 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZB21 4C086 /ZB26 4C087/AA01 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA81 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045 /DA86 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	60/200065 2000-04-27 US		

外部链接

[Espacenet](#)

## 摘要(译)

本发明涉及新的人多肽，命名为PROST 03，其表现出对前列腺组织显示高特异性的表达模式，编码多肽的多核苷酸，产生多肽的方法，表达载体和用于表达多肽的基因工程宿主细胞。本发明还涉及在研究，诊断和治疗应用中利用多核苷酸和多肽的方法。

