

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-148264

(P2009-148264A)

(43) 公開日 平成21年7月9日(2009.7.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 H	
審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 109 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-329870 (P2008-329870)	(71) 出願人	500553659 アジェンシス、インコーポレイテッド
(22) 出願日	平成20年12月25日 (2008.12.25)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 904
(62) 分割の表示	特願2002-509772 (P2002-509772) の分割		04, サンタ モニカ, コロラド ブ
原出願日	平成13年7月12日 (2001.7.12)		ールバード 2225
(31) 優先権主張番号	09/615,285	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成12年7月12日 (2000.7.12)	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506 弁理士 小林 智彦
		(74) 代理人	100130845 弁理士 渡邊 伸一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膀胱癌、卵巣癌、肺癌、および腎臓癌の診断および治療に有用な腫瘍抗原

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】前立腺特異的でアンドロゲン制御される細胞膜結合型の分泌セリンプロテアーゼに由来する、またはそれに基づく、膀胱癌、肺癌、卵巣癌、および腎臓癌の診断および治療のための組成物を提供する。

【解決手段】20P1F12/TMPRSS2遺伝子の全長cDNA。検出マーカーまたは毒素で標識された抗体を含む20P1F12/TMPRSS2タンパク質、およびそのポリペプチド断片に結合する抗体、または治療用組成物。20P1F12/TMPRSS2の状態を、それに相当する正常な試料のものと比較する生体試料の予診的および診断的方法。生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態の変化が無制御細胞増殖に関係する。更に、膀胱癌、肺癌、卵巣癌、及び腎臓癌を治療するための様々な治療用組成物およびストラテジー、特に20P1F12/TMPRSS2抗体療法および組成物、癌ワクチン、並びに低分子療法を含む。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態と、それに相当する正常な試料における20P1F12/TMPRSS2の状態を比較する段階を含む、無制御細胞増殖の証拠を生体試料において検査する方法であって、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態の変化が無制御細胞増殖に関係し、無制御細胞増殖が膀胱無制御細胞増殖、肺無制御細胞増殖、腎臓無制御細胞増殖、または卵巣無制御細胞増殖より選択される、方法。

## 【請求項 2】

生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態が20P1F12/TMPRSS2 mRNAの発現量または20P1F12/TMPRSS2タンパク質の発現量を検査することにより評価される、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態が20P1F12/TMPRSS2免疫反応性複合体の有無を観察することにより評価される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態が、サザン解析、ノーザン解析、ポリメラーゼ連鎖反応解析、及び、免疫測定法からなる群より選択される方法により評価される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

生体試料が血液、血清、便、尿、精液、及び生検組織からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

無制御細胞増殖が膀胱癌を示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

無制御細胞増殖が肺癌を示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

無制御細胞増殖が腎臓癌を示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

無制御細胞増殖が卵巣癌を示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態が、遊離20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド濃度、結合相手と複合した20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの濃度、または遊離20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド濃度と結合相手と複合した20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの濃度を比較した場合の比率を測定する免疫測定法により評価される、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

生体試料において評価された20P1F12/TMPRSS2が無制御増殖を示す細胞から分泌されている、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

生体試料における新生物の証拠を同定する方法であって、

(a) 被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量を検査する段階、および

(b) 被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量を、同等の正常生体試料に見出される20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量と比較する段階

40

を含む方法であり、正常生体試料に対する被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物の量の差が新生物に関連し、該新生物が膀胱、肺、腎臓、卵巣、または転移性の新生物から選択される方法。

## 【請求項 13】

新生物が膀胱癌である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

新生物が肺癌である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 15】

新生物が腎臓癌である、請求項 12 に記載の方法。

50

## 【請求項 16】

新生物が卵巣癌である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 17】

被験生体試料が血液、血清、便、尿、精液、及び生検組織からなる群より選択される、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 18】

被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量が20P1F12/TMPRSS2 mRNA発現量を検査することにより評価される、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 19】

被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量が20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現量を検査することにより評価される、請求項 12 に記載の方法。

10

## 【請求項 20】

被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量がサザン解析、ノーザン解析、ポリメラーゼ連鎖反応解析、及び免疫測定法からなる群より選択される方法により評価される、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 21】

被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現のレベルが遊離20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド濃度、または結合相手と複合した20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド濃度を測定する免疫測定法により評価される、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 22】

被験生体試料において評価された20P1F12/TMPRSS2が無制御増殖を示す細胞より分泌される、請求項 21 に記載の方法。

20

## 【請求項 23】

無制御増殖を示す細胞が膀胱癌、肺癌、卵巣癌、または転移癌の細胞である、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

個体において癌を検出する方法であって、

(a) 個体から得た被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現を検査する段階、および

(b) 無制御細胞増殖に関連する因子の有無を個体において検査する段階

30

を含む方法であり、個体より得た被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現と無制御細胞増殖に関連する因子の存在との同時発生が癌を示唆し、該癌が膀胱癌、肺癌、腎臓癌、卵巣癌、または、転移癌から選択される方法。

## 【請求項 25】

癌が膀胱癌である、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

癌が肺癌である、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 27】

癌が腎臓癌である、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 28】

癌が卵巣癌である、請求項 24 に記載の方法。

40

## 【請求項 29】

被験生体試料が血液、血清、便、尿、精液、及び生検組織からなる群より選択される、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 30】

被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量が20P1F12/TMPRSS2 mRNA発現量または20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド発現量を検査することにより評価される、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 31】

被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量がサザン解析、ノーザン解析、ポリメ

50

ラーゼ連鎖反応解析、及び免疫測定法からなる群より選択される方法により評価される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 2】

被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現が遊離20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド濃度または結合相手と複合した20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド濃度を測定する免疫測定法により評価される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 3】

被験生体試料において評価された20P1F12/TMPRSS2が無制御増殖を示す細胞より分泌される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

20P1F12/TMPRSS2を発現する新生細胞の増殖を抑制する方法であって、新生細胞の増殖を抑制するために新生細胞により発現される20P1F12/TMPRSS2を有効な量の抗20P1F12/TMPRSS2抗体に接触させる段階を含み、該新生細胞が膀胱新生細胞、肺新生細胞、卵巣新生細胞、または転移性新生細胞から選択される方法。

10

【請求項 3 5】

20P1F12/TMPRSS2を発現する新生物の進行を抑制する方法であって、新生物の進行を抑制するために新生物により発現される20P1F12/TMPRSS2を有効な量の抗20P1F12/TMPRSS2抗体に接触させる段階を含み、該新生物が膀胱新生物、肺新生物、卵巣新生物、または転移性新生物から選択される方法。

【請求項 3 6】

抗体が主に20P1F12/TMPRSS2の細胞表面結合ドメイン内のエピトープと結合する、請求項 3 5 に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

抗体が細胞毒性物質と結合している、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの免疫原性部分と生理的に許容される担体とを含む、20P1F12/TMPRSS2を発現する癌の治療のためのワクチン組成物であって、該癌が膀胱癌、肺癌、卵巣癌、または転移癌より選択される組成物。

【請求項 3 9】

患者に有効な量の請求項 3 8 に記載のワクチン組成物を投与する段階を含む、患者において20P1F12/TMPRSS2を発現する細胞の増殖を抑制する方法であって、該患者が膀胱癌、肺癌、卵巣癌、または転移癌より選択される癌を有する方法。

30

【請求項 4 0】

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列またはその浸潤阻害断片を含む20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドを細胞の環境に導入する段階であってそれにより浸潤が阻害される段階を含む、腫瘍細胞による浸潤を阻害する方法。

【請求項 4 1】

20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドが、配列番号：2 に記載の配列の255～492位のアミノ酸を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

細胞を有効な量の20P1F12/TMPRSS2 mRNAに相同なオリゴヌクレオチドと接触させる段階を含む、細胞における20P1F12/TMPRSS2タンパク質の発現を抑制する方法。

40

【請求項 4 3】

新生細胞を有効な量の20P1F12/TMPRSS2抗体と接触させる段階であってそれにより新生細胞の増殖を抑制する段階を含む、腎臓新生細胞の増殖を抑制する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、1999年6月1日に提出された米国特許出願第09/323,597号の一部継続出願である2000年7月12日に提出された米国特許出願第09/615,285号の一部継続出願であり、1998

50

年6月1日に提出された米国仮特許出願第60/087,598号、1998年6月29日提出の米国仮特許出願第60/091,474号、及び、1999年4月14日提出の米国仮特許出願第60/129,521号の恩典を請求する。これにより上記特許出願及び仮特許出願の内容の全ては、本出願に参考文献として含まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

男性において前立腺癌は最も頻りに診断される癌であり、死亡原因として二番目に多い癌である。毎年、およそ45,000人の男性がこの疾患により死亡する。また、肺癌のみが更に高い死亡率を示す。男性が一生の内に浸潤性の前立腺癌に侵される可能性は6分の1である。50歳の男性においては、前立腺癌に侵される可能性が40%以上であり、この疾患により死亡する可能性はおよそ3%である。限局性の腫瘍に対する治療には、多少の進歩がとげられているものの、前立腺癌は一度転移すると不治の病となる。転移性前立腺癌の患者はホルモンアブレーション療法による治療を受けるが、短期間の成功しか見られない。結局は、これらの患者にはアンドロゲン不応状態が生じ、病気が進行して死に至る。

10

【0003】

前立腺癌の取扱いにおいて存続している基本的な問題は、正確に初期の限局性腫瘍を検出できる、ならびに/または、疾患に対する感受性および疾患の進行を予測できる確実な診断および予診マーカーが存在しないことである。現在、前立腺癌の早期検出および診断は、デジタル直腸検査(digital rectal examination: DRE)、前立腺特異的抗原(prostate specific antigen: PSA)測定、経直腸超音波検査(transrectal ultrasonography: TRUS)、及び、経直腸針生検(transrectal needle biopsy: TRNB)の方法に依存している。DREと組合せた血清PSA測定は、現在の代表的な診断方法である。しかしながら、この方法には大きな障壁が存在し、そのため、この疾患のより良い診断マーカーの探索に重点的に研究努力が注がれた。多数のマーカーが確認され、その内の少なくとも一つであるPSAが臨床で一般的に使用されている。しかしながら、理想的な前立腺腫瘍マーカーを得ることは非常に難しく、疾患の進行を確実に予測できるマーカーは未だに得られていない。このように、前立腺癌の取扱いにおては、より確実かつ多くの情報を提供する診断および予診方法が必要とされている。

20

【0004】

更に、再発性疾患に侵される患者、または、転移性疾患と診断された患者に対する有効な治療法が無いため、治療標的に適当となり得る前立腺特異的蛋白質の同定にも大きな関心が寄せられている。ホルモンアブレーション療法はこのような患者の症状を緩和することはできるが、大多数は必然的に病気が進行し、不治のアンドロゲン非依存性疾患を発症する(Lalaniら、1997, Cancer Metastasis Rev. 16:29-66(非特許文献1))。

30

【0005】

PSAは、前立腺癌のスクリーニング、診断、および、追跡に現在最も広く使用されている腫瘍マーカーである。特に、血清PSA測定の為のいくつかの免疫測定法が臨床で一般的に使用されている。最近、血清におけるPSA mRNAの為の逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)解析法が開発された。しかしながら、高いPSA値は多くのBPH及び前立腺炎患者(25~86%)において検出され(Gaoら、1997, Prostate 31:264-281(非特許文献2))、更に、他の悪性ではない疾患や一部の正常な男性においても検出されるため、PSAは疾患特異的マーカーではなく、また、このことはこのマーカーの診断的特異性を著しく制限する要素である。例えば、4~10ng/mlの範囲内の血清PSAの上昇はBPHにおいて見られ、更に高い値が前立腺炎、特に急性前立腺炎において見られる。BPHは男性に非常に一般的に見られる症状である。更に混乱を招く状況としては、DREによる疾患の兆候が全く無くても血清PSAの上昇が見られることであり、またその逆もあり得る。更に、現在では、PSAが前立腺特異的ではなく、多様な複雑な生物活性を有することが認識されている(例えば、Fortierら、J. Natl. Cancer Inst. 1999, 91(19):1635-40(非特許文献3)参照)。

40

50

## 【 0 0 0 6 】

P S A に基づく検出の特異性を向上するために考案された P S A 密度や、遊離 P S A 対複合 P S A の比率を測定すること等の様々な方法が報告されてきた。しかしながら、いずれの方法も、良性と悪性の前立腺疾患を再現性良く識別することができなかった。その上、P S A 診断の感度は 57 ~ 79% のため (Cupp & Osterling, 1993, Mayo Clin Proc 68:297-306 (非特許文献 4))、疾患を有するかなりの人数の男性において前立腺癌を見逃すこととなる。

## 【 0 0 0 7 】

前立腺特異的膜抗原 (Prostate-Specific Membrane Antigen: PSMA) は最近報告された前立腺癌の細胞表面マーカーであり、診断および治療用マーカーとしての使用を評価する様々な研究の対象となっている。P S M A の発現は主に前立腺組織に限定されているが、検出可能なレベルの PSMA mRNA が脳癌、唾液線癌、小腸癌、及び、腎細胞癌において確認されている (Israeli ら、1993, Cancer Res 53:227-230 (非特許文献 5))。P S M A 蛋白は大多数の原発性および転移性前立腺癌において多く発現しているが、上皮内異常増殖検体においても発現している (Gao ら、1997, Prostate 31:264-281 (非特許文献 2))。インジウム-111 標識された、再発性前立腺癌を造影する抗 P S M A モノクローナル抗体を利用した予備結果は期待を持たせるものである (Sodee ら、1996, Clin Nuc Med 21:759-766 (非特許文献 6))。P S M A は、機能性アンドロゲン受容体の存在を必要とするホルモン依存性抗原である。全ての前立腺癌細胞がアンドロゲン受容体を発現する訳ではないため、P S M A の治療標的としての臨床上的有用性は本来限られている。P S M A 免疫療法の効果を調べるための臨床試験も行われている。

10

20

## 【 0 0 0 8 】

また、前立腺幹細胞抗原 (Prostate Stem Cell Antigen: PSCA) も最近報告された前立腺癌の細胞表面マーカーである (Reiter ら、1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1735-1740 (非特許文献 7))。P S C A 発現は、主に前立腺特異的であることが明らかとなり、高度の前立腺上皮内異常増殖 (prostatic intraepithelial neoplasia: PIN)、アンドロゲン依存性およびアンドロゲン非依存性前立腺腫瘍を含む前立腺癌の全ての時期において広く過剰発現することが示されている。P S C A 遺伝子は、80% 以上の前立腺癌において対立遺伝子獲得領域である 8q24.2 染色体にマッピングされる。P S C A は、前立腺癌細胞における細胞表面の位置、前立腺特異性、及び、大いに上方制御された発現から、診断および治療標的となることが期待できる。

30

## 【 0 0 0 9 】

臨床疾患を再現する実験動物モデルシステムが不足しているため、特異的マーカーの同定に関する進歩が遅れている。この問題の解決法として試みられているものとしては、前立腺癌細胞系の発生 (Horoszewicz ら、1983, Cancer Res. 43, 1809 (非特許文献 8))、及び前立腺癌異種移植 (Pretlow ら、1991, Cancer Res. 51, 3814 (非特許文献 9); van Weerden ら、1996, Am. J. Pathol. 149, 1055 (非特許文献 10); Klein ら、1997, Nature Med. 3, 402 (非特許文献 11)) 等が挙げられる。しかしながら、これらの手法は限られた成果しか収めなかった。例えば、異種移植では、一般的に長期生存率が低かった。更に、最も広く使用されているヒト前立腺癌細胞系である PC-3、DU-145、及び LNCaP のいずれも、前立腺癌特有の骨芽細胞病巣の発生において再現性を示さなかった。DU-145 および PC-3 細胞系の更なる制限は、これらの細胞が前立腺特異的抗原 (P S A) またはアンドロゲン受容体 (A R) を発現しないことであり (Kaighn ら、1979, Invest. Urol. 17:16-23 (非特許文献 12); Gleave ら、1992, Cancer Res. 52:1598-1605 (非特許文献 13))、そのため、臨床における前立腺癌との関連性には疑問がある。LNCaP 細胞系はアンドロゲン応答性であり、P S A を発現するが、アンドロゲン受容体に変異を含むため基質特異性が改変されている。

40

## 【 0 0 1 0 】

しかしながら、最近、ヒトの臨床状況によく対応する遺伝子および表現型の特徴を示す一連の前立腺癌異種移植 (患者の腫瘍由来) が報告されている (Klein ら、1997, Nature

50

Med. 3:402(非特許文献11))。これらのLAPC(Los Angeles Prostate Cancer)異種移植は重症複合免疫不全(SCID)マウスにおいて一年以上の継代に耐えた。LAPC-4異種移植モデル系は、アンドロゲン依存性からアンドロゲン非依存性への変換、及び、転移病巣の発生を真似る能力がある(Kleinら、1997, Nature Med. 3:402(非特許文献11))。LAPC-4腫瘍は、去勢後の雄マウスにおいて退行するが、2~3ヶ月の内にアンドロゲン非依存性腫瘍として再生する。アンドロゲン依存性(AD)およびアンドロゲン非依存性(AI)LAPC-4異種移植腫瘍の両方は、LAPC-4異種移植のADおよびAI変異体に由来するcDNAの提示差異解析を利用して同定された前立腺特異的マーカーであるPSA、PSMA、及び、PSCA(前立腺幹細胞抗原)を同量発現する。

【非特許文献1】Lalaniら、1997, Cancer Metastasis Rev. 16:29-66

10

【非特許文献2】Gaoら、1997, Prostate 31:264-281

【非特許文献3】Fortierら、J. Natl. Cancer Inst. 1999, 91(19):1635-40

【非特許文献4】Cupp & Osterling, 1993, Mayo Clin Proc 68:297-306

【非特許文献5】Israeliら、1993, Cancer Res 53:227-230

【非特許文献6】Sodeeら、1996, Clin Nuc Med 21:759-766

【非特許文献7】Reiterら、1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1735-1740

【非特許文献8】Horoszewiczら、1983, Cancer Res. 43, 1809

【非特許文献9】Pretlowら、1991, Cancder Res. 51, 3814

【非特許文献10】van Weerdenら、1996, Am. J. Pathol. 149, 1055

【非特許文献11】Kleinら、1997, Nature Med. 3, 402

20

【非特許文献12】Kaighnら、1979, Invest. Urol. 17:16-23

【非特許文献13】Gleaveら、1992, Cancer Res. 52:1598-1605

【発明の開示】

【0011】

#### 発明の概要

本発明は、通常、前立腺特異的でアンドロゲン制御されるセリンプロテアーゼである本明細書に記載の20P1F12/TMPRSS2に由来するまたはそれに基づく前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、肺癌、卵巣癌、および腎臓癌、並びに、転移癌の診断および治療の為の方法、及び組成物に関する。また、20P1F12/TMPRSS2遺伝子の全てのコード配列を含む全長cDNA(以下、20P1F12-GTC1とも称する)を提供する(図1)。このcDNAは、最近発表されたTMPRSS2(Paoloni-Giacobinoら、1997, Genomics 44:309-320)に関連性が高いが、構造的にはこれと異なるタンパク質をコードする。20P1F12/TMPRSS2遺伝子も、TMPRSS2の発現プロフィールと比較して、非常に異なる発現パターンを示す。

30

【0012】

具体的には、本発明は、20P1F12/TMPRSS2遺伝子、mRNA、及び/またはコード配列の全体またはその一部に相当するかまたは相補的なポリヌクレオチドを、好ましくは単離された形態で提供し、これには20P1F12/TMPRSS2タンパク質およびその断片をコードするポリヌクレオチド、20P1F12/TMPRSS2遺伝子もしくはmRNA配列またはその一部と相補的なDNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、及び関連する分子、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチド、ならびに20P1F12/TMPRSS2遺伝子、mRNA、または20P1F12/TMPRSS2をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが含まれる。更に、cDNAおよび20P1F12/TMPRSS2をコードする遺伝子を単離する手段を提供する。20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子、このような分子により形質転換あるいは形質導入した細胞、及び、20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物発現の為の宿主ベクターシステムも提供する。更に、本発明は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質およびそのポリペプチド断片を提供する。

40

【0013】

また、様々な生体試料における20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドおよびタンパク質の有無の検出方法、並びに、20P1F12/TMPRSS2を発現する細胞を同定する方法も提供する。更に、本発明は、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態を、それに相当する正常な試

50

料における20P1F12/TMPRSS2の状態と比較することにより、生体試料に無制御細胞増殖の形跡があるかどうか検査する予診および診断方法であって、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態の変化が無制御細胞増殖に関連する方法を提供する。また、前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、肺癌、卵巣癌、及び、腎臓癌、並びに、転移癌の取扱いの為に診断画像法も提供する。

#### 【0014】

更に、本発明は、特に、20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドおよび抗20P1F12/TMPRSS2抗体療法や組成物、癌ワクチン、および、低分子療法を含む、様々な治療組成物、並びに、前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、肺癌、卵巣癌、及び、腎臓癌、並びに、転移癌の治療法略を提供する。

#### 【0015】

本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、マウスおよび他の哺乳類の抗体、キメラ抗体、ヒト化および完全なヒト抗体、並びに、検出可能なマーカー、毒、または治療組成物により標識された抗体を含む20P1F12/TMPRSS2タンパク質、及び、そのポリペプチド断片に結合する抗体を提供する。また、20P1F12/TMPRSS2と特異的に反応するいくつかのモノクローナル抗体も本明細書に記載する。これら及び他の20P1F12/TMPRSS2抗体は、前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、肺癌、卵巣癌、及び、腎臓癌、並びに、転移癌を検出、局在化、および同定する分子診断アッセイ法及び診断画像法に有用である。更に、癌ワクチンも提供する。

#### 【0016】

##### 発明の詳細な説明

別途定義されないかぎり、本明細書に用いられるあらゆる技術用語、表記および他の科学的専門用語は、本発明が属する当業者に通常理解される意味を有するものとする。いくつかの場合において、通常理解される意味をもつ用語が明瞭および/または容易な参考のために本明細書に定義されているが、本明細書でそのような定義を包含することは、当技術分野において一般的に理解されていることに対して実質的な相違を表すものと、必ずしも解釈されるべきではない。本明細書に記載または参照される技術および手順は、一般的によく理解されており、かつ例えば、サムブルック(Sambrook)ら、1989、分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、コールドスプリングハーバー、N. Y. に記載されている広く利用されている分子クローニング方法体系など、当業者により従来の方法体系を用いる場合に、通常に使用されるものである。適切には、商業的に入手可能なキットおよび試薬の使用を含む手順は、一般的に、別な方法を特に言及していないかぎり、製造業者が定めるプロトコールおよび/またはパラメーターに従って行われる。

#### 【0017】

本明細書に用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、少なくとも10塩基長または塩基対長の、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドまたはヌクレオチドの各型の改変された形のいずれかの重合体を意味し、かつDNAの一本鎖型および二本鎖型を含むものとする。

#### 【0018】

本明細書に用いられる「ポリペプチド」という用語は、少なくとも6個のアミノ酸のポリマーを意味する。明細書全体にわたって、アミノ酸に関して標準の3文字または1文字表記を用いる。これに関連して、例えば「20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド」は、例えば、図8に示される断片を含む32 kDのプロテアーゼドメインと同様に図1に示される492個のアミノ酸配列タンパク質を有するタンパク質を含む。

#### 【0019】

本明細書に用いられる、ポリヌクレオチドに関して用いられる「ハイブリダイズする(hybridize)」、「ハイブリダイズすること(hybridizing)」、「ハイブリダイズする(hybridizes)」などの用語は、通常ハイブリダイゼーション条件、好ましくは、50%ホルムア

10

20

30

40

50

ミド/6 X SSC/0.1% SDS/100 µg/ml ssDNA中で、ハイブリダイゼーションの温度が37 より高く、0.1 X SSC/0.1% SDS中での洗浄のための温度が55 より高いハイブリダイゼーションのような条件、および最も好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を指すものとする。

#### 【0020】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者により容易に決定可能であり、一般的に、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度による経験的計算である。一般的に、より長いプローブは、正確なアニーリングのためにより高い温度が要求され、一方、より短いプローブはより低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般的に、変性したDNAが、環境に相補的な鎖が存在する場合、それらの融解温度以下で再アニーリングする能力に依存している。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間に所望する相同性の度合いが高ければ高いほど、用いられるべき相対的溫度は高くなる。結果として、より高い相対的溫度は反応条件をよりストリンジェントにさせる傾向になり、一方、より低い溫度はそれが少なくなるということになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの追加的詳細および説明については、オースベル(Ausubel)ら、分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、ウィリーインターサイエンスパブリッシャーズ(Wiley Interscience Publishers)、(1995)を参照のこと。

10

#### 【0021】

本明細書において定義される、「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」とは、以下のものと定めうる：(1)例えば、50 で、0.015 M 塩化ナトリウム/0.0015 Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムのような、洗浄のために低イオン強度および高温を使用する；(2)ホルムアミド、例えば、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/pH 6.5の50 mM リン酸ナトリウム緩衝液を含む50%(v/v)ホルムアミドのような変性試薬を42 で、750 mM 塩化ナトリウム、75 mMクエン酸ナトリウムとともに、ハイブリダイゼーションの間に使用する；または(3)50%ホルムアミド、5 x SSC(0.75 M NaCl、0.075 Mクエン酸ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5 x デンハート液、超音波処理されたサケ精子DNA(50 µg/ml)、0.1% SDS、および10%デキストラン硫酸を42 で使用し、42 で0.2 x SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中および55 で50%ホルムアミド中で洗浄し、引き続いて55 でEDTAを含む0.1 x SSCからなる高ストリンジェンシー洗浄を行う。

20

30

#### 【0022】

「中等度にストリンジェントな条件」とは、サムブルック(Sambrook)ら、1989、分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、ニューヨーク：コールドスプリングハーバープレス(Cold Spring Harbor Press)に記載されているように定められ、かつ上記のものよりストリンジェンシーが低い洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度および% SDS)の使用を含む。中等度にストリンジェントな条件の例は、20%ホルムアミド、5 x SSC(150 mM NaCl、15 mMクエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム(pH 7.6)、5 x デンハート液、10%デキストラン硫酸、および20 mg/mL 変性した剪断化サケ精子DNAを含む溶液中、37 で一晩インキュベーション、引き続いて約37~50 で、1 x SSC中でのフィルターの洗浄である。当業者は、プローブの長さなどのような因子を適応させることが必要であると同時に、温度、イオン強度などを調整する方法を理解しているものと思われる。

40

#### 【0023】

アミノ酸配列の比較に関して、「同一性」という用語は、同じ相対的位置で同一であるアミノ酸残基のパーセンテージを表すことに用いられる。また、これに関して、「相同性」という用語は、当技術分野において一般的に理解されていることだが、BLAST解析という保存アミノ酸判定基準を使用して、同じ相対的位置で同一かまたは類似しているかのいずれかであるアミノ酸残基のパーセンテージを表すことに用いられる。例えば、%同一性

50

値は、WU-BLAST-2(Altschulら、1996、Methods in Enzymology 266:460~480; <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>)により生成される。そのような判定基準下で保存されたとみなされるアミノ酸置換に関するさらなる詳細は下記に提供されている。

【0024】

追加的な定義は以下に続くサブセクションを通して提供される。

【0025】

本発明は、20P1F12/TMPRSS2遺伝子に対応する単離されたポリヌクレオチド、20P1F12/TMPRSS2遺伝子によりコードされるタンパク質およびそれらの断片、ならびに20P1F12/TMPRSS2タンパク質を特異的に認識かつ結合することができる抗体を用いる、特定の癌の診断および治療のための方法および組成物に関する。本出願を通して、方法および組成物は、典型的には、前立腺癌および大腸癌の関連における使用として記載されている。しかしながら、本明細書に提示されるデータが、20P1F12/TMPRSS2が他の細胞系譜から発生する癌において発現されていることを示していることから(例えば、特定の転移性癌と同様に、膀胱癌における20P1F12/TMPRSS2の発現を示す図5D、および腎臓癌、肺癌および卵巣癌における20P1F12/TMPRSS2の発現を示す図7Bを参照)、当業者は、その診断的および治療的開示が同様にこれらの系譜の癌に適用可能であることを理解する。図7Bおよび図33のデータより、20P1F12/TMPRSS2が膀胱癌、肺癌および卵巣癌、ならびに特定の転移性癌において発現されているが、この型の正常組織においては発現されず、このように癌マーカーとして役立つことが示されている。図7Bおよび図33に提供されているデータより、20P1F12/TMPRSS2が正常な腎臓組織において発現されているが、腎臓癌においては発現されず、他の組織に見られるのと逆のパターンであることが示されている。(図7Bに図示されている試料の一つでは、20P1F12/TMPRSS2が、正常の組織と比較して、腫瘍組織において上方制御されている。)

【0026】

それゆえ、TMPRSS2の投与は、腎臓癌の関連において治療的に有益でありうる。TMPRSS2をコードする遺伝子の解析は、腎臓癌についての診断として用いられ、それにより、その遺伝子の突然変異が腎臓癌の存在、またはかかる見込みと相関している。TMPRSS2のセリンプロテアーゼドメインの投与もまた、腎臓癌のような特定の癌の治療において治療上有益でありえ、TMPRSS2セリンプロテアーゼドメインが腫瘍増殖または形成を抑制する。

【0027】

20P1F12/TMPRSS2遺伝子は、TMPRSS2について記載されているように、セリンプロテアーゼドメイン、スカベンジャー受容体システイン-リッチドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、および推定の膜貫通ドメインを含む複数のドメインを含有する492個の推定アミノ酸タンパク質をコードする(Paoloni-Giacobinoら、1997、Genomics 44:309~320)。パオロニ-ギアコビーノ(Paoloni-Giacobino)らは、TMPRSS2遺伝子が小腸において強く、かつ弱くのみいくつかの他の組織において発現されることを見出し、また、TMPRSS2遺伝子を染色体21に遺伝子座を決定した。TMPRSS2の生理的役割は知られていない。本出願人らは、20P1F12/TMPRSS2遺伝子の全コード領域を含む完全長cDNAをクローニングしたが、それは発表されているTMPRSS2の配列と比較していくつかのヌクレオチド配列の違いを含む。6個のこれらの配列の違いは、結果としてアミノ酸の違いを生じる。これらの変化の特異的な性質および意義は、現在のところ知られていない。しかしながら、パオロニ-ギアコビーノ(Paoloni-Giacobino)らにより記載されているタンパク質と本明細書に記載されている20P1F12/TMPRSS2タンパク質との間のアミノ酸の違いのいくらかは、タンパク質のプロテアーゼドメインの中に含まれる保存されていない変化である(例えば、図3を参照)。従って、パオロニ-ギアコビーノ(Paoloni-Giacobino)らに記載されている配列を有するタンパク質は、本明細書に記載されているタンパク質とは有意的に異なる機能的活性を有する可能性がある。また、遺伝子はある程度の可変性を有すること、およびこの可変性は発癌に関連することを含め、様々な細胞生理面に影響を与えうることは、当技術分野において知られている(Rebeckら、J. Natl. Cancer Inst. 90(16):1225~1229(1998)およびToninら、Semin. Surg. Oncol. 18(4):281~286(2000))。さらに、本出願人らは、新規な20P1F12/T

10

20

30

40

50

MPRSS2が、以前に報告されたTMPRSS2について知られているものと比較して、完全に異なる発現パターンを有することを見出した。

【 0 0 2 8 】

20P1F12/TMPRSS2は開示された癌細胞において発現され、かつプロテアーゼドメインを含んでいることから、それがこれらの癌の発生、浸潤および/または進行、特に転移性疾患の発生において機能している可能性がある。この事については、プロテアーゼが癌細胞の浸潤および転移に関連があることは知られている(Henrietら、1999、APMIS 107(1):111~119; Rochefortら、1999、APMIS 107(1):86~95; Webberら、1995、Clin. Cancer Res. 1(10):1089~1094; Duffy、1996、Clin. Cancer Res. 2(4):613~618; WebberおよびWaghray、1995、Clin. Cancer Res. 1(7):755~761)。例えば、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(u-PA)、カテプシンDおよびPSAは、前立腺癌細胞が転移する能力を調節すると考えられている(例えば、Fortierら、J. Nat. Cancer Inst. 91(19):1635~1640(1999)を参照)。前立腺癌および大腸癌、ならびに特に転移において20P1F12/TMPRSS2機能の関与する可能性は下記の実施例に記載されているように評価されるかもしれない。

10

【 0 0 2 9 】

興味深いことには、20P1F12/TMPRSS2およびTMPRSS2の一次構造は、タンパク質-タンパク質相互作用ドメインおよびプロテアーゼドメインを含み、タンパク質複合体を形成していることが見出されている(例えば、図21を参照)。20P1F12/TMPRSS2およびTMPRSS2の機能は不明である。20P1F12/TMPRSS2およびTMPRSS2の機能は、そのSRCRおよび/またはLDLAドメインを通して細胞外環境にある基質タンパク質への結合に関係している可能性がある。SRCRドメインを示すタンパク質の例は以下のものを含む: CD6、ALCAM(activated leukocyte cell adhesion molecule、活性化白血球細胞接着分子)に結合し、かつ胸腺細胞-胸腺上皮細胞の結合を媒介する接着分子(Whitneyら、1995、J. Biol. Chem. 270:18187); CD5(Ly-1)、B細胞上でCD72を結合するT細胞タンパク質であり、T細胞-B細胞の伝達に関与している可能性がある(Luoら、1992、J. Immunol. 148:1630); BSSP-3、クリングル様構造および3つのスカベンジャー受容体システイン-リッチモチーフを有する脳特異的セリンプロテアーゼ(Yamamuraら、1997、Biochem. Biophys. Res. Commun. 239:386)。LDLRドメインは、uPA-プラスミノゲンアクチベーター-1(PAI-1)複合体のようなプロテアーゼ阻害剤複合体の結合および再利用に関係していた(例えば、Stricklら、FASEB J. 9:890~898(1995); Moestrup、Biochim. Biophys. Acta 1197:337~360(1994)を参照)。

20

30

【 0 0 3 0 】

前立腺組織は、PSA、ヒト腺性カリクレイン(hK2)およびプロスターゼ/KLK-L1を含むいくらかのアンドロゲン制御性プロテアーゼを発現する(Wolfら、1992、Mol. Endocrinol. 6:753~762; Nelsonら、1999、PNAS 96:3114~3119; Yousefら、1999、Cancer Res. 59:4252~4256)。20P1F12/TMPRSS2は、その構造的特徴によりこれらのプロテアーゼの間では独特である。それは、スカベンジャー受容体システイン-リッチドメイン(SRCR)および低密度リポタンパク質受容体A(LDLA)ドメインを有する推定のII型膜貫通プロテアーゼである(Paoloni-Giacobinoら、1997)。プロテアーゼドメインは、カルボキシル末端に位置し、本明細書に記載されているように分泌されている。これらの特徴より、20P1F12/TMPRSS2タンパク質は細胞膜で発現されることができ、かつ他のタンパク質または低分子に対する受容体として機能できるという証拠が提供された。20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼドメインは、ヘプシン、または卵巣癌において上方制御されるII型膜貫通プロテアーゼ(Leytusら、1988、Biochemistry 27:1067)に最も相同性がある(Yanら、1997、Cancer Res. 57:2884)。細胞成分分画研究により、ヘプシンが培養されたHepG2細胞の膜性の分画に局限化された(Tsujiら、1991、J. Biol. Chem. 266:16948~16953)。本明細書に提供されている研究より、前立腺癌および大腸癌において、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の大部分がタンパク質分解性に切断されかつ分泌されている。LDLAおよびSRCRドメインを含む残存している領域は、まだ膜に結合している可能性が高く、例えば、プロテアーゼ阻害剤複合体の除去、結合および再利用に関与できるプロテアーゼドメインから独立して、細胞内成分についての受容体として機能できた(例えば、Takeuchiら、PNAS:96:11054~11061(1999)を参照)

40

50

。

## 【0031】

20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼの変異性不活性化より、プロテアーゼドメインの切断および放出がそれ自身の触媒活性の結果であることが示され、20P1F12/TMPRSS2がそれ自身の基質であることが証明されている(例えば、実施例10を参照)。同様の自己触媒的切断はヘプシンについても観察された(Thien-Khaiら、1997、J. Biol. Chem. 272(50):31315~31320)。20P1F12/TMPRSS2の自己切断は255位のArgで起こり、その結果としてプロテアーゼドメインの放出が生じる。抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体を使用する組織染色研究より、そのタンパク質は小胞構造に集中し、正常および癌性の前立腺組織の腺管腔へ分泌されているという証拠が提供される。癌をもったマウスからの細胞培養培地および血清の分析により、20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼが前立腺癌細胞により分泌されていることが立証された。これらのデータにより、放出された20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼが前立腺癌およびおそらく大腸癌についての可能性のある血清の診断または予知のマーカーとして有用であるかもしれないこと、およびプロテアーゼドメインの切断が腫瘍増殖および浸潤に関係していることの証拠が提供される。正常組織構造の破壊と同様に、癌細胞の増殖および転移は、PSAのように、癌細胞の存在を示すことになる血清20P1F12/TMPRSS2レベルの上昇を生じうる。追加的データより、20P1F12/TMPRSS2はまた、膀胱、肺および卵巣癌、ならびに転移性癌についての血清の診断または予知のマーカーとして有用である可能性があることが示される。

10

## 【0032】

本発明の一つの態様において、癌組織において発現される機能的20P1F12/TMPRSS2を特異的に認識する抗体が、癌組織における検出方法とともに、提供される。前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、肺癌、および卵巣癌において発現される20P1F12/TMPRSS2タンパク質は自己触媒的切断を示す。このゆえに、セリンプロテアーゼ活性および切断部位は正常な活性を示しているものと思われる(図34参照)；そのタンパク質のそれらの領域は、見たところでは、正常な活性を変化させる突然変異を有していない。このように、これらの癌において、TMPRSS2タンパク質は変異されず、その天然の立体配置を有しているものと思われる。

20

## 【0033】

分泌される20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼは、細胞外間隙に存在する増殖調節因子をプロセッシングあるいは活性化することに関与している可能性がある。PSAおよびhK2に関する最近の研究より、それらが、骨転移性前立腺癌の造骨細胞の応答において重要な増殖調節因子を活性化することに役割を果たしている可能性があることが示された(Koenemanら、1999、Prostate 39:246~261)。これらの因子の一つ、副甲状腺ホルモン関連性タンパク質(PTHrP)は、インビボでの前立腺腫瘍増殖率を増加させ、かつLNCaP細胞をアポトーシスから保護することが示された(Doughertyら、1999、Cancer Res. 59:6015~6022)。20P1F12/TMPRSS2は、PTHrPならびに/または前立腺癌および/もしくは大腸癌の増殖に影響を及ぼしうる他の因子を活性化することができるかどうかは、あとになってみないとわからない。20P1F12/TMPRSS2の発現パターンおよび限局化が、それを前立腺癌および大腸癌における治療にとってのあらかじめ評価されていない標的にさせる。

30

## 【0034】

本発明は、一部分、サプレッションサブトラクションハイブリダイゼーションクローニングによる20P1F12/TMPRSS2遺伝子に対応するcDNA断片の単離および実施例において記載されている詳細な分子生化学的特徴付け研究に基づいている。最初に単離されたcDNA断片、クローン20P1F12は、最近記載されているTMPRSS2をコードする完全長cDNAの3'非翻訳配列の重複部分に同一性を示した。20P1F12に対応する遺伝子を特異的に増幅するために設計されたプライマーは、その後、前立腺癌異種移植、正常な前立腺、ならびに様々な他の正常および癌性の組織における20P1F12/TMPRSS2発現を特徴付けするために使用された。完全20P1F12/TMPRSS2遺伝子を含む完全長cDNAは、別々のライブラリーから独立して単離され、これらのクローンから同定された全コード配列は本明細書に提供されている(例えば、図1参照)。

40

50

## 【 0 0 3 5 】

新規な20P1F12/TMPRSS2遺伝子(本明細書では、20P1F12-GTC1とも呼ばれる)のヌクレオチドおよび導き出されるアミノ酸配列を図1に示す。20P1F12-GTC1/TMPRSS2遺伝子によりコードされるアミノ酸配列において、以前報告されたTMPRSS2配列と比較して、重要な違いがある(図3におけるアミノ酸アラインメントを参照)。例えば、プロテアーゼドメイン中に4個のアミノ酸の違いがあり、そのうちの3個は保存されていないアミノ酸の違いであり、かつプロテアーゼの機能および/または特異性に影響を及ぼしうる。本出願人らの新規20P1F12/TMPRSS2タンパク質は、本明細書の実施例においてさらに記載されているように、詳細にわたり特徴付けられた。20P1F12/TMPRSS2タンパク質は、分泌性C末端プロテアーゼドメインを有するグリコシル化II型膜貫通タンパク質である。

10

## 【 0 0 3 6 】

20P1F12/TMPRSS2遺伝子はアンドロゲン制御性である。興味深いことに、前立腺癌において、アンドロゲン制御およびアンドロゲン不応状態の発生は腫瘍性進行の重要な局面であり、アンドロゲン非依存性増殖は転移性疾患に関連している。さらに、アンドロゲン受容体遺伝子増幅は、ホルモン不応性前立腺癌において組織PSAタンパク質発現を増加させることが知られている(例えば、Koivistoら、*J. Pathol.* 189(2):219~223(1999); Koivistoら、*Am. J. Pathol.* 152(1):1~9(1998)を参照)。20P1F12/TMPRSS2タンパク質は細胞表面で検出可能である。20P1F12/TMPRSS2の発現は、進行型および転移性疾患における高レベルの発現を含め、前立腺癌においても観察される。さらに、20P1F12は、大腸癌において過剰発現されているように思われ、他の癌においても発現されている可能性がある(例えば、図5Dを参照)。

20

## 【 0 0 3 7 】

本出願人らの20P1F12/TMPRSS2遺伝子(図1)と以前報告された配列(図2)との間の構造上の違いに加えて、本出願人らの発現解析の結果は、パオロニ-ギアコビーノ(Paoloni-Giacobino)らにより報告された結果に反する。また、転移性癌と同様に、前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、卵巣癌および肺癌に関して、本明細書に開示されたデータは、TMPRSS2タンパク質が悪性組織において発現され続けるというワング(Wong)ら(2000年12月26日発行の米国特許第6,166,194号)の主張に反する。さらに、そのプロテアーゼとしての持続される機能を根拠にすれば、TMPRSS2はその天然の立体配置を維持し続けているように思われる。特に、16個の正常組織におけるRT-PCRによる20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現の本出願人らの解析より、前立腺において最高レベルの発現があり、大腸、膵臓、腎臓、肝臓および肺においては実質的により低いレベルが検出され、かつ小腸においては検出可能な発現はないことが示されている(図5、パネルBおよびC)。ノーザンプロットによる前立腺において検出された発現レベルは、極低量レベルのみ発現が検出されたこれらの他の組織と比較して非常に高いが(図6)、同様の結果がノーザンプロット解析で得られた。また、表1に示されているように、免疫組織化学分析より、前立腺および膵臓において20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現が示されている。さらに、20P1F12/TMPRSS2の発現パターン(図6に示されているデータのような)が、他の研究員により確認された(例えば、Linら、*Cancer Res.* 1999, 59(17):4180~4184)。

30

## 【 0 0 3 8 】

発現解析によりまた、すべての試験用の前立腺癌異種移植において20P1F12/TMPRSS2の高レベルの発現が示され、正常な前立腺においてはほぼ同レベルで見られる(図5、パネルA)。ノーザンプロット解析は同様の結果を示すが、LAPC-4異種移植および正常前立腺と比較して、LAPC-9異種移植において検出される発現はいくぶん低いレベルである;発現はまた、いくつかの分析用の前立腺癌細胞株においても検出される(図7)。20P1F12/TMPRSS2遺伝子はまた、一部の前立腺癌細胞株においても発現されている(図7)。これらの結果より、20P1F12/TMPRSS2遺伝子は、前立腺癌の発生および/または進行に関与している可能性がある、主に前立腺特異的遺伝子である。また、ある大腸癌細胞株において、ノーザンプロットにより20P1F12/TMPRSS2の高レベル発現が検出された(図7)。さらに、ある前立腺癌および大腸癌試料において、免疫組織化学分析により20P1F12/TMPRSS2の高レベル発現が検

40

50

出された(例えば、図17および表1を参照)。表1はさらに、抗-20P1F12/TMPRSS2を癌組織と非癌組織において20P1F12/TMPRSS2の主な染色限局化での違いを同定するために使用することができることを示す。表1のこのデータは、本明細書に示されている他のデータと矛盾がなく、20P1F12/TMPRSS2が浸潤および転移において生理的役割を有する分泌性分子であることを示す。結果として、このデータより、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌、ならびに転移性癌における20P1F12/TMPRSS2の発現は、これらの癌を検出、診断、予知および/または治療のための分子的根拠を供給できるという証拠が提供される。

#### 【0039】

このように、本発明は、図1に示されるようなヌクレオチドおよびコードされたアミノ酸配列を有する、独特かつ有用な20P1F12/TMPRSS2遺伝子(およびタンパク質)を提供する。本明細書に開示される20P1F12/TMPRSS2 cDNA配列のすべてまたは一部に対応するヌクレオチドプローブが提供され、20P1F12/TMPRSS2遺伝子配列のすべてまたは一部をコードする他のcDNAを単離または同定するために使用されうる。本発明はさらに、20P1F12/TMPRSS2遺伝子またはそのRNA転写物を特異的に増幅することができるプライマーを提供した。本発明はさらに、20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物のコード配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。そのようなポリヌクレオチドは、多数のさらなる用途をもつ、20P1F12/TMPRSS2コードされるタンパク質およびペプチドを発現するために使用されうる。20P1F12/TMPRSS2遺伝子プローブおよびプライマーはまた、20P1F12/TMPRSS2を発現する癌細胞および他の細胞を検出するために、腫瘍マーカーを産生するために、かつ前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌、ならびに転移性癌のための分子的診断および予知のアッセイ法において、様々な生体試料での20P1F12/TMPRSS2 mRNAの存在または非存在を検出するために使用されうる。20P1F12/TMPRSS2遺伝子に対応するまたは相補的なポリヌクレオチドは、例えば、20P1F12/TMPRSS2生物学的活性を調節することにおいてなど、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌および大腸癌、ならびに転移性癌を治療するための方法において有用である可能性がある。

#### 【0040】

より具体的には、本発明の実施において有用な20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドは、図1(配列番号：1)に示されるヒト20P1F12/TMPRSS2のヌクレオチド配列もしくは図2(配列番号：3)に示される以前に報告されたTMPRSS2のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、前記のものいづれかに相補的な配列、または前記のものいづれかのポリヌクレオチド断片を含みうる。もう一つの態様は、図1(配列番号：2)に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、それに対して相補的な配列、またはそれらのポリヌクレオチド断片を含む。もう一つの態様は、図1(配列番号：1)に示される20P1F12/TMPRSS2 cDNAまたはそれらのポリヌクレオチド断片にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを含む。

#### 【0041】

20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドの典型的態様は、図1に示される配列を有する20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドである。20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドは、図1に示されるヒト20P1F12/TMPRSS2のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド(TはまたUでもありうる)；20P1F12/TMPRSS2タンパク質のすべてまたは部分をコードするポリヌクレオチド；前記のものに相補的な配列；または前記のものいづれかのポリヌクレオチド断片を含んでもよい。もう一つの態様は、図1に示される、ヌクレオチド残基114位からヌクレオチド残基1589位までの、TはまたUでもありうる、配列を有するポリヌクレオチドを含む。もう一つの態様は、配列がATCC指定番号(Designation Number)207097を与えられたアメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection)に寄託されたプラスミドに含まれるcDNAによりコードされる20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

#### 【0042】

本明細書に開示される本発明の典型的態様は、タンパク質およびその断片をコードす

るものような20P1F12/TMPRSS2 mRNA配列(およびそのような配列に相補的なもの)の特定部分含有20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドを含む。例えば、本明細書に開示される本発明の代表的態様は、以下のものを含む：図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約1位からアミノ酸約10位までをコードするポリヌクレオチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約20位からアミノ酸約30位までをコードするポリヌクレオチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約30位からアミノ酸約40位までをコードするポリヌクレオチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約40位からアミノ酸約50位までをコードするポリヌクレオチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約50位からアミノ酸約60位までをコードするポリヌクレオチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約60位からアミノ酸約70位までをコードするポリヌクレオチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約70位からアミノ酸約80位までをコードするポリヌクレオチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約80位からアミノ酸約90位までをコードするポリヌクレオチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約90位からアミノ酸約100位までをコードするポリヌクレオチドなど。このスキームに従い、20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸100位～492位のアミノ酸配列部分をコードするポリヌクレオチドは本発明の典型的態様である。20P1F12/TMPRSS2タンパク質のより大きい部分をコードするポリヌクレオチドもまた企図されている。例えば、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約1位(または20位または30位または40位など)からアミノ酸約20位(または30位または40位または50位など)までをコードするポリヌクレオチドは、当技術分野においてよく知られている様々な技術により作製されうる。

10

20

#### 【0043】

20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドの追加の例示的態様として、図1に示される、ヌクレオチド残基約1番からヌクレオチド残基約500番、ヌクレオチド残基約500番からヌクレオチド残基約1000番、ヌクレオチド残基約1000番からヌクレオチド残基約1500番、ヌクレオチド残基約1500番からヌクレオチド残基約1740番の配列を有するポリヌクレオチドからなる態様を含む。本明細書に開示される本発明の追加の例示的態様として、20P1F12/TMPRSS2タンパク質内に含まれ、かつ下記で論議されている生物学的モチーフの1つまたは複数を含む。

30

#### 【0044】

無制御の細胞増殖の検出に加えて、前の段落のポリヌクレオチドは多数の異なる特定の用途をもつ。例えば、ヒト20P1F12/TMPRSS2遺伝子は染色体21q22に遺伝子座を決定しているため、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の異なる領域をコードするポリヌクレオチドは、様々な癌に関連しているとして同定された染色体21、バンドq22における細胞遺伝学的異常を特徴付けするために使用されうる。特に、再編成を含む21q22における様々な染色体異常は、多数の異なる癌において高頻度の細胞遺伝学的異常として同定された(例えば、Simpsonら、1997、Oncogene, 14(8):2149~2157; Desmazeら、1997、Cancer Genet. Cytogenet. 97(1):12~19を参照)。従って、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の特定領域をコードするポリヌクレオチドは、悪性の表現型の一因となりうる染色体21のこの領域における細胞遺伝学的異常の特有の性質を、以前可能であったものより、より高度な正確さをもって明確に表すために使用されうる新しい手段を提供する。このような関係において、これらのポリヌクレオチドは、より微妙でかつあまりありがちではない染色体異常を同定するために染色体スクリーニングの感度を拡大することの当技術分野における必要性を満たす(例えば、Evansら、1994、Am. J. Obstet. Gynecol. 171(4):1055~1057を参照)。

40

#### 【0045】

本発明のこの局面の範囲内には、天然資源由来であろうと合成されているものであろうと、代替のバックボーンに基づくまたは代替の塩基を含む核酸分子も同様に、ゲノムDNA、cDNA、リボザイム、およびアンチセンス分子が含まれる。例えば、アンチセンス分子は、ペプチド核酸(PNA)または塩基対依存性様式においてDNAまたはRNAを特異的に結合するホスホロチオネート誘導体のような非核酸分子を含む、RNAまたは他の分子であってもよ

50

い。当業者は、本明細書に開示される20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド配列を用いて、これらの核酸分子クラスを容易に得ることができる。例えば、アンチセンス技術は、細胞内に位置する標的ポリヌクレオチドに結合する外因性オリゴヌクレオチドの投与を必要とする。「アンチセンス」という用語は、そのようなオリゴヌクレオチドが、例えば、20P1F12/TMPRSS2のようなそれらの細胞内標的に相補的であるという事実を指す。例えば、ジャック コーヘン(Jack Cohen)、1988、「オリゴデオキシヌクレオチド、遺伝子発現のアンチセンス阻害剤(OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, Antisense Inhibitors of Gene Expression)」、CRCプレス(CRC Press)；およびSynthesis 1:1~5(1988)を参照。本発明の20P1F12/TMPRSS2アンチセンスオリゴヌクレオチドは、増強された癌細胞増殖抑制作用を示すS-オリゴヌクレオチド(ホスホロチオネート誘導体またはS-オリゴ、前記Jack Cohenを参照)のような誘導体を含む。S-オリゴ(ヌクレオシドホスホロチオネート)は、リン酸基の架橋されていない酸素原子がイオウ原子に置換されている、オリゴヌクレオチド(O-オリゴ)の等電子類似体である。本発明のS-オリゴは、対応するO-オリゴをイオウ転移試薬である、3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン-1,1-ジオキシド(3H-1,2-benzodithiol-3-one-1,1-dioxide)での処理により調整してもよい。イヤー, R. P.(Iyer, R. P.)ら、1990、J. Org. Chem. 55:4693~4698;およびイヤー, R. P.(Iyer, R. P.)ら、1990、J. Am. Chem. Soc. 112:1253~1254を参照、これらの開示は本明細書に参照として完全に組み入れられている。実施例14に記載され、および図30および図31に示されるように、本発明の追加の20P1F12/TMPRSS2アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当技術分野において公知のモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む(例えば、Partridgeら、1996、Antisense & Nucleic Acid Drug Development 6:169~175を参照)。

10

20

#### 【0046】

本発明のこの局面のさらに特定の態様として、本発明のポリヌクレオチドまたはその任意の特定部分を特異的に増幅することができるプライマーおよびプライマー対、ならびに本発明の核酸分子またはその任意の部分に選択的または特異的にハイブリダイズするプローブを含む。プローブは、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート化剤または酵素のような、検出可能なマーカーで標識されてもよい。そのようなプローブおよびプライマーは、試料中の20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドの存在を検出するために、および20P1F12/TMPRSS2タンパク質を発現している細胞を検出するための手段として使用されうる。そのようなプローブの例は、図1(配列番号:1)に示されるヒト20P1F12/TMPRSS2 cDNA配列のすべてまたは部分を含むポリヌクレオチドである。20P1F12/TMPRSS2 mRNAを特異的に増幅することができるプライマー対の例はまた、以下の実施例において記載されている。当業者により理解されるものと思われるが、本明細書に提供される配列に基づき、非常に多くの異なるプライマーおよびプローブが調整されうり、かつ20P1F12/TMPRSS2 mRNAを増幅、クローニングおよび/または検出するために効率的に使用されうる。

30

#### 【0047】

本発明の20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドは様々な目的のために有用であり、それらの使用に限定されるものではないが、20P1F12/TMPRSS2遺伝子、mRNA、またはその断片の増幅および/または検出のためのプローブおよびプライマーとして；前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌および大腸癌、ならびに転移性癌の診断および/または予知のための試薬として；20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの発現を指示することができるコード配列として；20P1F12/TMPRSS2遺伝子の発現および/または20P1F12/TMPRSS2転写の翻訳を調節または抑制するための手段として；および治療的薬剤としての使用を含む。

40

#### 【0048】

本発明はまた、例えば、膜結合性および分泌性断片のような20P1F12/TMPRSS2の様々な部分に対する抗体を産生するために使用されうる20P1F12/TMPRSS2タンパク質およびポリペプチドを提供する。これらの膜結合性または分泌性断片についての抗体スクリーニング試験および他のスクリーニング試験は、癌の診断およびステージングのために、または治療の効力の評価のために使用されうる。本発明はまた、例えば、癌ワクチンとして使用さ

50

れうる20P1F12/TMPRSS2タンパク質およびポリペプチドを提供する。タンパク質を認識する抗体は様々なサイズのエピトープに結合し、かつ、近接するまたはしていない約6個のアミノ酸のオーダーの群が最小限のエピトープにおけるアミノ酸の典型的な数として考えられていることを当業者は理解している。ヘッベス(Hebbes)ら、*Mol. Immunol.* 1989年9月; 26(9):865~873; シュワルツ(Schwartz)ら、*J. Immunol.* 1985年10月; 135(4):2598~2608を参照。図1に示されるポリペプチド配列にそって走査し、例示としてのポリペプチドは、例えば、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸含有ポリペプチドを含む20P1F12/TMPRSS2タンパク質のいずれかの部分に対する抗体を産生するために使用されうる。

【0049】

本発明の実施において使用されうるポリペプチド(例えば、免疫原としてまたは浸潤のモジュレーターとして)は、典型的には、165位のバリンを含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸含有ポリペプチド; 242位のイソロイシンを含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸含有ポリペプチド; 329位のグルタミン酸を含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸含有ポリペプチド; 449位のリシンを含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸含有ポリペプチド; 489位のア르기ニンを含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸含有ポリペプチド; および/または491位のアスパラギン酸を含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸含有ポリペプチドからなる。選択的には、そのような例示的ポリペプチドの態様は、例えば、1位のメチオニンなど、図1に示される他のアミノ酸のいずれか一つを含む。

【0050】

さらに密接に関連する態様は、以下のものを含む: 165位のバリンを含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸をコードする単離されたポリヌクレオチド; 242位のイソロイシンを含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド; 329位のグルタミン酸を含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド; 449位のリシンを含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド; 489位のア르기ニンを含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドおよび/または491位のアスパラギン酸を含む、図1に示される20P1F12/TMPRSS2配列の少なくとも約6個のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド。選択的には、そのような例示的ポリペプチドの態様は、例えば、1位のメチオニンなど、図1に示される他のアミノ酸のいずれか一つをコードする。

【0051】

本明細書に開示される本発明の態様は、アミノ酸の挿入、欠失および置換を有するポリペプチドのような広く種々の技術を受け入れた20P1F12/TMPRSS2タンパク質の変異体を含む。20P1F12/TMPRSS2変異体は、部位特異的突然変異誘発、アラニンスキヤニング、およびPCR突然変異誘発のような当技術分野において公知の方法を用いて作製されうる。部位特異的突然変異誘発(Carterら、1986、*Nucl. Acids Res.* 13:4331; Zollerら、1987、*Nucl. Acids Res.* 10:6487)、カセット突然変異誘発(Wellsら、1985、*Gene* 34:315)、制限選択突然変異誘発(Wellsら、1986、*Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A*, 317:415)または他の公知技術がクローン化されたDNAに行われて20P1F12/TMPRSS2変異体DNAを作製できる。スキヤニングアミノ酸分析はまた、近接する配列にそって1つまたは複数のアミノ酸を同定するために使用されうる。好ましいスキヤニングアミノ酸といえるのは、相対的に小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸には、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインを含む。アラニンは、炭素を越える側鎖を除去し、かつ変異体の主鎖立体配置を変化させる可能性はほとんどないため、このグループの中では典型的に好ましいスキヤニングアミノ酸である。アラニンはまた、最もありふれたアミノ酸であるため、典型的に好ましい。さらに、それは、埋もれた位置および露出された位置の両方におい

10

20

30

40

50

て頻繁に見出される(Creighton、「タンパク質(The Proteins)」、(W. H. フリーマン& Co.(W. H. Freeman & Co.)), N. Y.); Chothia, 1976, J. Mol. Biol., 150:1)。アラニン置換が十分な量の変異体を生成しない場合には、等配電子のアミノ酸が使用されうる。

#### 【0052】

上記で論議されているように、主張する本発明の態様は、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質の492個のアミノ酸配列より少ないものを含有するポリペプチド(および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)を含む。例えば、本明細書に開示される本発明の代表的態様は、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約1位からアミノ酸約10位までからなるポリペプチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約20位からアミノ酸約30位までからなるポリペプチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約30位からアミノ酸約40位までからなるポリペプチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約40位からアミノ酸約50位までからなるポリペプチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約50位からアミノ酸約60位までからなるポリペプチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約60位からアミノ酸約70位までからなるポリペプチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約70位からアミノ酸約80位までからなるポリペプチド、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約80位からアミノ酸約90位までからなるポリペプチドおよび図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約90位からアミノ酸約100位までからなるポリペプチドなどを含む。このスキームに従い、20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸100位~492位のアミノ酸配列の部分からなるポリペプチドは本発明の典型的態様である。20P1F12/TMPRSS2タンパク質のより大きい部分からなるポリペプチドもまた企図されている。例えば、図1に示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質のアミノ酸約1位(または20位または30位または40位など)からアミノ酸約20位(または30位または40位または50位など)までからなるポリペプチドは、当技術分野においてよく知られている様々な技術により作製されうる。

#### 【0053】

本明細書に開示される本発明の追加の例示的態様は、例えば、図3Bに示される20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド配列内に含有される1つまたは複数のドメインのアミノ酸残基含有20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド(およびこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)を含む。一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、アミノ酸約1位からアミノ酸約84位までの細胞質ドメインを含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、アミノ酸約84位からアミノ酸約106位までの膜貫通ドメインを含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、アミノ酸約113位からアミノ酸約148位までのLDLRAドメインを含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、アミノ酸約149位からアミノ酸約242位までのSRCRドメインを含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、アミノ酸約255位からアミノ酸約492位までのプロテアーゼドメインを含みうる。

#### 【0054】

本明細書に開示される本発明の追加の例示的態様は、図1に示される20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド配列内に含有される1つまたは複数の生物学的モチーフのアミノ酸残基含有20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド(およびこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)を含む。一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、残基213位~216位のNTSAおよび/または残基249位~252位のNSSRのような1つまたは複数の20P1F12/TMPRSS2のN-グリコシル化部位を含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、残基78位~80位のTSK、残基447位~449位のTSK、残基81位~83位のTKK、残基163位~165位のSQR、残基232位~234位のSSK、残基238位~240位のSLR、残基250位~252位のSSR、および/または残基407位~409位のTQRのような1つまたは複数の20P1F12/TMPRSS2プロテインキナーゼCリン酸化部位を含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、残基35位~38位のTVYE、残基116位~119位のSGIEおよび/または残基356位~359位のTFNDのような1つまたは複数の20P1F12/TMPRSS2カゼインキナーゼIIリン酸化部位を含

みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、残基6位～11位のGSP PAI、残基74位～79位のGTVCTS、残基97位～102位のGAALAA、残基110位～115位のGSKCSN、残基245位～250位のGVNLNS、残基258位～263位のGGESAL、残基432位～437位のGNVDSC、残基462位～467位のGSGCAK、残基464位～469位のGCAKAYおよび/または残基472位～477位のG VYGNのような1つまたは複数のN-ミリストイル化部位を含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、残基386位～393位のATP/GTP結合部位モチーフA(P-ループ)、ATEEKGKTを含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、残基126位～148位のLDL受容体クラスA(LDLRA)ドメインサインCINPSNWCDGVSHCPGGEDEN RCを含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、残基292位～297位のセリンプロテアーゼ、トリプシンファミリー、ヒスチジン活性部位VTAHCを含みうる。もう一つの態様において、本発明の典型的ポリペプチドは、残基435位～446位のセリンプロテアーゼ、トリプシンファミリー、セリン活性部位DSCQGDSSGGPLVを含みうる。これらの発明の関連する態様は、上記で論議されている異なるモチーフの組合わせを含有するポリペプチドを含み、好ましい態様としては、そのモチーフ内にもこれらのポリペプチドの介在配列内にも挿入、欠失または置換を含まないものである。

10

20

30

40

50

#### 【0055】

20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはポリペプチドを特異的に結合しかつ同定できる抗体は、分泌された20P1F12/TMPRSS2および/または任意の生体試料における20P1F12/TMPRSS2発現細胞の存在を検出して、細胞下の位置を決定、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌細胞および転移性癌ならびに前立腺腫瘍、膀胱腫瘍、卵巣腫瘍、肺腫瘍および大腸腫瘍および転移性腫瘍を検出および画像処理、ならびに20P1F12/TMPRSS2生物学的活性を調節または抑制するために使用されうる。抗体はまた、さらに下で記載されているように、治療的に使用されうる。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の産生の方法は、当技術分野においてよく知られている。

#### 【0056】

本発明はまた、限定されるものではないが、当技術分野においてよく知られている様々なウイルスおよび非ウイルスベクターと同様に、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、YAC、BAC、ならびにそのようなDNAまたはRNA分子で形質転換または形質移入された細胞を含む、20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチド含有組換えDNAまたはRNAを提供する。本明細書に用いられる場合、組換えDNAまたはRNA分子は、インビトロで分子操作にかけられたDNAまたはRNA分子である。そのような分子を作製する方法はよく知られている(例えば、サムブルック(Sambrook)ら、1989、前記を参照)。

#### 【0057】

本発明はさらに、適する原核または真核宿主細胞内に20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチド含有組換えDNA分子を含む宿主-ベクター系を提供する。適する原核宿主細胞の例には、酵母細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞もしくは昆虫細胞(例えば、Sf9細胞のようなバキュロウイルス-感染可能細胞)のような動物細胞を含む。適する哺乳動物細胞の例には、組換えタンパク質の発現に通常使用される多数の哺乳動物細胞(例えば、COS、CHO、293、293T細胞)と同様に、LnCap、PC-3、DU145、LAPC-4、TsuPr1、他の形質移入可能または形質転換可能前立腺癌細胞株のような様々な前立腺癌細胞株を含む。より特に、20P1F12/TMPRSS2のコード配列を含むポリヌクレオチドは、当技術分野において通常使用されかつ広く知られているいくつかの宿主-ベクター系を使用して20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその断片を作製するために使用されうる。

#### 【0058】

20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその断片の発現に適する宿主-ベクター系は広い範囲から入手可能であり、例えば、サムブルック(Sambrook)ら、1989、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」、1995、前記を参照。哺乳動物の発現についての好ましいベクターは、限定されるものではないが、pcDNA 3.1 myc-His-tag(インビトロゲン(Invitrogen))、レトロウイルスベクター-pSR tkneo(Mullerら、1991、MCB 11:1785)および/またはTag5ベクター(ゲンハンターコーポレーション(GenHunter

Corporation)、ナッシュビル、TN)を含む。Tag5ベクターは、好ましいベクターであり、形質移入された細胞において分泌性20P1F12/TMPRSS2タンパク質の産生を容易にするために使用されうるIgG分泌シグナルを供給する。これらの発現ベクターを用いて、20P1F12/TMPRSS2は、例えば、3T3、293、293TPC-3、LNCaPおよびTsuPr1を含む、いくつかの前立腺および非前立腺の癌細胞株において好ましく発現されうる。本発明の宿主-ベクター系は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその断片の産生に有用である。そのような宿主-ベクター系は、20P1F12/TMPRSS2および20P1F12/TMPRSS2変異体の機能的性質を研究するために使用されうる。

#### 【0059】

遺伝子コードにおける重複性(redundancy)により、20P1F12/TMPRSS2遺伝子配列における変異が可能になる。特に、当業者は、ある特定の宿主種による特有のコドンの優先度を認識しているものと思われ、所望の宿主にとって好ましいように開示された配列を適合させることができる。例えば、好ましいコドン配列は、典型的には、高頻度コドンに置換されるまれなコドン(すなわち、所望の宿主の公知の配列において約20%未満の使用頻度をもつコドン)を有する。特定の生物体にとってのコドン優先度は、例えば、次のアドレス：<http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html>でのインターネット上で入手可能なコドン使用量表を利用することにより計算されうる。約20%未満の使用頻度をもつ任意のコドンを置換することによりある特定の宿主種に対して最適化されたヌクレオチド配列を本明細書では「コドン最適化配列」と呼ぶ。

#### 【0060】

無制御の細胞増殖の検出に加えて、20P1F12/TMPRSS2遺伝子により、またはその断片によりコードされるタンパク質は、限定されるものではないが、抗体を産生することおよび20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物に結合するリガンドおよび他の薬剤および細胞成分を同定するための方法においての使用を含む、様々な使用をもつものと思われる。そのようなタンパク質はまた、癌マーカーとしても使用されうる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその断片に対して産生される抗体は、診断的および予知的アッセイ法、画像処理方法論(特に、癌画像診断を含む)、ならびに前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌および転移性癌のような、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の発現を特徴とするヒト癌の管理における治療的方法において有用でありうる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質の検出に有用な様々な免疫学的アッセイ法が企図されており、限定されるものではないが、放射免疫検定法、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、酵素結合免疫蛍光検定法(ELIFA)、免疫細胞化学的方法などの様々な型を含む。そのような抗体は標識され、かつ前立腺癌細胞、膀胱癌細胞、卵巣癌細胞、肺癌細胞および/もしくは大腸癌細胞、ならびに/または転移性癌細胞を検出することができる免疫学的画像処理試薬として使用されうる(例えば、放射シンチグラフィック画像処理方法において)。

#### 【0061】

具体的態様において、ヒト20P1F12/TMPRSS2のアミノ酸配列を有する新規20P1F12/TMPRSS2タンパク質は、図1(配列番号：2)に提供される。20P1F12/TMPRSS2のすべてまたは部分を異種構造のポリペプチドと結合する融合タンパク質もまた企図されており、異種構造のポリペプチドがグルタチオン-s-シンセターゼトランスフェラーゼである代表的態様は、実施例5に提供されている。もう一つの典型的態様において、キメラ分子は、20P1F12/TMPRSS2の免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合体を含みうる。二価型のキメラ分子(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合はIgG分子のFc領域へのものでありうる。Ig融合は、好ましくは、Ig分子内の少なくとも1つの可変部の代わりに20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの可溶性(欠失または不活性化された膜貫通ドメイン)型の置換を含む。特に好ましい態様において、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子のヒンジ、CH2およびCH3領域、またはヒンジ、CH1、CH2およびCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の作製については、発行日1995年6月27日の米国特許第5,428,130号も参照。様々な融合ポリペプチドは当技術分野においてよく知られており、典型的態様は「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols In Molecular Biology)」、ユニット9

10

20

30

40

50

および16、フレデリック M. オースブル(Frederick M. Ausubul)ら編、1995に記載されている。

【0062】

本発明の20P1F12/TMPRSS2タンパク質は、多くの形、好ましくは単離された形において現されてもよい。本明細書で用いられる時、物理的、機械的または化学的方法を使用して普通にタンパク質に結合している細胞成分から20P1F12/TMPRSS2タンパク質を取り除く場合、タンパク質は「単離された」と言われる。当業者は、容易に、標準的精製方法を使用して単離された20P1F12/TMPRSS2タンパク質を得ることができる。精製された20P1F12/TMPRSS2タンパク質分子は、20P1F12/TMPRSS2の抗体または他のリガンドへの結合を損なう他のタンパク質または分子を実質的に含まないものと思われる。単離および精製の性質および程度は意図する用途に依存するものと思われる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質の態様は、精製された20P1F12/TMPRSS2タンパク質および機能しうる可溶性20P1F12/TMPRSS2タンパク質を含む。一つの形として、そのような機能しうる可溶性20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその断片は、抗体、リガンド結合パートナーおよび/または基質(例えば、タンパク分解性標的)に結合する能力を保持している。

10

【0063】

20P1F12/TMPRSS2またはその改変型をコードする核酸はまた、次には治療的に有効な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用であるトランスジェニック動物または「ノックアウト」動物(または細胞株)のいずれかを作製するためにも使用されうる。トランスジェニック動物(例えば、マウスまたはラット)は、導入遺伝子を含む細胞を有する動物であり、その導入遺伝子は出生前、例えば胚期にその動物またはその動物の祖先へ導入された。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムへ組み込まれるDNAである。一つの態様において、20P1F12/TMPRSS2をコードするcDNAは、確立された技術に従って20P1F12/TMPRSS2をコードするゲノムDNAをクローニングするために使用されうり、そのゲノム配列は20P1F12/TMPRSS2をコードするDNAを発現する細胞を含有するトランスジェニック動物を作製するために使用される。トランスジェニック動物、特にマウスまたはラットのような動物を作製する方法は当技術分野においてありふれたものになり、例えば、米国特許第4,736,866号および第4,870,009号に記載されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサー組込み20P1F12/TMPRSS2導入遺伝子についてターゲットした。胚期に動物の生殖系列へ導入された20P1F12/TMPRSS2をコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物は、20P1F12/TMPRSS2をコードするDNAの増加した発現の効果を試験するために使用されうる。そのような動物は、例えば、その過剰発現に関連する病的状態から保護すると考えられる試薬についてのテスター動物として使用されうる。本発明のこの面に従って、動物をその試薬で処理し、未処理の導入遺伝子をもつ動物と比較して低下した病的状態の発生率より、その病的状態に対する治療的介入の可能性を示すものと思われる。

20

30

【0064】

または、20P1F12/TMPRSS2の非ヒト相同体は、20P1F12/TMPRSS2をコードする内因性遺伝子とその動物の胚細胞へ導入された20P1F12/TMPRSS2をコードする改変されたゲノムDNAとの間での相同的組換えの結果として、欠損したまたは改変された20P1F12/TMPRSS2をコードする遺伝子を有する20P1F12/TMPRSS2「ノックアウト」動物を構築するために使用されうる。例えば、20P1F12/TMPRSS2をコードするcDNAは、確立された技術に従って20P1F12/TMPRSS2をコードするゲノムDNAをクローニングするために使用されうる。20P1F12/TMPRSS2をコードするゲノムDNAの部分に欠失させる、または組込みをモニターするために使用されうる選択マーカーをコードする遺伝子のような、別の遺伝子で置換することができる。典型的には、数キロベースの改変されていないフランキングDNA(5'末端および3'末端の両方における)がベクターに含まれる(相同的組換えベクターの記載について、例えば、ThomasおよびCapecchi、1987、Cell 51:503を参照)。ベクターは、胚幹細胞系へ導入され(例えば、電気穿孔法により)、導入されたDNAが内因性DNAと相同的に組換わった細胞が選択される(例えば、Liら、1992、Cell 69:915を参照)。その後、選択された細胞は、動物(

40

50

例えば、マウスまたはラット)の胚盤胞へ注入され、集合キメラを形成する(例えば、Bradley、Robertson編、1987、「奇形癌腫と胚幹細胞：実践的アプローチ(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells:A Practical Approach)」、(IRL、オックスフォード)、PP. 113~152を参照)。キメラ胚は、その後、適する偽妊娠の雌養い動物へ移植され、その胚は「ノックアウト」動物を創造する期間まで導かれうる。生殖細胞に相同的に組換えられたDNAを含む子孫は、標準的技術により同定され、動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を産むために使用されうる。ノックアウト動物は、例えば、特定の病的状態に対して防御する能力として、および20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの欠如による病的状態の発生として、特徴付けられうる。

#### 【0065】

組換え方法は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質をコードする核酸分子を産生するために使用されうる。この事については、本明細書に記載される20P1F12/TMPRSS2コード核酸分子は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の決められた断片を産生するための手段を提供する。そのような20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドは特に、ドメイン特異的抗体(例えば、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の主に分泌されるまたは主に膜結合するエピトープを認識する抗体)を産生すること、特定の20P1F12/TMPRSS2ドメインに結合する薬剤または細胞因子を同定すること、および限定されるものではないが、癌ワクチンを含む、様々な治療的関連において有用である。特に興味深い構造を含む20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドは、例えば、チョーフアスマン(Chou-Fasman)、ガルニエル-ロブソン(Garnier-Robson)、キート-ドーリトル(Kyte-Doolittle)、アイゼンバーグ(Eisenberg)、カルプラス-シュルツ(Karplus-Schultz)もしくはジャメソン-ウルフ(Jameson-Wolf)分析、または免疫原性に基づく方法を含む、当技術分野においてよく知られている様々な分析的技術を使用して予測および/または同定されうる。

#### 【0066】

本発明のもう一つの局面は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質およびそのポリペプチド断片に免疫特異的に結合する抗体を提供する。最も好ましい抗体は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質に選択的に結合し、かつ非-20P1F12/TMPRSS2タンパク質およびポリペプチドに結合しない(または弱く結合する)ものと思われる。特に企図される抗20P1F12/TMPRSS2抗体は、これらの抗体の抗原結合ドメインおよび/または1つまたは複数の相補性決定領域を含有するフラグメントはもちろんのこと、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を含む。本明細書に使用される場合、抗体断片は、その標的に結合する免疫グロブリン分子の可変部、すなわち抗原結合部位の少なくとも部分として定義される。

#### 【0067】

いくつかの適用として、特定の20P1F12/TMPRSS2タンパク質および/または特定の構造的ドメイン内のエピトープと特異的に反応する抗体を産生することが望ましい場合もある。例えば、癌画像診断目的にとって有用である好ましい抗体は、癌細胞に発現される20P1F12/TMPRSS2タンパク質の膜結合領域におけるエピトープと反応するものである。そのような抗体は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質を用いる、または20P1F12/TMPRSS2の分泌性もしくは他のドメインに由来し、かつ免疫原として使用されるペプチドを用いることにより、産生されうる。

#### 【0068】

本発明の20P1F12/TMPRSS2抗体は、特に、前立腺癌、膀胱癌、肺癌、大腸癌、卵巣癌、腎臓癌、および転移性癌の診断的および予知的アッセイ法、画像処理方法論、および治療的戦略において有用でありうる。本発明は、20P1F12/TMPRSS2の検出および定量化にとって有用な様々な免疫学的アッセイ法を提供する。そのようなアッセイ法は、一般的に、20P1F12/TMPRSS2を認識および結合することができる1つまたは複数の20P1F12/TMPRSS2抗体を含み、かつ限定されるものではないが、放射免疫検定法、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、酵素結合免疫蛍光検定法(ELIFA)などの様々な型を含む、当技術分野においてよく知られている様々な免疫学的アッセイ形式内で行なわれうる。さらに、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌、ならびに転移性癌を検出することができる免疫学的

10

20

30

40

50

画像処理方法もまた本発明により提供され、限定されるものではないが、標識化20P1F12/TMPRSS2抗体を用いる放射シンチグラフィック画像処理方法を含む。そのようなアッセイ方法は、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌、ならびに転移性癌、特に進行癌の検出、モニタリング、および予知において、臨床上有用でありうる。TMPRSS2発現は、腎臓癌において低下するため、この癌の検出、モニタリング、および予知は、発現の下方制御または休止を判定することにより行われる。

【0069】

20P1F12/TMPRSS2抗体はまた、20P1F12/TMPRSS2タンパク質およびポリペプチドを精製する、および20P1F12/TMPRSS2相同体および関連分子を単離するための方法において使用されうる。例えば、一つの態様において、20P1F12/TMPRSS2タンパク質を精製する方法は、  
10 固体マトリックスに結合された20P1F12/TMPRSS2抗体を、20P1F12/TMPRSS2を含有する可溶化液または他の溶液とともに、その20P1F12/TMPRSS2抗体が20P1F12/TMPRSS2に結合することが可能となる条件下で、インキュベートすること；不純物を除去するためにその固体マトリックスを洗浄すること；およびその結合された抗体から20P1F12/TMPRSS2を溶離することを含む。本発明の20P1F12/TMPRSS2抗体の他の使用は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質を模倣する抗イディオタイプ抗体を産生することを含む。

【0070】

20P1F12/TMPRSS2抗体はまた、例えば、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の生物学的活性を調節もしくは抑制する、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質を発現する細胞(前立腺癌細胞、膀胱癌細胞、卵巣癌細胞、肺癌細胞および大腸癌細胞、または転移性癌細胞)をターゲットしかつ破壊するために使用されうる。前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌、  
20 ならびに転移性癌の抗体治療は、さらに詳細に、下に記載されている。これの関連において本発明の典型的態様は、腫瘍性細胞の増殖が抑制されるように、有効量の抗20P1F12/TMPRSS2抗体に、腫瘍性細胞により発現された20P1F12/TMPRSS2を接触させることを含む、20P1F12/TMPRSS2を発現する前癌性または癌性細胞の増殖を抑制する方法からなる。好ましくは、この方法において使用される抗体は、主に細胞表面に結合する20P1F12/TMPRSS2エピトープを認識する。抗体媒介の抑制および細胞溶解についての方法は、当技術分野においてよく知られており、例えば、補体媒介型または抗体依存性細胞障害(ADCC)を含む。この関連において、本発明の別の態様は、分泌性20P1F12/TMPRSS2の活性が調節されるように、  
30 有効量の抗20P1F12/TMPRSS2抗体に分泌性20P1F12/TMPRSS2を接触させることを含む、分泌性20P1F12/TMPRSS2の生物学的活性を調節する方法からなる。好ましくは、この方法において使用される抗体は、主に分泌される20P1F12/TMPRSS2エピトープを認識する。

【0071】

抗体の調製のための様々な方法は当技術分野において、よく知られている。例えば、抗体は、単離された形または免疫複合体の形での20P1F12/TMPRSS2タンパク質、ペプチド、または断片を使用して、適する哺乳動物宿主を免疫することにより調製されうる(「抗体：実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)」、CSHプレス(CSH Press)、HarlowおよびLane編、(1988)；Harlow、「抗体(Antibodies)」、コールドスプリングハーバープレス(Cold Spring Harbor Press)、NY(1989))。さらに、20P1F12/TMPRSS2 GST-融合タンパク質のような、20P1F12/TMPRSS2の融合タンパク質もまた使用されうる。特別な態様  
40 において、図1のオープンリーディングフレームアミノ酸配列のすべてまたは大部分を含むGST融合タンパク質は、作製されて、適切な抗体を産生する免疫原として使用されうる。実施例5に記載されているように、そのようなGST融合体は、20P1F12/TMPRSS2と免疫特異的に反応するいくつかのモノクローナル抗体を産生するために使用された。20P1F12/TMPRSS2を発現または過剰発現する細胞はまた、免疫化に使用されうる。同様に、20P1F12/TMPRSS2を発現するように操作された任意の細胞が使用されうる。この戦略により、内因性20P1F12/TMPRSS2を認識する能力が増強されたモノクローナル抗体の産生できるようになりうる。20P1F12/TMPRSS2抗体を産生するための追加的戦略は、本明細書の実施例5に記載されている。

【0072】

10

20

30

40

50

図1(配列番号：2)に示される20P1F12/TMPRSS2のアミノ酸配列は、免疫原を作製するための20P1F12/TMPRSS2タンパク質の特定の領域を選択するために使用されうる。例えば、20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列の疎水性および親水性の分析は、20P1F12/TMPRSS2構造における親水性領域を同定するために使用されうる。他の領域およびドメインと同様に、免疫原性構造を示す20P1F12/TMPRSS2タンパク質の領域は、チャー-ファスマン(Chou-Fasman)、ガルニエル-ロブソン(Garnier-Robson)、キート-ドーリトル(Kyte-Doolittle)、アイゼンバーグ(Eisenberg)、カルプラス-シュルツ(Karplus-Schultz)またはジャメソン-ウルフ(Jameson-Wolf)分析のような、当技術分野において公知の様々な他の方法を用いて容易に同定されうる。例えば、ある特定の20P1F12/TMPRSS2種(プロテアーゼドメインを含む32 kDの分泌性種または膜結合性種など、例えば、図17および図22を参照)を優先的にターゲットする抗体は、下記で論議されている方法により産生されうる。

10

#### 【0073】

免疫原としての使用のためのタンパク質またはポリペプチドを調製すること、およびBSA、KLHのような担体、または他の担体タンパク質とのタンパク質の免疫原性複合体を調製することについての方法は、当技術分野においてよく知られている。いくつかの状況においては、例えば、カルボジイミド試薬を使用する直接的結合が用いられてもよい；他の例では、ピアスケミカル社(Pierce Chemical Co.)、ロックフォード、ILにより供給されるような連結試薬が効果的である場合がある。20P1F12/TMPRSS2免疫原の投与は、当技術分野において一般的に理解されていることだが、一般的に、適するアジュバントとともに、適する期間にわたる注射により、行われる。免疫化スケジュールの間、抗体の力価を測り、抗体産生の妥当性を決定することができる。

20

#### 【0074】

抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体が好ましく、当技術分野においてよく知られている様々な方法により産生されうる。例えば、所望のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株は、一般的に知られていることだが、コーレル(Kohler)およびミルスタイン(Milstein)の標準的方法またはリンパ球もしくは脾臓細胞の不死化を実施する改変型を用いて調製されうる。所望の抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原が20P1F12/TMPRSS2タンパク質または20P1F12/TMPRSS2断片であるイムノアッセイ法によりスクリーニングされる。所望の抗体を分泌する適切な不死化細胞培養が同定された場合、その細胞は増量され、抗体は、インビトロでの培養または腹水液のいずれかから産生されうる。

30

#### 【0075】

抗体または断片はまた、組換え方法による、最新技術を用いて、産生されうる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質の所望の領域に特異的に結合する部位はまた、複数の種起源のキメラまたはCDR移植の抗体の関連において、産生されうる。ヒト化またはヒトの20P1F12/TMPRSS2抗体もまた、産生されうり、好ましいものである。そのようなヒト化抗体を産生するための様々な方法は公知であり、キメラまたはCDR移植方法；ファージディスプレイを含む完全にヒトモノクローナル抗体を産生するための方法およびトランスジェニック方法を含む(概説として、Vaughanら、1998、Nature Biotechnology 16:535~539を参照)。

#### 【0076】

完全ヒト20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体は、大きなヒトIg遺伝子コンビナトリアルライブラリー(すなわち、ファージディスプレイ)を使用するクローニング技術を用いて産生されうる(GriffithsおよびHoogenboom、「インビトロの免疫系の構築：ファージディスプレイライブラリーからのヒト抗体(Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries)」、「人への予防と治療の適用のための抗体分子のタンパク質工学(Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man)」、Clark, M. (編)、ノッティンガムアカデミック(Nottingham Academic)、pp 45~64 (1993); BurtonおよびBarbas、「コンビナトリアルライブラリーからのヒト抗体(Human Antibodies from combinatorial libraries)」、同書物、pp 65~82)。完全ヒト20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体はまた、クヘルラパティ(Kuchelapati)ら、1997年12月3日公開のPCT特許出願国際公開公報第98/24893号に記載

40

50

されているように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作されたトランスジェニックマウスを使用して産生されうる(Jakobovits、1998、Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4) : 607~614もまた参照)。この方法は、ファージディスプレイ技術を必要とするインビトロでの操作が避けられ、高親和性の確証的なヒト抗体を効率的に産生する。

【0077】

20P1F12/TMPRSS2抗体の20P1F12/TMPRSS2タンパク質との反応性は、適切に、20P1F12/TMPRSS2タンパク質、ペプチド、20P1F12/TMPRSS2発現細胞またはそれらの抽出物を用いて、ウエスタンブロット、免疫沈降、ELISA、およびFACS分析を含む、いくつかのよく知られている方法により立証されうる。

【0078】

本発明の20P1F12/TMPRSS2抗体またはその断片は、検出可能なマーカーで標識される、または細胞障害性もしくは治療的薬剤のような第二の分子に結合される、および20P1F12/TMPRSS2陽性の細胞をターゲットするために使用されうる(Vitetta, E. S.ら、1993、「免疫毒素治療(Immunotoxin therapy)」、DeVita, Jr., V. T.ら編、「癌：腫瘍学の原理と実践(Cancer: Principles and Practice of Oncology)」、第4版、J. B. リビンコット社(J. B. Lippincott Co.)、フィラデルフィア、2624~2636)。様々な適する診断的および治療的複合体は、当技術分野においてよく知られており、限定されるものではないが、放射体のような放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート化剤または酵素のようなポリペプチドを含む。典型的複合体は、例えば、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols In Molecular Biology)」、ユニット11および17、フレデリック M. オースブル(Frederick M. Ausubul)ら編、1995に記載されている。本発明の好ましい態様において、診断的および治療的複合体は、主に細胞表面に結合する20P1F12/TMPRSS2エピトープを認識する抗体に結合されている。

【0079】

本発明の抗体の典型的特定の態様は、下の実施例5に記載されている。実施例5に論議されているように、本明細書に記載される方法を用いて、1F9(IgG1, K)、2D10(IgG1, K)、2F8(IgG1, K)、6B11(IgG1, K)、3G3(IgG, K)、8C6(IgG1, K)および9G8(IgG2a, K)と名付けられるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが作製される。それゆえ、本発明の特定の抗体態様は、エピトープ結合部位が、ATCCアクセッション番号：\_\_のハイブリドーマそれぞれにより産生されるモノクローナル抗体1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および/または9G8のエピトープ結合の本質的にすべてを競合的に阻害するモノクローナル抗体を含む。本発明の関連する特定の態様は、診断的または治療的薬剤に連結された1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および/または9G8モノクローナル抗体(それぞれATCCアクセッション番号：\_\_)の抗原結合部位を含有する分子を含む免疫複合体を含む。

【0080】

1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および9G8と名付けられるモノクローナル抗体を利用する本発明のさらなる具体的態様は、哺乳動物からの試料にある20P1F12/TMPRSS2エピトープの存在を測定することによる癌のような無制御な細胞増殖を検出するための方法を含み、その方法は、試料中に存在する20P1F12/TMPRSS2エピトープと反応するモノクローナル抗体を使用することを含み、その抗体は20P1F12/TMPRSS2エピトープに免疫学的に結合することを特徴とし、該抗体は、1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および/または9G8と名付けられかつそれぞれATCCアクセッション番号：\_\_からなる群より選択されるハイブリドーマにより産生される抗体の、その標的抗原への免疫特異的な結合を競合的に阻害する抗原結合部位を有する。1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および9G8と名付けられるモノクローナル抗体を利用する本発明の他の特定の態様は、癌のような無制御な細胞増殖の進行を抑制するための方法を含み、その方法は、癌の進行が抑制されるように、モノクローナル抗体または抗原結合性断片に20P1F12/TMPRSS2エピトープを接触させることを含み、該モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、ハイブリドーマATCCアクセッション番号：\_\_それぞれにより産生されるマウスモノクローナル抗体1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および/または9G8の抗原結合部位を有する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 1 】

1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および9G8と名付けられるモノクローナル抗体を利用する本発明のさらなる具体的態様は、生体試料において癌のような無制御な細胞増殖の存在を測定するための方法を含み、その方法は、モノクローナル抗体または抗原結合性断片がハイブリドーマATCCアクセション番号：\_\_それぞれにより産生されるマウスモノクローナル抗体1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および/または9G8の抗原結合部位を有する、20P1F12/TMPRSS2エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片に該試料の検体を接触させること、および該抗体または断片の該生体試料への結合を検出することを含む。

## 【 0 0 8 2 】

下記に詳細に論議されているように、1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および9G8と名付けられるモノクローナル抗体を利用する本発明の追加の特定の態様は、生体試料において癌のような無制御な細胞増殖を抑制するための方法を含み、その方法は、モノクローナル抗体または抗原結合性断片がハイブリドーマATCC番号：\_\_それぞれにより産生されるマウスモノクローナル抗体1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および/または9G8の抗原結合部位を有する、20P1F12/TMPRSS2エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片に該試料の検体を無制御な細胞増殖が抑制されるように接触させることを含む。

## 【 0 0 8 3 】

図7Bおよび図33に示されるデータは、20P1F12/TMPRSS2が正常な腎臓組織において発現されるが、たいていの腎臓癌組織においては、下方制御されるまたはより低いレベルで発現されることを示す。図33に示される実験での一つの例では、腎臓癌における発現は、正常組織と比較して上方制御されている。このように、20P1F12/TMPRSS2の下方制御は、患者が腎臓癌を発生させやすい可能性がある。従って、腎臓癌の治療についての治療学的方法是、腎臓癌である患者に20P1F12/TMPRSS2またはその機能的断片を投与すること、または20P1F12/TMPRSS2を発現する遺伝子構築物で癌性細胞を形質移入すること(例えば、当業者に公知のウイルスもしくはリポソーム送達または他の送達方法による、遺伝子治療)を含む。

## 【 0 0 8 4 】

本発明のさらに別の例示としての治療的および診断的方法は、下記に提供されている。これらの方法は、単に、本明細書に記載される本発明の典型的態様を示すものであり、いずれの点においても本発明を限定しない。

## 【 0 0 8 5 】

例示としての本発明の治療的方法

20P1F12/TMPRSS2タンパク質は、分泌された形および細胞表面に結合した形の両方において見出されうるセリンプロテアーゼであり、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、大腸癌、および他の癌の浸潤および転移に關与している可能性がある。従って、20P1F12/TMPRSS2は、治療的処置にとっての理想的標的でありうる。本明細書で言及されているように、20P1F12/TMPRSS2は、分泌性種および膜結合性種を含む、様々な形または種で生じることが見出される。その分泌性プロテアーゼ種は、例えば、可能性のある薬剤および抗体標的であり、一方、膜結合性種は、例えば、治療的抗体標的である。それゆえ、本発明は、20P1F12/TMPRSS2に対応するポリヌクレオチドおよびポリペプチドならびに抗20P1F12/TMPRSS2抗体を利用する、抗体治療、インビボのワクチン、およびエクスビボの免疫治療的方法を含む、前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、肺癌、および卵巣癌ならびに転移性癌を治療するための様々な免疫治療的組成物および方法を提供する。この事において本発明の典型的態様は、腫瘍性細胞の増殖が抑制されるように、有効量の抗20P1F12/TMPRSS2抗体に、腫瘍性細胞により発現された20P1F12/TMPRSS2を接触させることを含む、20P1F12/TMPRSS2を発現する腫瘍性細胞の増殖を抑制することの方法からなる。

## 【 0 0 8 6 】

一つの方法において、抗20P1F12/TMPRSS2抗体は、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌お

10

20

30

40

50

よび大腸癌ならびに転移性癌のような癌を治療するために使用されうる。例えば、抗20P1F12/TMPRSS2抗体は、患者へ導入され、その抗体が遊離の20P1F12/TMPRSS2に結合してその生物学的活性を調節し、それにより腫瘍の浸潤の抑制へと導きうる。または、抗20P1F12/TMPRSS2抗体は、患者へ導入され、その抗体が前立腺癌細胞、膀胱癌細胞、卵巣癌細胞、肺癌細胞もしくは大腸癌細胞または転移性癌細胞の20P1F12/TMPRSS2に結合して、細胞および腫瘍の破壊を媒介しうる。治療的作用機構は、補体媒介型細胞溶解、抗体依存性細胞障害、20P1F12/TMPRSS2の生理的機能を変化させること、および/またはリガンド結合もしくはシグナル伝達の経路の阻害を含んでいる可能性がある。リシンのような毒性剤、または治療的薬剤に抱合された抗20P1F12/TMPRSS2抗体はまた、その毒性剤または治療的薬剤を直接的に20P1F12/TMPRSS2を有する腫瘍細胞へ送達し、それにより腫瘍を破壊するために、治療的に使用されうる。

10

## 【0087】

抗20P1F12/TMPRSS2抗体を使用する癌の免疫治療は、限定されるものではないが、大腸癌(Arlenら、1998、Crit Rev Immunol 18:133~138)、多発性骨髄腫(Ozakiら、1997、Blood 90:3179~3186; Tsunenariら、1997、Blood 90:2437~2444)、胃癌(Kasprzykら、1992、Cancer Res 52:2771~2776)、B細胞リンパ腫(Funakoshiら、1996、J Immunother Emphasis Tumor Immunol 19:93~101)、白血病(Zhongら、1996、Leuk Res 20:581~589)、結腸直腸癌(Mounら、1994、Cancer Res 54:6160~6166; Veldersら、1995、Cancer Res 55:4398~4403)、および乳癌(Shepardら、1991、J Clin Immunol 11:117~127)を含む、癌の他の型に関して首尾よく用いられた様々な方法から得られる教えにしたがってもよい。

20

## 【0088】

20P1F12/TMPRSS2抗体は、患者に導入されて、その抗体が癌細胞の20P1F12/TMPRSS2に結合し、細胞および腫瘍の破壊を媒介するならびに/または細胞および腫瘍の増殖を抑制しうる。そのような抗体が治療的効果を発揮する機構は、補体媒介型細胞溶解、抗体依存性細胞障害、20P1F12/TMPRSS2の生理的機能を調節すること、リガンド結合もしくはシグナル伝達の経路を阻害すること、腫瘍細胞分化を調節すること、腫瘍の血管形成誘導因子の性質を変化させること、および/またはアポトーシスを誘導することによることを含んでいる可能性がある。毒性剤または治療的薬剤に抱合された20P1F12/TMPRSS2抗体はまた、その毒性剤または治療的薬剤を直接的に20P1F12/TMPRSS2を有する腫瘍細胞へ送達するために治療的に使用されうる。

30

## 【0089】

20P1F12/TMPRSS2抗体治療は、前述の癌のあらゆる時期にとって有用でありうるが、抗体治療は、特に、進行型もしくは転移性の前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌、ならびに/または他の転移性癌において適しうる。本発明の抗体治療での処置は、1つまたは複数の化学療法的処置を受けた患者に対して必要とされうるが、本発明の抗体治療法を化学療法またはホルモン療法と組み合わせることは、化学療法的処置を受け入れなかった患者において好ましいものとなりうる。さらに、抗体治療はまた、特に化学療法剤の毒性に対して十分に耐えられない患者において、併用のホルモンまたは化学療法の減らした投与量での使用を可能にしうる。

40

## 【0090】

患者が20P1F12/TMPRSS2の存在およびレベルを評価されることは、望ましい場合があり、好ましくは、腫瘍組織の免疫組織化学的評価、定量的20P1F12/TMPRSS2画像診断、または発現の存在および程度を確実に示すことができる他の技術を用いる。腫瘍生検または外科的検体の免疫組織化学的分析は、この目的にとって好ましいものとなりうる。腫瘍組織の免疫組織化学的分析の方法は当技術分野においてよく知られている。

## 【0091】

前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌ならびに他の癌を治療するにおいて有用な抗20P1F12/TMPRSS2抗体は、腫瘍に対して強力な免疫応答を惹起することができるもの、および直接的細胞障害性の能力があるものを含む。この点において、実施例5で論議されているもののような抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体は、補体媒介型または抗体

50

依存性細胞障害(ADCC)機構のいずれかにより腫瘍細胞溶解を誘発することができ、その機構のどちらも、効果細胞Fc受容体部位または補体タンパク質との相互作用のために免疫グロブリン分子の無傷のFc部分を必要とする。さらに、腫瘍増殖に直接的生物学的効果を発揮する抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体は、本発明の実施において有用である。そのような直接的細胞障害性モノクローナル抗体が作用する可能性のある機構は、細胞増殖の抑制、細胞分化の調節、腫瘍の血管形成誘導因子の性質の調節、およびアポトーシスの誘導を含む。特定の抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体が抗腫瘍効果を発揮する機構は、当技術分野において一般的に知られているが、増殖抑制、アポトーシスの調節および分化の抑制、ならびに/または血管形成誘導の阻害と同様に、ADCCおよび補体媒介型細胞溶解を決定するために設計されたインビトロのアッセイ法のいくつかを用いて評価される。

10

#### 【0092】

1F9、2D10、2F8、6B11、3G3、8C6および9G8のような抗体が前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌ならびに転移性癌のような癌の進行を抑制する、さらに別の可能性のある機構は、例えば、前立腺癌および大腸癌に罹っている個体の血清に見出される32 kDの20P1F12/TMPRSS2種のプロテアーゼ活性を調節することによる(例えば、図23および図25を参照)。20P1F12/TMPRSS2の分泌型が前立腺癌および大腸癌に罹っている個体の血清において見出されるという発見は、この分子を細胞外治療学が標的とすることができるという証拠を提供している。この事において、発癌過程に関与するプロテアーゼ機能を阻害する抗体の使用が、転移のような発癌過程を阻害することが示された(例えば、Muellerら、P. N. A. S. 89(24):11832~11836(1992); Wahgrayら、Clin. Cancer Res. 1(7):747~753(1995)を参照)。抗体に加えて、プロテアーゼ活性を調節する低分子もまた、発癌過程の進行を抑制することができ、例えば、様々な癌をもつ患者における抗転移治療として有用でありうる(例えば、McMillanら、Int. J. Cancer 67(4):523~531(1996); Morikawaら、Nippon Ika Daigaku Zasshi 62(4):320~328(1995)を参照)。プロテアーゼ阻害剤の合理的設計は、当技術分野において公知である(例えば、Wagnerら、J. Med. Chem. 41(19):3664~3674(1998); LaLondeら、J. Med. Chem. 41(23):4567~4576(1998)を参照)。さらに、観察される自己触媒的切断(下記の実施例10を参照)は、20P1F12/TMPRSS2活性を阻害する低分子を同定するために利用される。特に、切断の阻害を明確に探すために、細胞を低分子阻害剤の存在または非存在において増殖させてもよい。さらに、20P1F12/TMPRSS2と相互作用しうる分子の同定は、下記に詳細に論議されている。

20

30

#### 【0093】

特定の抗20P1F12/TMPRSS2抗体、低分子、またはそのような分子の組合わせの抗腫瘍活性は、適する動物モデルを用いてインビボで評価される。例えば、ヒト前立腺癌外植片または継代異種移植組織がヌードマウスまたはSCIDマウスのような免疫易感染性動物へ導入される異種間の前立腺癌モデルは、前立腺癌の関連において適当であり、記載されている(Keinら、1997、Nature Medicine 3:402~408)。例えば、1998年4月23日公開のPCT特許出願国際公開公報第98/16628号、ソーヤーズ(Sawyers)らには、原発腫瘍の発生、微小転移、および末期の疾患に特有な造骨細胞転移の形成を反復することができるヒト前立腺癌の様々な異種移植モデルを記載している。効力は、腫瘍形成の抑制、腫瘍退縮、転移などを用いて予測される。

40

#### 【0094】

マウスまたは他の非ヒトのモノクローナル抗体、ヒト/マウスのキメラのモノクローナル抗体の使用は、いくらかの患者において中位から強度の免疫応答を誘導する可能性があることは留意されるべきである。最も重篤な場合では、そのような免疫応答は、腎機能不全を引き起こす可能性がある免疫複合体の広範な形成へ導きうる。従って、本発明の治療方法の実施において使用される好ましいモノクローナル抗体は、完全なヒト型またはヒト化のいずれかであり、かつ高親和性で標的20P1F12/TMPRSS2抗原に特異的に結合するが、患者において低抗原性であるまたは抗原性を示さないものである。

#### 【0095】

50

本発明の方法は、異なるモノクローナル抗体の組み合わせ、つまり「カクテル」と同様に、単一の抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体の投与を企図している。そのようなモノクローナル抗体カクテルは、異なるエピトープ特異性、異なるエフェクター機構を活用する、または免疫エフェクター機能性に頼るモノクローナル抗体と細胞障害性モノクローナル抗体を直接的に結合するモノクローナル抗体を含むことから、確かな利点を有しうる。そのような組み合わせのモノクローナル抗体は、相乗的な治療効果を示しうる。さらに、抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体の投与は、限定されるものではないが、様々な化学療法剤、アンドロゲン-ブロッカー、および免疫モジュレーター(例えば、IL-2、GM-CSF)を含む、他の治療薬剤または放射線療法と併用されてもよい。抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体は、「裸の(naked)」型もしくは非抱合型で投与されてもよい、またはそれらに抱合された治療的薬剤もしくは毒性剤を有してもよい。

10

## 【0096】

本発明の方法の実施において使用される抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体は、所望の送達方法に適した担体を含む薬学的組成物へ処方されてもよい。適する担体は、抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体と組み合わせられた場合、その抗体の特異性および抗腫瘍機能を維持し、かつその対象の免疫系に反応しない任意の物質を含む。例には、限定されるものではないが、無菌のリン酸緩衝生理食塩水溶液、静菌性水などのような多数の標準的な薬学的担体のいずれかを含む。

## 【0097】

抗20P1F12/TMPRSS2抗体製剤は、抗体を腫瘍部位へ送達することができる任意の経路により投与されうる。可能性のある効果的な投与経路は、限定されるものではないが、静脈内、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内などを含む。好ましい投与経路は静脈内注射による。静脈内注射のために好ましい処方は、保存静菌性水、滅菌非保存水の溶液中、および/または0.9%注射用無菌塩化ナトリウム、USPを含有するポリ塩化ビニルもしくはポリエチレンバッグ中に希釈された抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体を含む。抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体調製は、凍結乾燥されて、好ましくは真空下で、無菌粉末として保存され、かつその後、例えばベンジルアルコール保存剤を含む静菌性水中、または注射前に滅菌水中で元に戻しうる。

20

## 【0098】

治療は、一般的に、静脈内注射(IV)のような条件にあった投与経路による抗20P1F12/TMPRSS2抗体調製の、典型的には、約0.1 mg/kg体重~約10 mg/kg体重の範囲での投与量での、頻回の投与を含むものと思われる。週あたり10 mg~500 mgのモノクローナル抗体の範囲での投与量は、効果的かつ十分に許容されうる。転移性乳癌の治療におけるハーセプチン(Herceptin)モノクローナル抗体での臨床的経験に基づき、抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体調製の約4 mg/kg患者体重IVの初回負荷投与量、続いて毎週約2 mg/kg IVの投与量が、許容できる投与計画を代表しうる。好ましくは、初回負荷投与量は、90分またはそれ以上長い注入として投与される。定期的維持量は、その初回投与量が十分耐えられたという条件で、30分またはそれ以上長い注入として投与されうる。しかしながら、当業者は理解しているだろうが、特別な場合において、様々な因子が理想的投与計画に影響を及ぼすものと思われる。そのような因子は、例えば、モノクローナル抗体の結合親和性および半減期、患者における20P1F12/TMPRSS2過剰発現の程度、循環脱落20P1F12/TMPRSS2抗原の範囲、所望の定常状態の抗体濃度レベル、治療頻度、および本発明の治療方法と組み合わせで使用される化学療法剤の影響を含む可能性がある。

30

40

## 【0099】

最適には、最も効果的な投与計画および関連因子の決定に援助するために、患者は、血清中の循環脱落20P1F12/TMPRSS2抗原のレベルについて評価されるべきである。そのような評価はまた、治療を通してのモニタリング目的のために使用されうり、他のパラメーター(前立腺癌治療における血清PSAレベルのような)を評価することと合わせて、治療的成功度を測るために有用でありうる。

## 【0100】

50

本発明はさらに、20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその断片を含む癌ワクチンを提供する。抗癌治療における用途として体液性および細胞性免疫を起こすためのワクチンにおいての腫瘍抗原の使用は、当技術分野においてよく知られており、ヒトPSMAおよび齧歯類PAP免疫原を使用して、前立腺癌において用いられた(Hodgeら、1995、*Int. J. Cancer* 63:231~237; Fongら、1997、*J. Immunol.* 159:3113~3117)。そのような方法は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質もしくはその断片、または20P1F12/TMPRSS2免疫原を発現かつ適切に提示することができる20P1F12/TMPRSS2コード核酸分子および組換えベクターを使用することにより、容易に実施されうる。この事において、特定のドメイン(32 kDの分泌性20P1F12/TMPRSS2種におけるプロテアーゼドメインのような)または上記で論議されている生物学的モチーフの一つをターゲットとするものを含む、様々な20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドを免疫原として使用することができる。実施例5および表2に示されるように、20P1F12/TMPRSS2免疫原は、様々な20P1F12/TMPRSS2エピトープに対する免疫応答を起こすことができる。

10

**【0101】**

ウイルスの遺伝子送達系は、20P1F12/TMPRSS2コード核酸分子を送達するために使用されうる。本発明のこの局面の実施において使用されうる様々なウイルスの遺伝子送達系は、限定されるものではないが、ワクシニア、ニワトリボックス、カナリアボックス、アデノウイルス、インフルエンザ、ポリオウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス、およびシンドビスウイルスを含む(Restifo、1996、*Curr. Opin. Immunol.* 8:658~663)。非ウイルスの送達系もまた、抗腫瘍応答を引き起こすために患者へ導入される(例えば、筋肉内に)、20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその断片をコードする裸のDNAを使用することにより用いられうる。一つの態様において、完全長ヒト20P1F12/TMPRSS2 cDNAが使用されうる。もう一つの態様において、特定の細胞障害性Tリンパ球(CTL)エピトープをコードする20P1F12/TMPRSS2核酸分子が使用されうる。CTLエピトープは、特定化されたHLA対立遺伝子に最適に結合することができる20P1F12/TMPRSS2タンパク質の範囲内のペプチドを同定するための特定のアルゴリズム(例えば、エピマー(Epmier)、ブラウン大学(Brown University))を用いて決定が可能である。

20

**【0102】**

様々なエキスビポでのストラテジーもまた、使用されうる。一つの方法は、患者の免疫系に対して20P1F12/TMPRSS2抗原を提示する樹状細胞の使用を含む。樹状細胞は、MHCクラスIおよびクラスII、B7補助刺激物質、ならびにIL-12を発現し、このように、高特定化抗原提示細胞である。前立腺癌において、前立腺特異的膜抗原(PSMA)のペプチドでパルスされた自己樹状細胞は、前立腺癌患者の免疫系を刺激するためにフェーズI臨床試験において使用されるものである(Tjoaら、1996、*Prostate* 28:65~69; Murphyら、1996、*Prostate* 29:371~380)。樹状細胞は、MHCクラスIおよびクラスII分子の関係において、T細胞に20P1F12/TMPRSS2ペプチドを提示するために使用されうる。一つの態様において、自己樹状細胞は、MHC分子に結合することができる20P1F12/TMPRSS2ペプチドでパルスされる。もう一つの態様において、樹状細胞は、完全20P1F12/TMPRSS2タンパク質でパルスされる。さらにもう一つの態様は、アデノウイルス(Arthurら、1997、*Cancer Gene Ther.* 4:17~25)、レトロウイルス(Hendersonら、1996、*Cancer Res.* 56:3763~3770)、レンチウイルス、アデノ関連ウイルス、DNAトランスフェクション(Ribasら、1997、*Cancer Res.* 57:2865~2869)、および腫瘍由来RNAトランスフェクション(Ashleyら、1997、*J. Exp. Med.* 186:1177~1182)のような、当技術分野において公知の様々な実行ベクターを用いて、樹状細胞において20P1F12/TMPRSS2遺伝子の過剰発現を操作することを含む。

30

40

**【0103】**

抗-イディオタイプ抗-20P1F12/TMPRSS2抗体もまた、20P1F12/TMPRSS2タンパク質を発現する細胞に免疫応答を誘導するためのワクチンとして抗癌治療において使用されうる。特に、抗イディオタイプ抗体の産生は、当技術分野においてよく知られており、20P1F12/TMPRSS2タンパク質上のエピトープを模倣する抗-イディオタイプ抗-20P1F12/TMPRSS2抗体を産生するために容易に適合されうる(例えば、Wagnerら、1997、*Hybridoma* 16:33~40; Fo

50

onら、1995、J Clin Invest 96:334~342; Herlynら、1996、Cancer Immunol Immunother 43:65~76を参照)。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る他の抗イディオタイプ抗体で現在実施されているように、抗イディオタイプ治療において使用されうる。

#### 【0104】

遺伝子免疫方法は、20P1F12/TMPRSS2を発現する癌細胞、特に、前立腺癌細胞、膀胱癌細胞、卵巣癌細胞、肺癌細胞および大腸癌細胞ならびに転移性癌細胞に対して向けられる予防的または治療的な体液性および細胞性免疫応答を起こすために使用されうる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質/免疫原をコードするDNAおよび適切な制御配列を含む構築物は、個体の筋肉または皮膚へ直接的に注射され、筋肉または皮膚の細胞がその構築物を取り上げてコードされる20P1F12/TMPRSS2タンパク質/免疫原を発現しうる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質/免疫原は、細胞表面タンパク質として発現されるまたは分泌されうる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質/免疫原の発現は、結果として、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌ならびに転移性癌に対する予防的または治療的な体液性および細胞性免疫の誘発を生じる。当技術分野において公知の様々な予防的および治療的遺伝子免疫技術が使用されうる(概説として、インターネットアドレスwww.genweb.comで公開される情報および文献を参照)。

#### 【0105】

本発明のこの局面の典型的態様は、20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの免疫原性部分および生理学的に許容される担体を含む、20P1F12/TMPRSS2を発現する癌の治療のためのワクチン組成物からなる。この発明の関連局面は、有効量のワクチンを患者に投与することを含む、患者において20P1F12/TMPRSS2を発現する細胞の増殖を調節することの方法からなる。

#### 【0106】

本発明はさらに、20P1F12/TMPRSS2機能を阻害するための方法と同様に、20P1F12/TMPRSS2のその結合パートナーもしくはリガンドへの結合、またはその他のタンパク質との会合を阻害するための様々な方法および組成物を含む。一つの方法において、20P1F12/TMPRSS2に特異的に結合する単鎖抗体をコードする組換えベクターは、遺伝子導入技術により20P1F12/TMPRSS2発現細胞へ導入されうり、そのコードされる単鎖抗20P1F12/TMPRSS2抗体が細胞内で発現され、20P1F12/TMPRSS2タンパク質に結合し、かつそれによりその機能を阻害する。そのような細胞内単鎖抗体を操作する方法はよく知られている。「イントラボディ(intrabodies)」としても知られている、そのような細胞内抗体は、細胞内の特定の区画へ特異的にターゲットされうり、治療の抑制活性が集中されるような制御を与える。この技術は、当技術分野において首尾よく適用された(概説として、RichardsonおよびMarasco、1995、TIBTECH、13巻を参照)。イントラボディは、その他に大量の細胞表面受容体の発現を事実上、排除することが示された。例えば、Richardsonら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137~3141; Beerliら、1994、J. Biol. Chem. 289:23931~23936; Deshaneら、1994、Gene Ther. 1:332~337を参照。

#### 【0107】

単鎖抗体は、屈曲性リンカーポリペプチドにより連結されている重鎖および軽鎖の可変ドメインを含み、単一ポリペプチドとして発現される。選択的には、単鎖抗体は、軽鎖定常部に連結されている単鎖可変部フラグメントとして発現されてもよい。よく知られている細胞内輸送シグナルは、発現されたイントラボディを所望の細胞内区画へ正確にターゲットするために、そのような単鎖抗体をコードする組換えポリヌクレオチドベクターへと操作されうる。例えば、小胞体(ER)へターゲットされるイントラボディは、リーダーペプチドおよび、選択的には、KDELアミノ酸モチーフのようなC末端ER保持シグナルを組み込むように操作されうる。核で活性を発揮することを意図されるイントラボディは、核局在化シグナルを含むように操作されうる。脂質部分は、イントラボディを原形質膜の細胞質ゾル側に繋ぎとめるために、イントラボディに連結されうる。イントラボディはまた、細胞質ゾル中で機能を発揮することも目標とされうる。例えば、細胞質ゾルのイントラボデ

10

20

30

40

50

ィは、細胞質ゾル内で因子を隔離するために使用されうり、それにより、それらが本来の細胞目的地へ輸送されるのを妨げる。

【0108】

一つの態様において、イントラボディは、核で20P1F12/TMPRSS2を捕獲するために使用されうり、それにより、核内でのその活性を妨げる。核ターゲティングシグナルは、所望のターゲティングを達成するために、そのような20P1F12/TMPRSS2イントラボディへと操作されうり。そのような20P1F12/TMPRSS2イントラボディは、特定の20P1F12/TMPRSS2ドメインへ特異的に結合するように設計されうり。もう一つの態様において、20P1F12/TMPRSS2タンパク質へ特異的に結合する細胞質ゲルのイントラボディは、20P1F12/TMPRSS2が核へ接近するのを妨げるために使用されうり、それにより、それが核内で任意の生物学的活性を発揮するのを妨げる(例えば、20P1F12/TMPRSS2が他の因子と転写複合体を形成するのを妨げること)。

10

【0109】

そのようなイントラボディの発現を特定の腫瘍細胞へ特異的に方向付けるために、イントラボディの転写は、適切な腫瘍特異的プロモーターおよび/またはエンハンサーの制御管理下へ置かれうり。イントラボディの発現を前立腺へ特異的にターゲットするために、例えば、PSAプロモーターおよび/またはプロモーター/エンハンサーが利用されうり(例えば、米国特許第5,919,652号を参照)。

【0110】

もう一つの方法において、20P1F12/TMPRSS2に結合して、それにより20P1F12/TMPRSS2がその結合パートナーに接近する/結合するまたは他のタンパク質と会合するのを妨げることができる組換え分子は、20P1F12/TMPRSS2機能を阻害するために使用される。そのような組換え分子は、例えば、20P1F12/TMPRSS2特異的抗体分子の反応性部分を含みうり。特別な態様において、20P1F12/TMPRSS2結合パートナーの20P1F12/TMPRSS2結合ドメインは、ヒトIgG1のような、ヒトIgGのFc部分に連結される2つの20P1F12/TMPRSS2リガンド結合ドメインを含む二量体の融合タンパク質へと操作されうり。そのようなIgG部分は、例えば、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3ドメインならびにヒンジ部を含みうり、C<sub>H</sub>1ドメインは含まない。そのような二量体融合タンパク質は、限定されるものではないが、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌および大腸癌、ならびに転移性癌を含む、20P1F12/TMPRSS2の発現に関連する癌に罹っている患者へ可溶性の形で投与されうり、その二量体融合タンパク質は20P1F12/TMPRSS2へ特異的に結合し、それにより20P1F12/TMPRSS2の結合パートナーとの相互作用を妨害する。そのような二量体融合タンパク質は、さらに、公知の抗体連結技術を用いて、多量体タンパク質へと結合されうり。

20

30

【0111】

治療的方法のもう一つの部類内では、本発明は、20P1F12/TMPRSS2遺伝子の転写を阻害するための様々な方法および組成物を提供する。同様に、本発明はまた、20P1F12/TMPRSS2 mRNAのタンパク質への翻訳を阻害するための方法および組成物を提供する。

【0112】

一つの方法において、20P1F12/TMPRSS2遺伝子の転写を阻害する方法は、実施例14に示されるように、20P1F12/TMPRSS2遺伝子を20P1F12/TMPRSS2アンチセンスポリヌクレオチドに接触させることを含む。もう一つの方法において、20P1F12/TMPRSS2 mRNA翻訳を阻害する方法は、20P1F12/TMPRSS2 mRNAをアンチセンスポリヌクレオチドに接触させることを含む。もう一つの方法において、20P1F12/TMPRSS2特異的リボザイムは、20P1F12/TMPRSS2メッセージを切断するために使用されうり、それにより翻訳を阻害する。そのようなアンチセンスおよびリボザイムに基づく方法はまた、20P1F12/TMPRSS2プロモーターおよび/またはエンハンサーエレメントのような、20P1F12/TMPRSS2遺伝子の制御領域へ向けられうり。同様に、20P1F12/TMPRSS2遺伝子転写因子を阻害することができるタンパク質は、20P1F12/TMPRSS2 mRNA転写を阻害するために使用されうり。前述の方法において有用な様々なポリヌクレオチドおよび組成物は、上に記載された。転写および翻訳を阻害するアンチセンスおよびリボザイム分子の使用は、当技術分野においてよく知られている。

40

50

## 【0113】

20P1F12/TMPRSS2転写活性化を妨害することを通して20P1F12/TMPRSS2の転写を阻害する他の因子はまた、20P1F12/TMPRSS2を発現する癌の治療にとって有用でありうる。同様に、20P1F12/TMPRSS2プロセッシングを妨害することができる因子は、20P1F12/TMPRSS2を発現する癌の治療にとって有用でありうる。そのような因子を利用する癌治療方法はまた、本発明の範囲内である。

## 【0114】

遺伝子導入および遺伝子治療の技術は、治療的ポリヌクレオチド分子を20P1F12/TMPRSS2を合成する腫瘍細胞へ送達するために使用されうる(すなわち、アンチセンス、リボザイム、イントラボディをコードするポリヌクレオチドおよび他の20P1F12/TMPRSS2阻害性分子)。多数の遺伝子治療方法が当技術分野において知られている。20P1F12/TMPRSS2アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、20P1F12/TMPRSS2転写を妨害することができる因子などをコードする組換えベクターは、そのような遺伝子治療方法を用いて、腫瘍細胞をターゲットするように送達されうる。

10

## 【0115】

上記治療的方法は、幅広く様々な化学療法または放射線治療のいずれか一つと併用されてもよい。これらの治療的方法はまた、化学療法の減らされた投与量および/またはより少ない投与回数での使用を、特に、化学療法剤の毒性に十分に耐えられない患者において、可能にしうる。

20

## 【0116】

特定の組成物(例えば、アンチセンス、リボザイム、イントラボディ)、またはそのような組成物の組合わせの抗腫瘍活性は、様々なインビトロおよびインビボのアッセイ系を用いて評価しうる。治療的可能性を評価するためのインビトロのアッセイ法は、細胞増殖アッセイ法、軟寒天アッセイ法、浸潤および血管形成誘導アッセイ法および腫瘍促進活性を指示する他のアッセイ法、治療的組成物が結合パートナーなどへの20P1F12/TMPRSS2の結合を阻害するであろうまでのその程度を測定することができる結合アッセイ法を含む。

## 【0117】

インビボでは、20P1F12/TMPRSS2治療的組成物の効果は、適する動物モデルにおいて評価されうる。例えば、ヒト前立腺癌外植片または継代異種移植組織がヌードマウスまたはSCIDマウスのような免疫易感染性動物へ導入される異種間の前立腺癌モデルは、前立腺癌の関連において適当であり、記載されている(Keinら、1997、Nature Medicine 3:402~408)。例えば、1998年4月23日公開のPCT特許出願国際公開公報第98/16628号、ソーヤーズ(Sawyers)らには、原発腫瘍の発生、微小転移、および末期の疾患に特有な造骨細胞転移の形成を反復することができるヒト前立腺癌の様々な異種移植モデルを記載している。効力は、腫瘍形成の抑制、腫瘍退縮または転移などを測定するアッセイ法を用いて予測されうる。下記の実施例も参照。

30

## 【0118】

アポトーシスの促進を認定するインビボのアッセイ法もまた、可能性のある治療的組成物を評価するにおいて有用でありうる。一つの態様において、その治療的組成物で処理された保有マウスからの異種移植片は、アポトーシスの病巣の存在を検査されて、未処理の対照の異種移植片保有マウスと比較されうる。アポトーシスの病巣が処理されたマウスの腫瘍において見出されるまでの程度が、その組成物の治療的効力を指示するものとなる。

40

## 【0119】

前記の方法の実施において使用される治療的組成物は、所望の送達方法に適した担体を含む薬学的組成物へ処方されてもよい。適する担体は、その治療的組成物と組み合わせられた場合、その治療的組成物の抗腫瘍機能を維持し、かつ患者の免疫系に反応しない任意の物質を含む。例には、限定されるものではないが、無菌のリン酸緩衝生理食塩水溶液、静菌性水などのような多数の標準的な薬学的担体のいずれかを含む(一般的には、「レミンTONの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第16版、A. Osal. 編、1980を参照)。

50

## 【0120】

治療的製剤は、可溶化され、治療的組成物を腫瘍側へ送達することができる任意の経路により投与されうる。可能性のある効果的な投与経路は、限定されるものではないが、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内、器官内、同所などを含む。静脈内注射のために好ましい処方は、保存静菌性水、滅菌非保存水の溶液中、および/または0.9%注射用無菌塩化ナトリウム、USPを含有するポリ塩化ビニルもしくはポリエチレンバッグ中に希釈された治療的組成物を含む。治療的組成物調製は、凍結乾燥されて、好ましくは真空下で、無菌粉末として保存され、かつその後、例えばベンジルアルコール保存剤を含む静菌性水中、または注射前に滅菌水中で元に戻しうる。

## 【0121】

前記の方法を用いる癌治療についての投与量および投与プロトコールは、その方法および標的癌により変わってくるだろうし、かつ一般的に、当技術分野において認識されている多数の他の因子に依存するものと思われる。

## 【0122】

ペプチドモチーフおよびワクチン設計

20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質の生物学的モチーフにおいてのような、「モチーフ」とは、タンパク質の一次配列のアミノ酸形成部分の任意のパターンを指し、特定の機能(例えば、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-DNA相互作用など)もしくは修飾(例えば、それをリン酸化、グリコシル化またはアミド化する)に関連する、または局在化(例えば、分泌配列、核局在化配列など)もしくは体液性が細胞性のいずれかの免疫原性であることに相互に関連する配列を指す。モチーフは、近接する、または一般的にある特定の機能もしくは性質に相互に関連している特定の位置に整列することができるか、のいずれかでありうる。HLAモチーフ関連において、「モチーフ」は、限定された長さのペプチドにおける残基のパターンを指し、通常、クラスI HLAモチーフについて約8個から約13個までのアミノ酸およびクラスII HLAモチーフについて約6個から約25個までのアミノ酸のペプチドであり、特定のHLA分子により認識される。HLA結合についてのペプチドモチーフは、各ヒトHLA対立遺伝子によりコードされる各タンパク質に対して典型的に異なり、第一および第二アンカー残基のパターンに違いがある。

## 【0123】

HLA「第一アンカー残基」は、免疫原性ペプチドとHLA分子との間の接触点を提供すると理解されているペプチド配列に沿った特定の位置でのアミノ酸である。限定された長さのペプチド内の1個~3個、通常2個の第一アンカー残基は、一般的に、免疫原性ペプチドについての「モチーフ」を限定する。これらの残基は、HLA分子のペプチド結合性溝(groove)に密着してはまっているものと理解されており、その結合性溝の特定のポケットに埋まる側鎖を有する。一つの態様において、例えば、HLAクラスI分子についての第一アンカー残基は、本発明に従って、8、9、10、11、または12の残基ペプチドエピトープの2位(アミノ末端位から)およびカルボキシ末端位に位置している。もう一つの態様において、例えば、HLAクラスII分子を結合すると思われるペプチドの第一アンカー残基は、ペプチドの末端へというよりも、お互いの割合で間隔がおかれ、そのペプチドは、一般的に長さが少なくとも9個のアミノ酸からなる。各モチーフおよびスーパーモチーフについての第一アンカーの位置は、表IVに示されている。例えば、類似体ペプチドは、表IVに示される第一および/または第二のアンカー位置における特定の残基の存在または非存在を変化させることにより作製されうる。そのような類似体は、特定のHLAモチーフまたはスーパーモチーフを含むペプチドの結合親和性および/または個体群適用範囲を調節するために使用される。

## 【0124】

HLA「スーパーモチーフ」は、2個またはそれ以上のHLA対立遺伝子によりコードされるHLA分子により共有されるペプチド結合特異性である。

## 【0125】

本明細書で用いられる、HLAまたは細胞性免疫応答「ワクチン」とは、本発明の1つまた

10

20

30

40

50

は複数のペプチドを含むまたはコードする組成物である。1つまたは複数の個々のペプチドのカクテル；ポリエピトープのペプチドにより構成される本発明の1つまたは複数のペプチド；またはそのような個々のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸、例えば、ポリエピトープのペプチドをコードするミニ遺伝子のような、そのようなワクチンの多数の態様がある。「1つまたは複数のペプチド」とは、1~150またはそれ以上からの任意の全単位整数を含みうり、例えば、少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、もしくは150またはそれ以上の本発明のペプチド。ペプチドまたはポリペプチドは、選択的に、脂質化、ターゲティングまたは他の配列の付加によるような、修飾をされうる。本発明のHLAクラスIペプチドは、HLAクラスIIペプチドと混合、または連結され、細胞障害性Tリンパ球およびヘルパーTリンパ球の両方の活性化を促進することができる。HLAワクチンはまた、ペプチドでパルスされた抗原提示細胞、例えば、樹状細胞を含みうる。

#### 【0126】

本明細書で定義される、20P1F12/TMPRSS2変異体、類似体または相同体は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質と「交差反応性」である少なくとも1つのエピトープを有するという顕著な特性をもつ。本文中で使用される「交差反応性」とは、20P1F12/TMPRSS2変異体に特異的に結合する抗体またはT細胞は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質にもまた特異的に結合することを意味する。ペプチドが、20P1F12/TMPRSS2タンパク質に特異的に結合する抗体またはT細胞により認識されることができず、いずれのエピトープももはや含まない場合、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の変異体であることは終わる。タンパク質を認識する抗体は、様々なサイズのエピトープに結合し、かつ近接するまたはしていない、約4個または5個のアミノ酸のオーダーの群が最小限のエピトープにおけるアミノ酸の典型的な数として考えられていることを当業者は理解している。例えば、ナイル(Nair)ら、*J. Immunol.* (2000)、165(12):6949~6955；ヘッベス(Hebbes)ら、*Mol. Immunol.* (1989)、26(9):865~873；シュワルツ(Schwartz)ら、*J. Immunol.* (1985)、135(4):2598~2608を参照。

#### 【0127】

本明細書に開示される本発明の更に別の例示的態様は、20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド配列内に含まれる1つまたは複数の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドを含む。様々なモチーフが当技術分野において知られており、タンパク質は、多数の公的に入手可能なインターネットサイトにより、そのようなモチーフの存在について評価されうる(例えば、URLアドレス：[pfam.wustl.edu/](http://pfam.wustl.edu/)；[searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html](http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html)；[psort.ims.u-tokyo.ac.jp/](http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/)；[www.cbs.dtu.dk/](http://www.cbs.dtu.dk/)；[www.ebi.ac.uk/interpro/scan.thml](http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.thml)；[www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html](http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html)；エピマトリックス(Epimatrix)(商標)およびエピマー(Epimer)(商標)、ブラウン大学(Brown University)、[www.brown.edu/Research/TB-HIV\\_Lab/epimatrix/epimatrix.html](http://www.brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html)；およびBIMAS、[bimas.dcrt.nih.gov/](http://bimas.dcrt.nih.gov/)を参照)。

#### 【0128】

上記で論議されている1つまたは複数の20P1F12/TMPRSS2モチーフを含むポリペプチドは、20P1F12/TMPRSS2制御が特定の癌において変化させられているという観察から考えて、悪性の表現型の固有の特性を解明することにおいて有用である。例えば、カゼインキナーゼII、cAMPおよびcAMP依存性プロテインキナーゼ、ならびにプロテインキナーゼCは、悪性の表現型の発生に関与していることが知られている酵素である(例えば、Chenら、*Lab Invest* 78(2):165~174(1998)；Gaiddonら、*Endocrinology* 136(10):4331~4338(1995)；Hallら、*Nucleic Acids Research* 24(6):1119-1126(1996)；Peterzielら、*Oncogene* 18(46):6322~6329(1999)およびO'Brian、*Oncol. Rep.* 5(2):305~309(1998)を参照)。さらに、グリコシル化およびミリスチル化のどちらもまた癌および癌進行に関与するタンパク質修飾である(例えば、Dennisら、*Biochem. Biophys. Acta* 1473(1):21~34(1999)；Rajuら、*Exp. Cell Res.* 235(1):145~154(1997)を参照)。アミド化も癌および癌進行に関与

するもう一つのタンパク質修飾である(例えば、Trestonら、J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (13):169~175(1992)を参照)。

【0129】

もう一つの態様において、本発明のタンパク質は、技術分野容認の方法に従って同定された1つまたは複数の免疫反応性エピトープを含む。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20P1F12/TMPRSS2タンパク質の範囲内のペプチドを同定するための特定のアルゴリズムを用いて決定される。(エピマトリックス(Epimatix)(商標)およびエピマー(Epimer)(商標)、ブラウン大学(Brown University)、URL [www.brown.edu/Research/TB-HIV\\_Lab/epimatix/epimatix.html](http://www.brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatix/epimatix.html); およびBIMAS、URL [bimas.dcrf.nih.gov/](http://bimas.dcrf.nih.gov/))。また、HLA分子に対する十分な結合親和性を有するペプチドを同定するための方法で、かつ免疫原性エピトープであることにそれが相互に関連しているところのことは、当技術分野においてよく知られており、不適当な実験なしに行われる。さらに、免疫原性エピトープであるペプチドを同定するための方法は、当技術分野においてよく知られており、インビトロまたはインビボでのいずれかで不適当な実験なしに行われる。

【0130】

免疫原性を調節するためにそのようなエピトープの類似体を作製するという原理もまた当技術分野において知られている。例えば、CTLまたはHTLモチーフを有するエピトープで始める。(例えば、表IVのHLAクラスIおよびHLAクラスIIモチーフ/スーパーモチーフを参照)。そのエピトープは、特定された位置の1つのアミノ酸を取り換え出すこと、およびそれをその位置に特定された別のアミノ酸で置き換えることにより類似化する。

【0131】

様々な文献が、対象のタンパク質において、その類似体と同様に、エピトープの同定および作製に関連する技術を表している。例えば、チェスナッツ(Chesnut)ら、国際公開公報第9733602号; セッテ(Sette)、Immunogenetics 1999 50(3-4):201~212; セッテ(Sette)ら、J. Immunol. 2001 166(2):1389~1397; シドニー(Sidney)ら、Hum. Immunol. 1997 58(1):12~20; コンドウ(Kondo)ら、Immunogenetics 1997 45(4):249~258; シドニー(Sidney)ら、J. Immunol. 1996 157(8):3480~3490; およびファルク(Falk)ら、Nature 351:290~296(1991); ハント(Hunt)ら、Science 255:1261~1263(1992); パーカー(Parker)ら、J. Immunol. 149:3580~3587(1992); パーカー(Parker)ら、J. Immunol. 152:163~175(1994); カスト(Kast)ら、1994、152(8):3904~3912; ボラス-クエスタ(Borras-Cuesta)ら、Hum. Immunol. 2000 61(3):266~278; アレキサンダー(Alexander)ら、J. Immunol. 2000 164(3):1625~1633; アレキサンダー(Alexander)ら、PMID: 7895164、UI: 95202582; オーサリバン(O'Sullivan)ら、J. Immunol. 1991 147(8):2663~2669; アレキサンダー(Alexander)ら、Immunity 1994 1(9):751~761およびアレキサンダー(Alexander)ら、Immunol. Res. 1998 18(2):79~92を参照。

【0132】

本発明の関連する態様は、上記参照の方法により決定される異なるモチーフの組み合わせ、および/または上記参照の方法により決定される1つまたは複数の予測されるCTLエピトープ、および/または当技術分野において公知の1つまたは複数のT細胞結合モチーフを含むポリペプチドを含む。好ましい態様は、そのポリペプチドのモチーフと介在配列のどちらにも挿入、欠失または置換を含まない。さらに、これらのモチーフのどちらか側にN末端および/またはC末端アミノ酸残基のいずれかのいくつかを含む態様が、望ましい場合がある(例えば、そのモチーフが位置するポリペプチド構築のより大きな部分を含むために)。典型的には、モチーフのどちらか側のN末端および/またはC末端アミノ酸残基の数は、約1~約100の間のアミノ酸残基、好ましくは、5~約50のアミノ酸残基である。

【0133】

20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質は、多くの形、好ましくは単離された形で現される。精製された20P1F12/TMPRSS2タンパク質分子は、実質的に、抗体、T細胞または他のリガンドへの20P1F12/TMPRSS2の結合を損なう他のタンパク質または分子を含まないものと思われる。単離および精製の性質および程度は、その意図される用途に依存するものと思われ

る。20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質の態様は、精製された20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質および機能性のある、可溶性20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質を含む。一つの態様において、機能性のある、可溶性20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその断片は抗体、T細胞または他のリガンドにより結合される能力を保持している。

【0134】

本発明はまた、20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列の生物学的活性断片を含む20P1F12/TMPRSS2タンパク質を提供する。そのようなタンパク質は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質に関連するエピトープを特異的に結合する抗体の産生を導き出す；そのような抗体により結合される；HTLまたはCTLの活性化を導き出す；および/またはHTLまたはCTLにより認識される能力のような、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の性質を示す。

10

【0135】

特に興味深い構造を含む20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質は、例えば、チョー-ファスマン(Chou-Fasman)、ガルニエル-ロブソン(Garnier-Robson)、キート-ドーリトル(Kyte-Doolittle)、アイゼンバーグ(Eisenberg)、カルプラス-シュルツ(Karplus-Schultz)もしくはジャメソン-ウルフ(Jameson-Wolf)分析、または免疫原性に基づく方法を含む、当技術分野においてよく知られている様々な分析的技術を使用して予測および/または同定される。そのような構造を含む断片は、サブユニット特異性抗-20P1F12/TMPRSS2抗体もしくはT細胞を産生することにおいて、または20P1F12/TMPRSS2に結合する細胞因子を同定することにおいて、特に有用である。

20

【0136】

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20P1F12/TMPRSS2タンパク質の範囲内のペプチドを同定するための特定のアルゴリズムを用いて決定される(例えば、ワールドワイドウェブ(World Wide Web) URL [syfpeithi.bmi-heidelberg.com/](http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/)でのSYFPEITHI；エピマトリックス(Epimatrix)(商標)およびエピマー(Epimer)(商標)、ブラウン大学(Brown University)、URL ([www.brown.edu/Research/TB-HIV\\_Lab/epimatrix/epimatrix.html](http://www.brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html))；およびBIMAS、URL [bimas.dcrf.nih.gov/](http://bimas.dcrf.nih.gov/)を使用することにより)。これを図示して、ヒトMHCクラスI分子HLA-A1、A2、A3、A11、A24、B7およびB35の関係において提示される20P1F12/TMPRSS2からのペプチドエピトープを予測することができる。特に、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の完全アミノ酸配列は、上記に列挙されるバイオインフォマティクスとモレキュラーアナリシスセクション(Bioinformatics and Molecular Analysis Section)(BIMAS)のウェブサイトにあるHLAペプチドモチーフサーチ(HLA Peptide Motif Search)アルゴリズムへ入力される。HLAペプチドモチーフサーチアルゴリズムは、HLAクラスI分子、特にHLA-A2の溝においての特異的ペプチド配列の結合に基づきケンパーカー(Ken Parker)博士により開発された(例えば、Falkら、Nature 351:290~296(1991)；Huntら、Science 255:1261~1263(1992)；Parkerら、J. Immunol. 149:3580~3587(1992)；Parkerら、J. Immunol. 152:163~175(1994)を参照)。このアルゴリズムは、多数の他のHLAクラスI分子と同様に、予想されるHLA-A2への結合について、完全なタンパク質配列からの8-mer、9-mer、10-merまたは11-merペプチドの位置および順位を割り当てる。多くのHLAクラスI結合ペプチドは、8-mer、9-mer、10-merまたは11-merである。例えば、クラスI HLA-A2について、エピトープは、好ましくは、2位にロイシン(L)またはメチオニン(M)、およびC末端にバリン(V)またはロイシン(L)を含む(例えば、Parkerら、J. Immunol. 149:3580~3587(1992)を参照)。20P1F12/TMPRSS2予想される結合ペプチドの結果は、推定結合スコアにより分類される。結合スコアは、37、pH 6.5でのそのペプチドを含む複合体の解離の推定半減期に対応する。高結合スコアをもつペプチドは、最も長い時間、細胞表面のHLAクラスIへ最も密接に結合されることが予想され、このようにして、T細胞認識のための最高の免疫原性標的を表す。

30

40

【0137】

HLA対立遺伝子へのペプチドの実際の結合は、抗原処理欠損細胞株T2におけるHLA発現の安定化により評価される(例えば、Xueら、Prostate 30:73~78(1997)およびPeshwaら、Prostate 36:129~138(1998)を参照)。特定のペプチドの免疫原性は、インビトロで、樹

50

状細胞のような抗原提示細胞の存在下で、CD8+細胞障害性Tリンパ球(CTL)の刺激により評価されうる。

【0138】

BIMASサイト、エピマー(Epimer)(商標)およびエピマトリックス(Epimatrix)(商標)のサイトにより予測される、または当技術分野もしくは、ワールドワイドウェブ(World Wide Web)サイト URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/のような当技術分野の一部となるところにおいて、入手可能なHLAクラスIもしくはクラスIIモチーフにより特定される各エピトープは、20P1F12/TMPRSS2タンパク質に「適用される」ことができることは、真価を認められるべきである。このような関係において用いられる場合、「適用される」とは、当関連業者により真価を認められるように、20P1F12/TMPRSS2タンパク質が、例えば、視覚的にまたはコンピューターに基づくパターン発見方法により評価されることを意味する。HLAクラスIモチーフを有する8個、9個、10個または11個のアミノ酸残基の20P1F12/TMPRSS2の各部分配列、またはHLAクラスIIモチーフを有する9個またはそれ以上のアミノ酸残基の部分配列は、本発明の範囲内である。

10

【0139】

T細胞が抗原を認識する機構は、明確に示された。本発明の効力のあるペプチドエピトープワクチン組成物は、世界中の個体群の非常に広い区域において、治療的または予防的免疫応答を誘導する。細胞性免疫応答を誘導する本発明の組成物の価値および効力を理解するために、免疫学的関連技術の簡単な概説を提供する。

【0140】

HLA分子およびペプチド性抗原の複合体は、HLA制限性T細胞により認識されるリガンドとして作用する(Buus, Sら、Cell 47:1071, 1986; Babbitt, B. P. ら、Nature 317:359, 1985; Townsend, A. およびBodmer, H., Annu. Rev. Immunol. 7:601, 1989; Germain, R. N., Annu. Rev. Immunol. 11:403, 1993)。1個のアミノ酸が置換された抗原類似体の研究および内因的に結合され、自然にプロセッシングされるペプチドのシーケンシングにより、HLA抗原分子への特異的結合に必要とされるモチーフに対応する重要な残基が同定され、表IVに示されている(例えば、Southwoodら、J. Immunol. 160:3363, 1998; Rammenseeら、Immunogenetics 41:178, 1995; Rammenseeら、SYFPEITHI、ワールドワイドウェブ(World Wide Web)サイトによる URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/でアクセス; Sette, A. およびSidney, J. Curr. Opin. Immunol. 10:478, 1998; Engelhard, V. H., Curr. Opin. Immunol. 6:13, 1994; Sette, A. およびGrey, H. M., Curr. Opin. Immunol. 4:79, 1992; Sinigaglia, F. およびHammer, J. Curr. Biol. 6:52, 1994; Ruppertら、Cell 74:929~937, 1993; Kondoら、J. Immunol. 155:4307~4312, 1995; Sidneyら、J. Immunol. 157:3480~3490, 1996; Sidneyら、Human Immunol. 45:79~93, 1996; Sette, A. およびSidney, J. Immunogenetics 1999年11月; 50(3-4):201~212、概説)。

20

30

【0141】

さらにまた、HLA-ペプチド複合体のX線結晶解析により、対立遺伝子特異的様式におけるペプチドリガンドが有する残基に適応するHLA分子のペプチド結合裂け目/溝内のポケットを明らかにした; これらの残基は、次には、それらが存在するペプチドのHLA結合能力を決定する(例えば、Madden, D. R., Annu. Rev. Immunol. 13:587, 1995; Smithら、Immunity 4:203, 1996; Fremontら、Immunity 8:305, 1998; Sternら、Structure 2:245, 1994; Jones, E. Y., Curr. Opin. Immunol. 9:75, 1997; Brown, J. H.ら、Nature 364:33, 1993; Guo, H. C.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8053, 1993; Guo, H. C.ら、Nature 360:364, 1992; Silver, M. L.ら、Nature 360:367, 1992; Matsumura, M.ら、Science 257:927, 1992; Maddenら、Cell 70:1035, 1992; Fremont, D. H.ら、Science 257:919, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. およびWiley, D. C., J. Mol. Biol. 219:277, 1991を参照)。

40

【0142】

従って、クラスIおよびクラスII対立遺伝子特異的HLA結合モチーフ、またはクラスIもしくはクラスIIスーパーモチーフの決定は、特定のHLA抗原への結合に相互に関連してい

50

るタンパク質内の領域の同定を可能にする。

【0143】

このように、HLAモチーフ同定の過程により、エピトープに基づくワクチンについての候補が同定された；そのような候補は、さらに、結合親和性および/またはエピトープとその対応するHLA分子との結合の時間を測定するHLA-ペプチド結合アッセイ法により評価されうる。追加的確認作業は、個体群適用範囲および/または免疫原性に関して、好ましい特性をもつエピトープをこれらのワクチン候補の中から選択することが行われうる。

【0144】

様々なストラテジーが細胞性免疫原性を評価するために利用されうり、以下のものを含む：

【0145】

1) 正常な個体由来の初代T細胞培養の評価(例えば、Wentworth, P. A.ら、Mol. Immunol. 32:603, 1995; Celis, E.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2105, 1994; Tsai, V.ら、J. Immunol. 158:1796, 1997; Kawashima, Iら、Human Immunol. 59:1, 1998を参照)。この段階は、数週間の期間を通して、インビトロで、抗原提示細胞の存在下、試験ペプチドをもつ正常な被験者由来の末梢血リンパ球(PBL)の刺激を含む。そのペプチドに特異的なT細胞は、この時間の間、活性化になり、例えば、リンホカイン放出アッセイ法、またはペプチド感作標的細胞を含む<sup>51</sup>Cr放出アッセイ法を用いて検出される。

【0146】

2) HLAトランスジェニックマウスの免疫化(例えば、Wentworth, P. A.ら、J. Immunol. 26:97, 1996; Wentworth, P. A.ら、Int. Immunol. 8:651, 1996; Alexander, J.ら、J. Immunol. 159:4753, 1997を参照)。例えば、そのような方法において、不完全フロイント(Freund)のアジュバント中のペプチドをHLAトランスジェニックマウスへ皮下に投与する。免疫化後数週間で、脾細胞を取り除き、約1週間、試験ペプチドの存在下、インビトロで培養する。ペプチド特異的なT細胞は、例えば、ペプチド感作標的細胞および内因的産生抗原を発現する標的細胞を含む<sup>51</sup>Cr放出アッセイ法を用いて検出される。

【0147】

3) 効果的にワクチン接種された免疫個体および/または慢性病患者のいずれかからの復活T細胞応答の実証(例えば、Rehermann, B.ら、J. Exp. Med. 181:1047, 1995; Doolan, D. L.ら、Immunity 7:97, 1997; Bertoni, R.ら、J. Clin. Invest. 100:503, 1997; Threlkeld, S. C.ら、J. Immunol. 159:1648, 1997; Diepolder, H. M.ら、J. Virol. 71:6011, 1997を参照)。従って、復活応答は、疾患による抗原に曝されて、「自然に」免疫応答を起こした被験者由来、または抗原に対してワクチン接種された患者由来のPBLを培養することにより検出される。被験者由来のPBLは、「ナイーブ(naive)」T細胞と比較して、「メモリー」T細胞の活性化がなされるように、試験ペプチドと抗原提示細胞(APC)の存在下で、インビトロで、1~2週間、培養される。培養期間の終わりに、T細胞活性が、ペプチド感作標的細胞を含む<sup>51</sup>Cr放出、T細胞増殖、またはリンホカイン放出を含むアッセイ法を用いて検出される。

【0148】

本発明はさらに、20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質または20P1F12/TMPRSS2関連核酸を含む癌ワクチンを提供する。20P1F12/TMPRSS2の発現から考えて、癌ワクチンは、非標的組織に最小の影響でまたは影響なしで、20P1F12/TMPRSS2発現癌を予防および/または治療する。抗癌治療として、体液性および/または細胞性免疫応答を起こすワクチンでの腫瘍抗原の使用は、当技術分野においてよく知られており、ヒトPSMAおよび齧歯類PAP免疫原を使用して前立腺癌に用いられた(Hodgeら、1995, Int. J. Cancer 63:231~237; Fongら、1997, J. Immunol. 159:3113~3117)。

【0149】

そのような方法は、20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質または20P1F12/TMPRSS2コード核酸分子および20P1F12/TMPRSS2免疫原(典型的には、いくつかの抗体またはT細胞エピトープを含む)を発現かつ提示することができる組換えベクターを使用することにより、容易に

10

20

30

40

50

実施されうる。免疫反応性エピトープの送達のための広く様々なワクチン系が当技術分野において知られていることを当業者は理解している(例えば、Herylnら、Ann Med、1999年2月、31(1):66~78; Maruyamaら、Cancer Immunol Immunother、2000年6月、49(3):123~132を参照)。簡単には、哺乳動物において、免疫応答(例えば、体液性および/または細胞性)を起こすそのような方法は、段階：哺乳動物の免疫系を免疫反応性エピトープ(例えば、20P1F12/TMPRSS2タンパク質またはその類似体もしくは相同体に存在するエピトープ)に曝して、哺乳動物がそのエピトープに特異的な免疫応答を起こすこと(例えば、そのエピトープを特異的に認識する抗体を産生する)を含む。好ましい方法において、20P1F12/TMPRSS2免疫原は、生物学的モチーフ(例えば、表V-XVIIIを参照)、または図14、図15、図16、図17および図18に示される20P1F12/TMPRSS2からのサイズ範囲のペプチドを含む。

10

## 【0150】

全20P1F12/TMPRSS2タンパク質、その免疫原性領域またはエピトープは、様々な手段により組み合わせられ、送達されうる。そのようなワクチン組成物は、例えば、リポペプチド(例えば、Vitiello, A.ら、J. Clin. Invest. 95:341, 1995)、ポリ(DL-ラクチド-コグリコリド)(poly(DL-lactide-co-glycolide)) (「PLG」)微粒子中にカプセル化されたペプチド組成物(例えば、Eldridgeら、Molec. Immunol. 28:287~294, 1991; Alonsoら、Vaccine 12:299~306, 1994; Jonesら、Vaccine 13:675~681, 1995を参照)、免疫刺激複合体(ISCMS)に含まれるペプチド組成物(例えば、Takahashiら、Nature 344:873~875, 1990; Huら、Clin. Exp. Immunol. 113:235~243, 1998)、多抗原ペプチドシステム(MAP)(例えば、Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5409~5413, 1988; Tam, J. P., J. Immunol. Methods 196:17~32, 1996)、多価ペプチドとして製剤されたペプチド; 典型的には結晶化ペプチドで、弾道的送達系での使用のためのペプチド、ウイルス送達ベクター(Perkus, M. E.ら、「ワクチン開発の概念(Concepts in vaccine development)」、Kaufmann, S. H. E.編、p. 379, 1996; Chakrabarti, S.ら、Nature 320:535, 1986; Hu, S. L.ら、Nature 320:537, 1986; Kieny, M. -P.ら、AIDS Bio/Technology 4:790, 1986; Top, F. H.ら、J. Infect. Dis. 124:148, 1971; Chanda, P. K.ら、Virology 175:535, 1990)、ウイルス製もしくは合成製粒子(例えば、Kofler, N.ら、J. Immunol. Methods 192:25, 1996; Eldridge, J. H.ら、Sem. Hematol. 30:16, 1993; Faló, L. D., Jr.ら、Nature Med. 7:649, 1995)、アジュバント(Warren, H. S., Vogel, F. R.およびChedid, L. A., Annu. Rev. Immunol. 4:369, 1986; Gupta, R. K.ら、Vaccine 11:293, 1993)、リポソーム(Reddy, R.ら、J. Immunol. 148:1585, 1992; Rock, K. L., Immunol. Today 17:131, 1996)、または裸のもしくは粒子吸収型cDNA(Ulmer, J. B.ら、Science 259:1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L. A.およびWebster, R. G., Vaccine 11:957, 1993; Shiver, J. W.ら、「ワクチン開発の概念(Concepts in vaccine development)」、Kaufmann, S. H. E.編、p.423, 1996; Cease, K. B.およびBerzofsky, J. A., Annu. Rev. Immunol. 12:923, 1994およびEldridge, J. H.ら、Sem. Hematol. 30:16, 1993)を含むことができる。毒をターゲットさせる送達技術、アバントイミュノテラピューティクス社(Avant Immunotherapeutics, Inc.)(ニーダム、マサチューセッツ)のような受容体媒介型ターゲティングとしても知られているが、これもまた使用されうる。

20

30

40

## 【0151】

20P1F12/TMPRSS2関連癌である患者において、本発明のワクチン組成物はまた、IL-2、IL-12、GM-CSFなどのような免疫アジュバントとの組み合わせでの使用を含む、癌のために用いられる他の治療、例えば、手術、化学療法、薬物治療、放射線治療などと共に使用されうる。

## 【0152】

細胞性ワクチン：CTLエピトープは、対応するHLA対立遺伝子に結合する20P1F12/TMPRSS2タンパク質の範囲内のペプチドを同定するための特定のアルゴリズムを用いて決定される(例えば、表IV; ; エピマー(Epimer)(商標)およびエピマトリックス(Epimatric)(商標)、ブラウン大学(Brown University)(URL [www.brown.edu/Research/TB-HIV\\_Lab/epimat](http://www.brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimat)

50

rix/epimatrix.html) ; およびBIMAS、(URL bimas.dcr.t.nih.gov/ ; URL syfpeithi.bmi-helidelverg.com/でのSYFPEITHI)を参照)。好ましい態様において、20P1F12/TMPRSS2免疫原は、当技術分野においてよく知られている技術を用いて同定される1つまたは複数のアミノ酸配列、例えば、HLAクラスIモチーフ/スーパーモチーフ(例えば、表IV(A)、表IV(D)、または表IV(E))により特定される8個、9個、10個、もしくは11個のアミノ酸のペプチドおよび/またはHLAクラスIIモチーフ/スーパーモチーフ(例えば、表IV(B)または表IV(C))を含む少なくとも9個のアミノ酸のペプチドを含む。当技術分野において認められていることだが、HLAクラスI結合溝は、特定のサイズ範囲のみのペプチドがその溝へはまり込みかつ結合されうるように、本質的に閉じて終わっており、一般的に、HLAクラスIエピトープは、8個、9個、10個または11個のアミノ酸長である。対照的に、HLAクラスII結合溝は本質的に開いて終わっている ; それゆえ、約9個またはそれ以上のアミノ酸のペプチドがHLAクラスII分子により結合されう。HLAクラスIとクラスIIとの結合溝の違いのため、HLAクラスIモチーフは長さ特異的である ; すなわち、クラスIモチーフの2位が、そのペプチドのアミノからカルボキシ方向における2番目のアミノ酸である。クラスIIモチーフにおけるアミノ酸の位置は、お互いのみ関係して、ペプチド全体に関係しない、すなわち、付加的アミノ酸をモチーフ所有配列のアミノ末端および/またはカルボキシ末端に付着することができる。HLAクラスIIエピトープは、しばしば、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個もしくは25個のアミノ酸長、または25個のアミノ酸より長い。

10

20

30

40

50

#### 【0153】

抗体に基づくワクチン : 哺乳動物において免疫応答を起こすための広く様々な方法は、当技術分野において知られている(例えば、第一段階として、ハイブリドーマの作製において)。哺乳動物において免疫応答を起こすための方法は、その哺乳動物の免疫系をタンパク質(例えば、20P1F12/TMPRSS2タンパク質)の免疫原性エピトープに曝し、免疫応答が起こされることを含む。典型的態様は、宿主を、20P1F12/TMPRSS2 B細胞もしくは細胞障害性T細胞エピトープまたはその類似体の少なくとも1つの十分な量に接触させる ; およびその後は少なくとも1回の定期的間隔で、その宿主を20P1F12/TMPRSS2 B細胞もしくは細胞障害性T細胞エピトープまたはその類似体に再接触させることにより、宿主に20P1F12/TMPRSS2への免疫応答を起こすための方法からなる。特定の態様は、20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質または人工の多エピトープのペプチドに対して免疫応答を起こすための方法からなり、以下のことを含む : ヒトまたは別の哺乳動物へのワクチン調製における20P1F12/TMPRSS2免疫原(例えば、20P1F12/TMPRSS2タンパク質もしくはそのペプチド断片、20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質または類似体など)を投与する。典型的には、そのようなワクチン調製は、さらに、適するアジュバント(例えば、米国特許第6,146,635号を参照)またはPADRE(商標)ペプチド(エピムネ社(Epimmune Inc.)、サンジエゴ、CA ; 例えば、Alexanderら、J. Immunol. 2000 164(3):1625~1633; Alexanderら、Immunity 1994 1(9):751~761およびAlexanderら、Immunol. Res. 1998 18(2):79~92を参照)のような普遍的なヘルパーエピトープを含む。別の方法は、以下のことにより、20P1F12/TMPRSS2免疫原に対して個体に免疫応答を起こすことを含む : 20P1F12/TMPRSS2免疫原をコードするDNA配列を含み、そのDNA配列がそのDNA配列の発現を制御する制御配列に利用可能に連結されているDNA分子を、個体の身体の筋肉または皮膚へ、インビボで投与する ; そのDNA分子は細胞に取り上げられ、そのDNA配列がその細胞で発現され、その免疫原に対して免疫応答が起こされる(例えば、米国特許第5,962,428号を参照)。選択的には、陰イオン性脂質 ; サポニン ; レクチン ; エストロゲン化合物 ; ヒドロキシル化低級アルキル ; ジメチルスルホキシド ; および尿素のような遺伝子ワクチン促進剤もまた投与される。

#### 【0154】

核酸ワクチン : 本発明のワクチン組成物は、核酸媒介型様式を含む。本発明のタンパク質をコードするDNAまたはRNAは、患者に投与されう。遺伝子免疫化方法は、20P1F12/TMPRSS2を発現する癌細胞に対して向けられる予防的または治療的な体液性および細胞性免疫応答を起こすために使用されう。20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質/免疫原をコードす

るDNAおよび適切な制御配列を含む構築物は、個体の筋肉または皮膚へ直接的に注射されうり、筋肉または皮膚の細胞がその構築物を取り上げて、そのコードされる20P1F12/TMPRSS2タンパク質/免疫原を発現する。または、ワクチンは、20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質を含む。20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質免疫原の発現が、結果として、20P1F12/TMPRSS2タンパク質を有する細胞に対して予防的または治療的な体液性および細胞性免疫の発生を生じる。当技術分野において公知の様々な予防的または治療的な遺伝子免疫化技術を使用されうる(概説として、インターネットアドレスwww.genweb.comで公開される情報および文献を参照)。核酸に基づく送達は、例えば、米国特許第5,580,859号;5,589,466号;5,804,566号;5,739,118号;5,736,524号;5,679,647号;国際公開公報第98/04720号と同様に、ウォルフ(Wolff)ら、Science 247:1465(1990)に記載されている。DNAに基づく送達技術の例には、「裸のDNA(naked DNA)」、促進性(プピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介型)送達、陽イオン性脂質複合体、および粒子媒介型(「遺伝子銃」)または圧力媒介型送達を含む(例えば、米国特許第5,922,687号を参照)。

10

**【0155】**

治療的または予防的な免疫化の目的のために、本発明のタンパク質は、ウイルスまたは細菌のベクターにより発現されうる。本発明の実施において用いられうる様々なウイルスの遺伝子送達系は、限定されるものではないが、ワクシニア、ニワトリボックス、カナリアボックス、アデノウイルス、インフルエンザ、ポリオウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス、およびシンドビスウイルスを含む(Restifo、1996、Curr. Opin. Immunol. 8:658~663; Tsangら、J. Natl. Cancer Inst. 87:982~990(1995)を参照)。非ウイルスの送達系もまた、抗腫瘍応答を引き起こすために、20P1F12/TMPRSS2関連タンパク質をコードする裸のDNAを患者へ導入する(例えば、筋肉内または皮内に)ことにより用いられうる。

20

**【0156】**

例えば、ワクシニアウイルスが、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するためのベクターとして使用される。宿主への導入と同時に、その組換えワクシニアウイルスは、そのタンパク質免疫原性ペプチドを発現し、それにより宿主免疫応答を誘発する。免疫化プロトコールに有用なワクシニアウイルスおよび方法は、例えば、米国特許第4,722,848号に記載されている。もう一つのベクターは、BCG(Bacille Calmette Guerin)である。BCGベクターは、ストーパー(Stover)ら、Nature 351:456~460(1991)に記載されている。本発明のペプチドの治療的投与または免疫化に有用な広く様々な他のベクター、例えば、アデノおよびアデノ関連ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、サルモネラチフィ(Salmonella typhi)ベクター、解毒化炭疽毒素ベクターなどは、本明細書の記述から、当業者にとって明らかであると思われる。

30

**【0157】**

このように、遺伝子送達系は、20P1F12/TMPRSS2関連核酸分子を送達するために用いられる。一つの態様において、完全長ヒト20P1F12/TMPRSS2 cDNAが使用される。もう一つの態様において、特定の細胞障害性Tリンパ球(CTL)および/または抗体エピトープをコードする20P1F12/TMPRSS2核酸分子が使用される。

**【0158】**

エキスピボのワクチン：様々なエキスピボのストラテジーもまた、免疫応答を起こすために用いられうる。一つの方法は、20P1F12/TMPRSS2抗原を患者の免疫系に提示するために樹状細胞(DC)のような抗原提示細胞(APC)の使用を含む。樹状細胞は、MHCクラスIおよびクラスII分子、B7補助刺激物質、ならびにIL-12を発現し、このように高度に分化された抗原提示細胞である。前立腺癌において、前立腺特異的膜抗原(PSMA)のペプチドでパルスされる自己樹状細胞は、前立腺癌患者の免疫系を刺激するために、フェーズI臨床試験において使用される(Tjoaら、1996、Prostate 28:65~69; Murphyら、1996、Prostate 29:371~380)。このように、樹状細胞は、MHCクラスIまたはクラスII分子の関係において、20P1F12/TMPRSS2ペプチドをT細胞へ提示するために使用されうる。一つの態様において、自己樹状細胞は、MHCクラスIおよび/またはクラスII分子に結合することができる20P1F12

40

50

/TMPRSS2ペプチドでパルスされる。もう一つの態様において、樹状細胞は、完全20P1F12/TMPRSS2タンパク質でパルスされる。さらにもう一つの態様は、アデノウイルス(Arthurら、1997, *Cancer Gene Ther.* 4:17~25)、レトロウイルス(Hendersonら、1996, *Cancer Res.* 56:3763~3770)、レンチウイルス、アデノ関連ウイルス、DNAトランスフェクション(Ribasら、1997, *Cancer Res.* 57:2865~2869)、または腫瘍由来RNAトランスフェクション(Ashleyら、1997, *J. Exp. Med.* 186:1177~1182)のような、当技術分野において公知の様々な実行ベクターを使用して、樹状細胞において20P1F12/TMPRSS2遺伝子の過剰発現を操作することを含む。20P1F12/TMPRSS2を発現する細胞はまた、GM-CSFのような免疫モジュレーターを発現するように操作されうり、かつ免疫化剤として使用されうる。

【0159】

抗原性の特性は、エキソパシー(ExPasy)分子生物学サーバー上のプロットスケール(Protscale)ウェブサイト(URL [www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl](http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl))を用いて決定されうる。親水性(Hopp T. P., Woods K. R., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3824~3828)、水治療性(Hydrophobicity)(Kyte J., Doolittle R. F., 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105~132); 接近しやすい残基の割合(Janin J., 1979, *Nature* 277:491~492)、平均柔軟性(Flexibility)(Bhaskaran R.およびPonnuswamy P. K., 1988, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32:242~255); ターン(Beta-turn)(Deleage, G., Roux B., 1987, *Protein Engineering* 1:289~294); および選択的に、プロットスケールウェブサイト上のような当技術分野において入手可能な他の方法が、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の抗原性領域を同定するために用いられうる。分析のためのプロットスケールパラメーターの無制限の例: 1) 9のウィンドウサイズ; 2)ウィンドウ中心と比較してウィンドウ端の100%重量; および3) 0と1の間に位置するように標準化されたアミノ酸プロフィール値である。

【0160】

これらの方法により決定される領域は、タンパク質上で露出される可能性がより高く、このため抗体によるような免疫認識に近づきやすい。このように示される20P1F12/TMPRSS2タンパク質の抗原性配列は、治療的および診断的抗20P1F12/TMPRSS2抗体を産生するために、免疫原、ペプチドまたはそれらをコードする核酸のいずれかを調製するために使用される。免疫原は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質からの、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個もしくは50個以上の近接するアミノ酸のいずれか、またはそれらをコードする対応する核酸でありうる。

【0161】

#### 20P1F12/TMPRSS2による浸潤の調節

上記で言及されているように、PSAおよび20P1F12/TMPRSS2は、いくつかの関連する特徴を共有しており、この発見は、これら2つの分子がインビボで同様の生理的役割をもっている可能性があることの証拠を提供する。この事において、PSAの生物学上の観察により、20P1F12/TMPRSS2の生物学への洞察が提供されうる。興味深いことに、PSAの血清レベルの測定が前立腺癌のためのスクリーニング手段として広く用いられている一方で、IGFBP-3プロテアーゼとしての可能性のある役割を示すデータを除外しており(Cohenら、*J. Endocrinol.* 142:407~415(1994))、驚くべきことに、癌におけるPSAのその役割についてほとんど知られていない。

【0162】

最近、内皮細胞の増殖、遊走および浸潤におけるPSAの効果を体系的に評価した研究より、PSAがインビボで抗浸潤性/抗血管形成の性質をもっていることが見出された(Fortierら、*J. Nat. Cancer Inst.* 91(19):1635~1640(1999))。これらの発見は、抗血管形成薬剤サリドマイドおよびTNP470が、インビトロで、前立腺細胞株により産生されるPSAに統計的に有意な増加を引き起こすこと(Hortiら、*Br. J. Cancer* 79:1588~1593(1999))、および乳癌でかつ高レベルのPSAをもつ患者は、癌がより低いPSAレベルをもつ患者より予後が良かったこと(Yuら、*Clin. Cancer Research*, 4:1489~1497(1998))を示した、より初期の研究と一致する。フォルティア(Fortier)らに記載されるPSAの抗腫瘍効果は、セリン

10

20

30

40

50

プロテアーゼとしてのその作用から生じている可能性があり、というのは、ACTがインビトロで、その酵素活性およびその抗血管形成活性の両方を妨害したからである。さらに、これらの発見は、PSAがLys-プラスミノーゲンを生物学的活性のあるアンジオスタチン様断片へ変換することができること、およびこれらの断片が、アンジオスタチンと同じ効力で、ヒト臍静脈内皮細胞の増殖および尿細管の形成を阻害したことの観察より支持される(Heidtmannら、Br. J. Cancer 81(8):1269~1273(1999))。全体として、これらのデータは、様々な悪性におけるPSAの上昇は、癌進行と戦うための正常な恒常性の過程の一部であること、および内因性濃度を増強するための薬剤としてのPSAの投与により、癌治療において合理的な治療的方法が提供されえたことの証拠を提供している。さらには、PSAについてのこれらの研究と同様に、図35および図36に示される、ならびに下記の実施例で提出される20P1F12/TMPRSS2データは、20P1F12/TMPRSS2もまたそのような抗浸潤活性を示すことを実証する。図35はTMPRSS2による管形成の阻害を示す。HUVEC細胞をマトリゲル(matrigel)に播種し、10%FBS、1 μg/ml 精製された組換えGST-20P1F12/TMPRSS2(アミノ酸255位~492位)、0.3 μg/ml 精製されたPSAまたは1 μg/ml 精製されたGSTタンパク質の存在下で、インキュベートする。組換えVEGFでの処理は、管形成についての対照として使用された。精製GST-20P1F12/TMPRSS2での処理は、FBSにより誘導される管形成を阻害した。同様の阻害は、公知の血管形成誘導の阻害剤であるPSAについても観察された(J. Natl. Cancer Inst., 1999, 91:1635)。図36は、TMPRSS2によるHUVEC増殖の阻害を示す。HUVEC細胞を10%FBS、10 μg/ml 組換えGST-20P1F12/TMPRSS2(アミノ酸255位~492位)または精製PSAの存在または非存在下において、96ウェルプレートに播種した。細胞を72時間増殖し、読み出しとしてアラマブルー(Alamar Blue)の還元を用いて増殖についてアッセイした。実験は3連で行なわれた。精製GST-20P1F12/TMPRSS2での処理は、FBSの低および高投与量によるHUVECの増殖を阻害した。同様の阻害はPSAについても観察された。

10

20

30

40

50

#### 【0163】

癌において、腫瘍の増殖は、新しい血管の血管形成的増殖に依存している。血管形成誘導は、内皮細胞の増殖、遊走および浸潤を制御する血管形成の刺激剤と阻害剤との動力学的相互作用により調節される、しっかりと統制されたプロセスである。この概念は、線維芽細胞増殖因子(FGF)および血管内皮増殖因子(VEGF)のような血管形成誘導の内因性刺激剤のより初期の発見、およびさらに最近の、アンジオスタチン(Angiostatin)(登録商標)およびエンドスタチン(Endostatin)(商標)のタンパク質を含む、血管形成誘導の内因性阻害剤の発見により強化される(O'Reillyら、Cell 79:315~328(1994); O'Reillyら、Cell 88:277~285(1997); Sim, Angiogenesis 2:37~48(1998))。予備的な結果より、抗血管形成のエンドスタチン(商標)タンパク質の濃度の増加が、血管形成誘導が起こっていることを示唆しうる増殖する腫瘍をもつ動物および患者において生じる可能性があることが示されている(Paciottiら、Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 40:66(1999))。PSAについての観察と同様に、これらの発見は、増加する20P1F12/TMPRSS2濃度は、悪い知らせおよび癌進行の前兆ではありえず、むしろ身体がその自分の抗血管形成のタンパク質を産生することによりがんと戦おうとしていることを示している可能性があることの証拠を提供する、実施例13に開示される研究を推進した。

#### 【0164】

図27~図30に示されるように、PSAのように、20P1F12/TMPRSS2は、腫瘍の増殖および浸潤を調節することができるプロテアーゼである。図27A~図27Cは、20P1F12/TMPRSS2で安定的にトランスフェクションされたPC3細胞と比較してのPC3細胞の浸潤性の潜在能力における違いを示す。図27A~図27Cのデータは、20P1F12/TMPRSS2を発現する細胞が浸潤性能力の低下したことを示し、20P1F12/TMPRSS2発現がインビボで腫瘍の浸潤を阻害することの証拠を提供している。さらに、これらの図は、ウロキナーゼ-プラスミノーゲンアクチベーターとの比較データを提供している(例えば、Rabbaniら、In Vivo, 1998年1月-2月, 12(1):135~142; Evansら、Cancer Res. 1997年8月15日, 57(16):3594~3599およびWilsonら、Anat Rec., 1997年9月, 249(1):63~73を参照)。図28は、20P1F12/TMPRSS2のタンパク分解活性を示す。特に、図28は20P1F12/TMPRSS2断片(GST-20P1F12/TMPRSS2(アミノ酸25

5位～492位))のカゼインを分解する能力を示す。図29は、精製20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼ断片のPC3浸潤への効果を示す。図29のデータは、20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼ断片がいかに、マトリゲル(Matrigel)(商標)基底膜マトリックスを通してのPC3細胞の浸潤を低下させるかを実証し、20P1F12/TMPRSS2のプロテアーゼドメインが、インビボで、腫瘍の浸潤を阻害することができるという証拠を提供している。図30は、いかに、精製20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼ断片のPC3浸潤への効果が抗20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体1F9により調節されるかを示している。図30のデータは、いかに、抗20P1F12/TMPRSS2抗体が20P1F12/TMPRSS2の浸潤阻害活性を抑制することができるかを実証し、この分子が、インビボの経過と関連することが知られているインビトロのモデルにおいて腫瘍の浸潤を阻害することができるという確証的証拠を提供している。

10

#### 【0165】

図27～図30に提供されるデータは、20P1F12/TMPRSS2はプロテアーゼであること、およびこのプロテアーゼは細胞外マトリックスを通してのPC3細胞の浸潤を低下させること、およびそのプロテアーゼドメインへの抗体は腫瘍浸潤を促進することを示す。このように、このデータは、20P1F12/TMPRSS2が転移性形成と同様に原発腫瘍の増殖の調節に参与するプロテアーゼであることの証拠を提供している。特別な科学的理論に結びつけられることなく、本明細書に提示されるデータは、20P1F12/TMPRSS2が、腫瘍増殖、浸潤もしくは血管形成誘導に参与する因子のタンパク分解を引き起こすことができる、または腫瘍もしくはその環境(例えば、内皮細胞)に直接的に作用することができるという証拠を提供している。

20

#### 【0166】

本明細書に提示されるデータは、PSAのように、20P1F12/TMPRSS2が、腫瘍増殖および浸潤のモジュレーターと同様に、前立腺癌のような癌の指標として両方の役割を果たすことができるという証拠を提供する。さらには、浸潤は転移性形成における初期段階の一つであるが、このデータはさらに、20P1F12/TMPRSS2が血管形成誘導に影響を及ぼすことができるという証拠を提供する。従って、20P1F12/TMPRSS2を利用する方法は、腫瘍増殖および浸潤を阻害するために用いられうる。この事において、20P1F12/TMPRSS2の生理的効果は、その状態、例えば、それが遊離しているか、または例えば図24に示される免疫反応性複合体に見られるような1つまたは複数のその結合パートナーと複合化されているかどうか依存しうる。

30

#### 【0167】

細胞の浸潤および/または血管形成の活性を調節する分子の活性を用いることおよび評価することのための様々な方法は、当技術分野においてよく知られている。例えば、米国特許第6,060,449号は、活性成分として組織因子経路阻害剤(Tissue Factor Pathway Inhibitor)(TFPI)を含む、血管内皮細胞の増殖により引き起こされる血管形成誘導の阻害剤を開示する。米国特許第6,057,122号は、哺乳動物のクリングル(kringel)5断片およびクリングル5融合タンパク質が血管形成疾患を治療するための化合物として明らかにされることを開示している。米国特許第6,025,331号は、異常血管形成誘導を伴う疾患または障害の治療のための、治療的有効量のトロポニンC、IもしくはT、サブユニット、断片、または類似体を含む薬学的組成物を開示している。米国特許第6,024,688号は、プラスミノーゲン由来の内皮細胞増殖阻害剤の断片、特にアンジオスタチン断片を使用するための方法を開示している。さらに、米国特許第5,981,484号は、血管形成誘導を阻害し、かつ血管形成誘導が役割を果たしている癌、関節炎、黄斑変性症および糖尿病性網膜症のような疾患状態の治療において有用である様々なペプチドを開示している。米国特許第6,060,449号、6,057,122号、6,025,331号、6,024,688号および5,981,484号の開示は、本明細書に参照として組み入れられている。

40

#### 【0168】

本発明の20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドは、さらに、腫瘍転移または炎症反応における浸潤、血管形成誘導に阻害的效果を生じることとして特徴付けられうる。20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドは、特に、腫瘍を有する哺乳動物宿主、好ましくはヒトにおいて、浸潤を

50

阻害するために有用である。用語「浸潤」は、当技術分野が容認する意味に従って、腫瘍細胞のような細胞が細胞外マトリックスまたは基底膜を通して移動する生理学的過程として用いられる。浸潤は、腫瘍細胞が転移の間それを通して散在するところの細胞外マトリックスを模倣するために特別に設計された再構成の基底膜を使用するインビトロでのアッセイ法と同様に、SCIDマウスを使用するインビボでの横隔膜浸潤アッセイ法のような様々な特定の状況において観察される(例えば、Stearnsら、Cancer Res. 1992, 52(13):3776~3781およびKnoxら、Prostate 1998, 35(4):248~254を参照)。さらに、浸潤は、実施例13に記載されるトランスウェルインサートシステム(Transwell Insert Sytem)(ベクトンディッキンソン(Becton Dickinson))を使用するような当技術分野において公知の様々な方法により定量されうる。

10

**【0169】**

前述の抗浸潤および/または抗血管形成の組成物および治療方法は、望まない細胞の浸潤、遊走誘導性増殖、血管形成誘導または転移に関連する疾患または状態を有する対象において、細胞の遊走および浸潤または遊走誘導性細胞増殖を阻害するために有用である。そのような疾患または状態は、初期増殖もしくは固形癌または白血病およびリンパ種、腫瘍転移の転移、浸潤および/もしくは増殖、アテローム性動脈硬化症、心筋血管形成誘導、バルーン血管形成術後血管狭窄、血管外傷後新内膜形成、血管移植再狭窄、冠動脈側枝形成、深部静脈血栓、虚血性肢血管形成誘導、末梢血管拡張、化膿性肉芽腫、角膜疾患、ルベオシス、新生血管性緑内障、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後繊維増殖症、糖尿病性新血管新生、黄斑変性症、子宮内膜症、関節炎、乾癬強皮症を含む慢性的炎症関連線維症、肺線維症、化学療法誘導性線維症、瘢痕および線維症を伴う創傷治癒；消化性潰瘍、骨折、ケロイド、ならびに血管形成、造血、排卵、月経、妊娠および胎盤形成の障害、または浸潤もしくは血管形成誘導が病原性である任意の他の疾患もしくは状態を含むうる。

20

**【0170】**

従って、本発明のこの特定の局面は、対象において、主として腫瘍細胞による細胞浸潤、または第一に腫瘍細胞により引き起こされる血管形成誘導を阻害するための方法を含む。細胞による浸潤または血管形成誘導を阻害することにより、その方法は、結果として、腫瘍転移の阻害を生じる。この方法において、脊椎動物の対象、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを典型的に含む20P1F12/TMPRSS2分子またはその生物学的活性のある断片のある量を投与する。20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドは、好ましくは、上記のような薬学的組成物の形で投与される。

30

**【0171】**

20P1F12/TMPRSS2分子の投与量は、好ましくは、20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの有効量を含む薬学的投与量単位を含む。有効量とは、結果として、原発もしくは転移性腫瘍の浸潤および/もしくは増殖、炎症反応性の容認された任意の指標を含みうる疾患の関連する任意のパラメーターにおいて測定可能な低下、または疾患のない間隔もしくは生存の測定可能な延長を生じる、インビボでの定常状態濃度を達成するために十分な量を意味する。例えば、20%の患者における腫瘍増殖の低下は、効力があるものとみなされる(Frei II, E., Cancer Journal 3:127~136(1997))。しかしながら、この大きさの効果が、本発明に従って効果的であるための投与量にとって最小限の必要条件とはみなされない。効果的投与量および最適の投与量の範囲は、本明細書に記載されるものを含め当技術分野において公知の方法を用いて決定されうる。

40

**【0172】**

または、当技術分野において公知の広く様々な遺伝子導入および遺伝子治療は、治療的ポリヌクレオチド分子を細胞へ送達するために有用でありうる(例えば、配列番号：2に示されるアミノ酸配列をコードする20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドまたはその抗増殖性断片)。多数の遺伝子治療方法が当技術分野において知られており、例えば、米国特許第5,830,880号、6,071,890号および5,792,453号に記載される。そのようなよく知られた

50

方法を用いて、そのような20P1F12/TMPRSS2分子をコードする組換えベクターは、標的細胞(例えば、腫瘍および内皮細胞)送達されうり、その後、細胞増殖、浸潤および/または転移を調節する手段として20P1F12/TMPRSS2を発現するであろう。

【0173】

細胞増殖、浸潤および/または転移を調節するために20P1F12/TMPRSS2を使用するいくつかの代表的な方法が、本明細書に提供されている。これらの方法において、20P1F12/TMPRSS2分子は、典型的には配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、またはその生物学的活性のある断片である。本発明の典型的な態様は、インビボで抗浸潤性活性を有する20P1F12/TMPRSS2分子の細胞浸潤阻害量を哺乳動物へ投与することを含む、哺乳動物において細胞浸潤を阻害することの方法を含む。本発明のもう一つの関連する態様は、抗浸潤性活性を有する20P1F12/TMPRSS2分子の浸潤性阻害量を哺乳動物へ投与することを含む、哺乳動物において細胞浸潤および/または血管形成誘導を阻害することの方法からなり、該断片は、配列番号：2に示される配列のアミノ酸の置換および/または欠失、および/または付加を含むが、抗浸潤性活性を保持している(例えば、配列番号：2に示される配列のアミノ酸255位～492位を含むGST断片)。

10

【0174】

本発明の典型的な態様は、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその抗浸潤性断片を細胞の環境へ導入し、それにより浸潤が阻害されることを含む、腫瘍細胞による浸潤を阻害するための方法からなる。細胞の環境へ導入することとは、ポリペプチドを細胞の環境へ配置して、それがその細胞の生理学的プロセスに、直接的にまたは間接的にかのいずれかで効果をもたらすことができることを意味する。ポリペプチドのような治療を細胞の環境へ導入するための様々な方法は、当技術分野においてよく知られており、典型的な方法には静脈内または部位特異的注射を含む。

20

【0175】

典型的には、20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの抗浸潤性断片は、例えば図23に示される32 kDのプロテアーゼ断片のプロテアーゼドメインを含む。そのような断片のもう一つの例示的態様は、配列番号：2に示される配列のアミノ酸255位～492位を含むポリペプチドであり、実施例13に示される抗浸潤性アッセイ法において利用される。この方法の好ましい態様は、ポリペプチドが細胞の環境へ非経口的に導入される。典型的な態様において、ポリペプチドは、細胞の環境へ静脈内注射により導入される。

30

【0176】

本発明の一つの具体的な態様は、配列番号：2のポリペプチドを細胞の環境へ導入して、それにより基底膜浸潤が阻害されることを含む、腫瘍細胞による基底膜浸潤を阻害するための方法からなる。好ましくは、この方法における腫瘍細胞は、20P1F12/TMPRSS2の発現または分泌の増加を示す。本発明の関連する特定の態様は、配列番号：2のポリペプチドを投与して、それにより腫瘍細胞浸潤が阻害されることを含む、腫瘍細胞が20P1F12/TMPRSS2の合成または分泌の増加を示す、腫瘍細胞の浸潤を阻害するための方法からなる。これらの方法の好ましい態様において、配列番号：2のポリペプチドは、20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼドメインを含む32 kD断片からなる。

40

【0177】

本発明の関連する態様は、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌もしくは大腸癌、または転移性癌の増殖のような腫瘍細胞増殖を阻害するために20P1F12/TMPRSS2分子の十分な量を哺乳動物へ投与することを含む哺乳動物において腫瘍細胞増殖を阻害することの方法からなり、その20P1F12/TMPRSS2分子は、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する、またはその抗増殖性断片である。

【0178】

ポリペプチドの修飾により、様々な状況においてそれらの使用が促進されうことは、当業者は理解している。従って、異種構造のポリペプチドについての修飾に加え(例えば、上記で論議される免疫グロブリン融合ポリペプチドを参照)、本発明はさらに、1つまたは複数の化学基に共有結合的に付着される(以下「抱合される(conjugated)」)20P1F12/TM

50

PRSS2変異体を提供する。そのような変異体は、特に、インビボでの使用に有用である。本発明の20P1F12/TMPRSS2変異抱合体において使用に適する化学基は、好ましくは、有意に毒性または免疫原性ではない、すなわち、20P1F12/TMPRSS2変異抱合体について観察される毒性または免疫原性も、対応する非修飾型20P1F12/TMPRSS2変異体について観察される毒性または免疫原性より、有意に強くない(すなわち、50%未満)。典型的には、非修飾型20P1F12/TMPRSS2変異体に関連する毒性および/または免疫原性を低下させる化学基が選択される。さらに、化学基は、非修飾型20P1F12/TMPRSS2変異体の保存および使用に適した条件下で保存されかつ使用されうる20P1F12/TMPRSS2変異抱合体を作製するために都合よく選択される。模範的な化学基は、例えば、糖タンパク質に属して天然に存在するそれらの炭水化物のような炭水化物、およびポリオールのような非タンパク質のポリマーを含む。

10

#### 【0179】

例えば、ポリオールは、国際公開公報第93/00109号に開示されるように、20P1F12/TMPRSS2変異体分子にリシン残基を含む1つまたは複数のアミノ酸残基で抱合されうる。使用されるポリオールは、任意の水溶性ポリ(アルキレンオキシド)ポリマーでありえ、かつ直鎖状または側鎖をもつことができる。適するポリオールは、1個と4個の間の炭素を有するアルキル基のような化学基で1つまたは複数のヒドロキシルの位置で置換されたポリオールを含む。典型的には、ポリオールは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)のようなポリ(アルキレングリコール)であり、そしてこのように、記述の簡便さのために、論議の残りは模範的態様に関連し、使用されるポリオールはPEGであり、およびポリオールを20P1F12/TMPRSS2変異体に抱合することの段階は「ペジル化(pegylation)」と呼ぶ。しかしながら、例えば、ポリ(プロピレングリコール)およびポリエチレン-ポリプロピレングリコールコポリマーのような他のポリオールが、PEGについて本明細書に記載される抱合のための技術を用いて使用されうることを当業者は認識している。本発明の20P1F12/TMPRSS2変異体のペジル化の程度は、対応する非ペジル化タンパク質と比較して、インビボでの半減期(以下、「半減期」)が望ましく増加されるように調整されうる。

20

#### 【0180】

タンパク質をペジル化するための様々な方法が記載されてきた。例えば、生理的活性のある非免疫原性組成物を作製するために、いくつかのホルモンおよび酵素のPEGおよびポリプロピレングリコールへの抱合を開示する、米国特許第4,179,337号(Davisらへ発行)を参照のこと。一般的に、少なくとも1つの末端ヒドロキシ基を有するPEGは、カップリング剤と反応させて、末端反応基を有する活性化PEGを形成する。この反応基は、その後、タンパク質の アミンおよび アミンと反応して共有結合を形成することができる。都合のよいことには、PEG分子の他方の末端をメトキシ基のような非反応性化学基で「ブロック」して、タンパク質分子のPEG架橋された複合体の形成を低下させることができる。

30

#### 【0181】

##### 本発明の診断方法の詳細な説明

上記のように、個体における20P1F12/TMPRSS2の状態を評価するアッセイ法(例えば、20P1F12/TMPRSS2遺伝子、及びmRNA、タンパク質等の遺伝子産物の状態)は、その個体からの細胞の増殖あるいは発癌能に関する情報を得る為に利用できる。具体的には、前立腺及び大腸癌細胞系において20P1F12/TMPRSS2mRNAがこれほど高発現しているという知見により、この遺伝子、及びその産物は、20P1F12/TMPRSS2の状態の変化に関連する疾患に侵されている可能性のある個体から得られた生体試料を評価する為に当業者が利用できる標的として認められる。

40

#### 【0182】

20P1F12/TMPRSS2は様々な前立腺癌異種移植組織及び細胞系において発現しており、一部の大腸癌細胞系においても発現している為、20P1F12/TMPRSS2の発現状態は、形成異常細胞、前癌性細胞及び癌細胞の存在、状態、及び位置を含む情報の特定、並びに疾患の様々な時期に対する感受性の予測、及び/または腫瘍の活動度を見積るために有用な情報を提供できる。更に、20P1F12/TMPRSS2の発現プロフィール、及び細胞表面における位置が

50

ら、これは転移した疾患の造影剤となる可能性がある。その結果、癌等のように無制御細胞増殖により特徴付けられる病態に苦しんでいる、または、そのように予測される個体等から得られる生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態を検査する為の様々な分子予診及び診断法に本発明の重要な局面が向けられている。

#### 【0183】

癌の発生は、多段階工程であることが公知であり、細胞増殖は次第に無制御になり、細胞は正常な生理状態から前癌性状態、その後、癌性状態へと進行する (Alersら、Lab Invest. 77(5): 437-438 (1997); Isaacsら、Cancer Surv. 23: 19-32 (1995)参照)。これに関連して、無制御細胞増殖 (例えば、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、または大腸癌、あるいは転移癌における異常な20P1F12/TMPRSS2発現) の証拠を得るための生体試料の検査は、癌などの病態が、治療の選択肢が限られてしまう状態にまで進行する以前の段階における異常な細胞生理の早期発見を可能にし得る。このような検査では、目的の生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態 (例えば、無制御細胞増殖を示すと思われるもの) を、例えば、それに相当する正常な試料 (例えば、その個体 (もしくは、他の個体) からの試料で、病態によりもたらされたものではない試料であり、例えば、無制御の細胞増殖の可能性の無いもの) における20P1F12/TMPRSS2の状態と比較することが可能であり、目的の生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態の (正常な試料と比較した場合の) 変化が無制御細胞増殖の証拠となる。正常対被験試料において20P1F12/TMPRSS2を比較する場合、正常な試料として病態によりもたらされたものではない生体試料を使用するのに加え、あらかじめ定めた正常なmRNA発現レベル等のあらかじめ定めた規範値 (例えば、Grev

10

20

30

40

50

#### 【0184】

ここで「状態」とは、技術上認められた意味に従って使用され、遺伝子及びその産物の状態または様子を意味する。ここに具体的に説明されているとおり、20P1F12/TMPRSS2の状態は、当業者に知られた多数のパラメーターにより評価することができる。例えば、図3に示し、実施例1に記載のとおり、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドの配列、及び/または、その生体試料におけるポリペプチドを調べることにより評価できる。または、図5~7に示し、実施例3及び4に記載のとおり、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、その生体試料に含まれる20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物 (例えば、mRNA、及び/またはタンパク質) の量を調べることにより評価できる。または、図17及び表1に示すとおり、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、正常な生体試料における20P1F12/TMPRSS2の位置を観察し、それを無制御細胞増殖の証拠を有する可能性のある生体試料における20P1F12/TMPRSS2の位置と比較することにより評価できる。または、図18に示し、実施例10に記載のとおり、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、翻訳後自己触媒分解の結果得られる32kDプロテアーゼ断片等の特定の20P1F12/TMPRSS2種の有無を観察することにより評価できる。または、図20~23に示し、実施例11に記載のとおり、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、生体試料内の特定の20P1F12/TMPRSS2免疫反応性複合体の有無を調べることにより評価できる。

#### 【0185】

一般的に、遺伝子及びその産物の状態または様子を評価する為に当業者は、多くのパラメーターを使用する。それらは、遺伝子とその制御配列を含む完全性及び/またはメチル化パターン、発現した遺伝子産物の位置 (20P1F12/TMPRSS2発現細胞の位置を含む)、発現された遺伝子産物の存在、量、及び生物活性 (20P1F12/TMPRSS2mRNAポリヌクレオチド、及びポリペプチド等)、発現された遺伝子産物への転写及び翻訳修飾の有無、並びに、発現された遺伝子産物とタンパク質結合相手等の他の生体分子との会合 (例えば、図21に示したようなタンパク質-タンパク質複合体) を含むが、これらに限定されない。

#### 【0186】

20P1F12/TMPRSS2の状態の改変は、一般的に以下に記載したような、当技術分野において公知の多様な方法論により評価できる。一般的に、20P1F12/TMPRSS2の状態の変化は、2

OP1F12/TMPRSS2及び/または20P1F12/TMPRSS2発現細胞の位置の変化、20P1F12/TMPRSS2mRNA及び/またはタンパク質発現の上昇、及び/または20P1F12/TMPRSS2の結合相手との会合または解離からなる。ここに表すデータは、腺構造の崩壊により20P1F12/TMPRSS2タンパク質が血清に分泌される証拠を示すものであり(例えば、図17及び表1参照)、具体的に、代表的な20P1F12/TMPRSS2の状態の変化は、血清における分泌された20P1F12/TMPRSS2タンパク質の量の変化を含む。

【0187】

ここに具体的に記載するように、無制御細胞増殖に関連する状態あるいは現象を特定するためには、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、サザン分析(例えば、20P1F12/TMPRSS2遺伝子における摂動(perturbation)を調べるため)、20P1F12/TMPRSS2mRNAのノーザン及び/またはPCR分析(例えば、20P1F12/TMPRSS2mRNAのポリヌクレオチド配列あるいは発現量の変化を調べるため)、ウエスタン及び/または免疫組織化学分析(例えば、ポリペプチド配列における改変、試料内におけるポリペプチドの位置の改変、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の発現レベルの変化、及び/または、20P1F12/TMPRSS2タンパク質とポリペプチド結合相手の会合を調べるため)を含む当業者により利用されている多数の方法により評価し得るが、これらに限定されない。検出可能な20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドは、例えば、20P1F12/TMPRSS2遺伝子またはその断片、20P1F12/TMPRSS2mRNA、別のスプライス変異型20P1F12/TMPRSS2mRNA、及び20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドを有する組換えDNAまたはRNA等を含む。

【0188】

実施例6、8、9、及び11に記載し、例えば、図20、22、23、24、及び26に示すように、多数の異なる20P1F12/TMPRSS2種が様々な生体試料において観察されている。この状況において、検出可能な20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドの有無及び/または量を調べることで、試料の状態に関する情報を得ることが可能である。検出可能な20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドは、例えば、32kDのプロテアーゼ領域ポリペプチド、70kDの全長20P1F12/TMPRSS2タンパク質、並びに、20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドと第二番目の生体分子(例えば、PSAにおいて見られる)の複合体を表す可能性のある90kD及び103kD種を含む。さらに、当業者は、同様のポリペプチド及び/またはタンパク質複合体やその比率が、例えば、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、または大腸癌の患者の診断に応用可能であることを、認識している(例えば、以下に記す5,672,480、5,939,533、5,840,501参照)。これは、20P1F12/TMPRSS2の状況において特に実質的な価値があり、例えば、図23に示すとおり、事故被害者である28歳の正常な男性の前立腺全組織可溶化物(パネルC)における70kD対32kD種の20P1F12/TMPRSS2の比率は、癌患者の前立腺より得た全組織可溶化物(パネルB)において見られる比率と異なっている。

【0189】

診断方法と関連して多くの20P1F12/TMPRSS2種、及びその比率を調べる様々な知見が熟慮されている。例えば、32kD種対70kD種、90kD種、及び/または103kD種の比率、70kD種対32kD種、90kD種、及び/または103kD種の比率、90kD種対32kD種、70kD種、及び/または103kD種の比率、103kD種対32kD種、70kD種、及び/または90kD種の比率等を調べることができる。また、20P1F12/TMPRSS2種の部分集合の比率、並びに、他の特定の20P1F12/TMPRSS2種の有無を調べることが可能である。例えば、32kD種対70kD種の比率と90kD種及び/または103kD種の有無、70kD種対90kD種の比率と32kD種及び/または103kD種の有無、103kD種対32kD種の比率と70kD種及び/または90kD種の有無等を調べることができる。また、20P1F12/TMPRSS2種のある一つの部分集合の比率、並びに、20P1F12/TMPRSS2種の別の部分集合の比率を調べることが可能である。例えば、32kD種対70kD種の比率と32kD種対90kD種の比率、70kD種対103kD種の比率と90kD種対32kD種の比率、70kD種対90kD種の比率と103kD種対32kD種の比率等を調べることができる。

【0190】

診断方法に関連して様々な20P1F12/TMPRSS2種及びその比率を検査する場合、検査されている特定の生体組織における正常な状態(例えば、図17に示す組織、図20に示す精液、

10

20

30

40

50

及び図23に示す血清、を参照)等のその他の要素も合わせて考慮することが可能である。例えば、20P1F12/TMPRSS2タンパク質と複合できる様々な結合相手は異なる量で種々の組織系に存在し得る。その結果、20P1F12/TMPRSS2タンパク質と複合できる結合相手の相対量のアッセイを行うことが可能である。ある20P1F12/TMPRSS2種が主に前立腺由来ではなく、大腸由来の試料に見られるという証拠を提供することにより、図26のレーン5~7は、異なる試料におけるこの様な結合相手の見掛け上異なる量を表す(例えば、約45~50kDのバンド参照)。更に、この45~50kDのバンドは、主に正常な大腸サンプルに発現していると思われるため(例えば、レーン1及び2参照)、試料の状態に関する診断情報を提供するために一つ以上の20P1F12/TMPRSS2種及び/または20P1F12/TMPRSS2結合相手の有無または相対量を利用する方法論は更に支持される。

10

#### 【0191】

診断方法に関連して様々な20P1F12/TMPRSS2種、及びその比率を検査する場合、20P1F12/TMPRSS2種の細胞内(例えば、図17に示す細胞関連20P1F12/TMPRSS2種参照)あるいは細胞外(例えば、図22及び23に示す分泌20P1F12/TMPRSS2種参照)における局在等の要素を考慮することも可能である。これらの知見は、当技術分野において公知であり、分泌種内の領域(例えば、プロテアーゼ領域)に特異的な指向性を持つ抗体、あるいは、細胞表面に関連する領域に特異的な指向性を持つ抗体を利用することにより行うことが可能である。

#### 【0192】

以下に詳しく説明するとおり、20P1F12/TMPRSS2の分析は、ここに示す目的に用いられる多様な手法の内のいずれかにより行うことができ、(i)免疫組織化学分析、(ii)インサイチュハイブリダイゼーション、(iii)RT-PCR分析、(iv)臨床試料及び細胞系のウエスタンブロット分析、(v)組織アレイ分析、及び(vi)in vivo画像法を含む。遺伝子及びその産物の状態の評価の典型的なプロトコールの具体例は、例えば、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols In Molecular Biology)」、第2章[ノーザンブロット法]、第4章[サザンブロット法]、第15章[イムノブロット法]、第18章[PCR分析]、Frederick M. Ausubelら編、1995に記載されている。20P1F12/TMPRSS2タンパク質の検出に有用な様々な特異的免疫アッセイ法は、種々の放射線免疫検定法、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)、酵素結合免疫蛍光検定法(ELIFA)、免疫細胞化学法等を含むが、これらに限定されない。例えば、20P1F12/TMPRSS2抗体は、標識されていてもよく、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、または大腸癌細胞、あるいは、転移癌細胞を(例えば、放射線シンチグラフィ画像法において)検出できる免疫造影剤として使用してもよい。生体内放射線シンチグラフィ画像法においては、分泌された20P1F12/TMPRSS2エピトープと特異的反応性を有する放射線標識された20P1F12/TMPRSS2抗体が好ましい。

20

30

#### 【0193】

前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、または大腸癌、あるいは、転移癌において起きる細胞増殖の無制御に関連する疾患を特定するアッセイ法は、病態を評価するために使用する多様な生体試料、例えば、尿、便、精液、並びに癌が転移した際に発生し得る組織から得た細胞標本等のいずれかにおいて20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの量を検出する工程を含んでもよい。典型的な試料は、20P1F12/TMPRSS2タンパク質、または前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、または大腸癌、あるいは転移癌を含むがこれらに限定されない癌細胞の有無を好都合に検定することが可能な末梢血及び/または血清を含む。これに関連して、組織(例えば、図17参照)、血清(例えば、図23参照)、及び精漿(例えば、図24参照)を含む種々の生体試料における様々な20P1F12/TMPRSS2種がここに記載されている。

40

#### 【0194】

20P1F12/TMPRSS2の検出に、例えば、免疫学的、ノーザンまたはRT-PCR分析を利用することにより、20P1F12/TMPRSS2タンパク質、及び/または、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、または大腸癌の細胞、あるいは、転移癌細胞の有無について、末梢血及び血清を好都合に検定することができる。末梢血液内の腫瘍細胞に対するRT-PCR検出アッセ

50

イ法は、多数のヒト固形腫瘍の診断及び管理への利用が現在検討中である。前立腺癌の分野では、これらは、PSA及びPSMを発現する細胞を検出するためのRT-PCRアッセイ法を含む（Verkaikら、1997, Urol. Res. 25:373-384; Ghosseinら、1995, J. Clin. Oncol. 13: 1195-2000; Hestonら、1995, Clin. Chem. 41: 1687-1688）。また、別の方法において、最近報告された、血液内の癌細胞を検出及び特定する敏感なアッセイ法を利用してよい（Racilaら、1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4589-4594）。このアッセイ法は、免疫磁気濃縮を多パラメーターの流動細胞計測、及び免疫組織化学的分析と組合せたものであり、血液中の癌細胞を高感度で検出でき、1mlの末梢血から1個の上皮細胞を検出することが可能であると報告されている。

【0195】

20P1F12/TMPRSS2は、アンドロゲン制御、類似する機能性領域、血清における存在、一つ以上のタンパク質と複合体を形成する能力、及び癌に関連した発現量の上昇等を含む前立腺特異的抗原と似た多くの性質を共有する。その結果、PSAを評価するための当技術分野において公知の様々なアッセイ法は、20P1F12/TMPRSS2の評価にも利用できる典型的な方法を表す。20P1F12/TMPRSS2と共に使用可能と考えられるPSAを調べる工程を含む多数の代表的なアッセイ法を以下に記す。このようなアッセイ法は、20P1F12/TMPRSS2の状態を評価するアッセイ法と組合せて使用してもよい。

【0196】

ここに参考文献として含まれる米国特許第5,840,501号は、血液試料中の免疫学的に測定可能なPSAを検査する典型的な方法を提供する。ここに示す公知のアッセイ法を変化させたものでは、血液試料を処理することにより遊離PSA（fPSA）が免疫学的に測定できないよう変化させ、PSAを二部位免疫測定法により検査する。この状況における血中cPSA値の測定により、前立腺癌の診断及び監視を補助する非常に敏感かつ特異的な方法を提供することが見出され、多くの患者において不要な前立腺生検を受ける必要性が無くなった。米国特許第5,840,501号に記載の特に好ましい免疫測定法は、三つの抗PSA抗体を利用する。第一番目の抗体は、cPSA及びfPSAの両方に結合し（抗tPSA）、第二の抗体は、fPSA特異的抗体と結合することによりfPSAへの結合が阻害されるという固有の性質に特徴付けられる抗tPSA抗体、また、第三の抗体は、fPSA特異的抗体である。そのため、試料においてfPSA特異的抗体がPSAに結合することにより、cPSAのみが免疫測定法において測定されることを可能とする。米国特許第5,840,501号に記載の方法に従い、当業者は、例えば三つの抗20P1F12/TMPRSS2抗体を使用した類似の方法を利用することができる。第一の抗体は、c20P1F12/TMPRSS2とf20P1F12/TMPRSS2の両方に結合し（抗t20P1F12/TMPRSS2）、第二の抗体は、f20P1F12/TMPRSS2特異的抗体と結合することによりf20P1F12/TMPRSS2への結合が阻害されるという固有の性質に特徴付けられる抗t20P1F12/TMPRSS2抗体、そして、第三の抗体は、f20P1F12/TMPRSS2特異的抗体である。そのため、試料においてf20P1F12/TMPRSS2特異的抗体が20P1F12/TMPRSS2に結合することにより、c20P1F12/TMPRSS2のみが免疫測定法において測定されることを可能とする。

【0197】

ここに参考文献として含まれる米国特許第5,939,533号は、さらに遊離PSA、並びに、プロテイナーゼ阻害剤複合体を測定するための典型的な免疫検定法を提供する。米国特許第5,939,533号に記載の方法において、遊離PSA及びPSA複合体は、少なくとも二つの異なるモノクローナル抗体を利用した非競合免疫検定法により測定される。本発明は、さらに目的のPSAプロテイナーゼ阻害剤複合体が、 $\gamma_1$ 抗キモトリプシン、 $\gamma_1$ プロテアーゼ阻害剤（API）、または $\gamma_1$ マクログロブリンと形成されることにより、特徴付けられる。その上、第5,939,533号に記載の発明は、遊離PSA、PSA-プロテイナーゼ阻害剤複合体、及びその比率が前立腺癌患者の診断に応用できることを見出したという特徴を有する。米国特許第5,939,533号に記載の方法に従い、当業者は、例えば、図23、24、及び26に示した20P1F12/TMPRSS2タンパク質種を観察するために類似の方法を利用できる。これに関連して、遊離20P1F12/TMPRSS2、及び/または、20P1F12/TMPRSS2-タンパク質複合体、及びその比率の観測は、例えば、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌または大腸癌、あるいは、転移

10

20

30

40

50

癌の患者の診断に応用できると考えられる。

【0198】

ここに参考文献として含まれる米国特許第5,672,480号は、更に前立腺特異的抗原（PSA）のための典型的な免疫検定法を提供する。また、PSAの免疫検定法に検定標準あるいは対照として利用できるPSA及び $\alpha_1$ 抗キモトリプシン（ACT）の複合体に似た複合体が5,672,480に記載の方法に記載されている。更に、5,672,480には、ポリクローナル抗体をPSA、PSAがACTに結合することにより遮蔽されたエピトープを結合するもの、及びエピトープに結合しないものを分画する方法が記載されている。5,672,480に記載の方法に従い、当業者は、20P1F12/TMPRSS2の免疫検定において検定標準あるいは対照として利用できる20P1F12/TMPRSS2とその結合相手の複合体に似た複合体を発生させる類似の方法を利用することができる。また、当業者は、5,672,480に記載のポリクローナル抗体を20P1F12/TMPRSS2、20P1F12/TMPRSS2がその結合相手との結合により遮蔽されたエピトープに結合するものと結合しないものに分画する方法を利用することができる。

10

20

30

40

50

【0199】

ここに参考文献として含まれる米国特許第5,614,372号は、全PSA濃度（PSA-T）、遊離状態のPSAの濃度（PSA-F）、または $\alpha_1$ 抗キモトリプシンに複合したPSAの濃度（PSA-ACT）のいずれかの測定からなる前立腺特異的抗原（PSA）の典型的なバイオアフィニティーアッセイ法を記し、PSA-TはPSA-F及びPSA-ACTの和である。米国特許第5,614,372号の開示によると、別の分子であるヒト腺カリクレイン（hGK-1）の濃度も合わせて測定する。PSA-T及びhGK-1の濃度は、単独のアッセイ法、または別々のアッセイ法により測定することができ、a) PSA-F/(PSA-T+hGK-1)及び/またはb) PSA-ACT/(PSA-T+hGK-1)の比率を求めるためにPSA-T及びhGK-1の濃度の和を使用する。米国特許第5,614,372号の公開において、この両方の比率が前立腺癌と良性前立腺肥大症を区別するために臨床上有用であることが示されている。第5,614,372号に記載の方法に従い、当業者は、類似の方法を利用し、20P1F12/TMPRSS2を分析することができ、この方法は、全20P1F12/TMPRSS2の濃度（20P1F12/TMPRSS2-T）、遊離20P1F12/TMPRSS2の濃度（20P1F12/TMPRSS2-F）、または結合相手と複合した20P1F12/TMPRSS2の濃度（20P1F12/TMPRSS2-BP）の測定からなり、20P1F12/TMPRSS2-Tは20P1F12/TMPRSS2-Fと20P1F12/TMPRSS2-BPの和である。更に、ヒト腺カリクレイン（hGK-1）の濃度を測定し、それを利用することにより、a) 20P1F12/TMPRSS2-F/(20P1F12/TMPRSS2-T+hGK-1)及び/またはb) 20P1F12/TMPRSS2-ACT/(20P1F12/TMPRSS2-T+hGK-1)の比率を求めることができる。米国特許第5,614,372号に開示されているとおり、これらの比率は、臨床上の利用に役立てることができる。

【0200】

ここに参考文献として含まれる米国特許第5,939,258号は、前立腺微小転移を診断する典型的な方法を提供し、その方法においては、患者からの組織試料より核酸を単離、組織試料より得た前立腺癌に特異的な核酸を増幅、あるいは、前立腺癌特異的な核酸に特異的なプローブがハイブリッドを形成することにより発生したシグナルを増幅し、増幅した核酸の検出が前立腺癌の微小転移を指示する。以下に具体的に説明するように20P1F12/TMPRSS2核酸に特異的なプローブは同様に増幅でき、増幅された核酸の検出は、前立腺または大腸癌の微小転移の証拠を提供する。

【0201】

ここに参考文献として含まれる米国特許第5,972,615号は、ヒト前立腺疾患を検出する別の典型的な診断技術を提供する。特に、本発明は、正常なヒト前立腺、良性前立腺肥大症、及び非転移性前立腺癌と比較して転移性前立腺癌において異なった発現を示すRNA種が存在するかを評価するプローブ、及び方法に関連する。また、本発明は、健常者と比較して疾患に侵された患者の末梢血において異なった発現を示すRNA種が存在するかを評価するプローブ、及び方法にも関連する。転移性前立腺癌において異なった発現を示す遺伝子の治療的使用方法、及び前立腺癌の治療に有効な医薬品のスクリーニング方法が記載されている。同様に、米国特許第5,972,615号は、被験者における前立腺癌の進行を測定する場合において、別のスプライシングを受けた前立腺特異的膜（PSM）抗原をコードする

単離された哺乳類の核酸分子、前立腺特異的膜抗原プロモーター配列をコードする単離された核酸分子、及び被験者の血行性微小転移腫瘍細胞を検出する方法を提供する。以下に詳しく説明するように、被験者における前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、及び/または、大腸癌、及び/または、転移癌を含む他の癌の進行を測定する場合において、20P1F12/TMPRSS2に特異的な分子は、被験者の血行性微小転移腫瘍細胞を検出するために利用することが可能である。

#### 【0202】

下記の様々な典型的な態様に説明するとおり、予診的、及び/または、診断的情報を提供するために、個体における20P1F12/TMPRSS2の状態を明らかにする多様な方法を利用することができる。このような、20P1F12/TMPRSS2の状態を明らかにする方法は、特定の疾患に対する感受性、疾患の段階及び進行、及び/または、腫瘍の活動度の予測に有用な情報を提供し得る。これに関連して、本発明の様々な詳細な説明として20P1F12/TMPRSS2の状態を解明し、細胞増殖の無制御に関係する症候群を評価する典型的な方法及びアッセイ法を以下に記す。

#### 【0203】

本発明の特に好ましい態様は、目的の生体試料における無制御細胞増殖の証拠を検定、あるいは、検査する方法から構成され、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態をそれに相当する正常な試料における20P1F12/TMPRSS2の状態と比較する工程からなり、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態の変化が無制御細胞増殖に関連する。細胞増殖の無制御（即ち、過形成細胞、前癌性細胞、及び癌細胞等において起こる正常な細胞増殖の崩壊）は、複雑で多段階な工程を含む癌発生及び腫瘍の進行の重要な要素であるため、無制御細胞増殖を示唆する状態、または、現象を特定する方法（即ち、20P1F12/TMPRSS2の正常な生態の変化）は、医療従事者にとって特に興味深いものである。これは、癌等の病態の早期発見が病状及び死亡率に多大な影響を及ぼすためである。

#### 【0204】

例えば、図5及び図7に示すように、20P1F12/TMPRSS2は前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、肺癌、及び卵巣癌の組織または細胞系、並びに、転移癌組織のプールにおいて過剰発現していることが見出されているが、腎臓癌組織においては、低発現している（ほとんどの腫瘍組織サンプルにおいてTMPRSS2は低発現しているが、一つのサンプルにおいて過剰発現していることを示す図33も参照）。更に、以下に詳しく説明するとおり、20P1F12/TMPRSS2は、確固たる証拠となる多数の特徴を示すことからそれが発癌の過程に関与すると考えられる。即ち、被験試料とそれに相当する正常な試料、例えば、影響の無い近い位置（例えば、正常な大腸または前立腺組織）または影響されていない個体から得た試料、とを比較した場合の被験試料における20P1F12/TMPRSS2の状態の変化（例えば、mRNA発現の上昇）の確認は、無制御細胞増殖の証拠を提供する。

#### 【0205】

上記の詳しい説明のとおり、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、当技術分野において公知の数々の操作により検査することができる。例えば、生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、例えば、20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドの値、または、癌ではない試料において起こることが知られているポリペプチド発現と前癌性、または、癌の試料（無制御細胞増殖の証拠となる20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの過剰発現を示すもの）を比較することにより調べることができる。このような状況から、評価の可能な20P1F12/TMPRSS2は、配列番号：1に示す20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチド配列、並びに、配列番号：2に示す20P1F12/TMPRSS2ポリペプチド配列を含む。

#### 【0206】

体内の特定の位置より採取した生体試料は、その試料における20P1F12/TMPRSS2を発現する細胞（例えば、20P1F12/TMPRSS2mRNAまたはタンパク質を発現するもの）の有無の評価により検査することができる。例えば、20P1F12/TMPRSS2発現細胞が、通常このような細胞を含まない体の部分（例えば、リンパ節、骨、または、肝臓等）から得られた生体試料において発見された場合、この検査は、無制御細胞増殖の証拠を提供することができる

10

20

30

40

50

。このような生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態の変化は、無制御細胞増殖に関係することが多い。具体的に、無制御細胞増殖の一つの指標としては、元となる臓器（例えば、前立腺、または、大腸等）から体内の違う場所（例えば、リンパ節等）への癌細胞の転移である。このような無制御細胞増殖の証拠は、大腸癌において重要であり、それは、例えば、大腸癌における節転移の分布の理解が、早期再発性節疾患の発見を可能にするからである（例えば、AJR Am J Roentgenol 1992 Oct; 159(4): 757-61参照）。このような無制御細胞増殖の証拠は、前立腺癌において重要であり、それは、例えば、潜在リンパ節転移が、かなりの割合の前立腺癌患者において検出でき、このような転移は、疾患の進行を予測する公知の物質に関係しているからである（例えば、J. Urol. 1995 Aug; 154 (2 Pt 1): 474-8参照）。

10

**【0207】**

本発明の特定の態様において、目的の生体試料（典型的には、多数の指標の内一つが上昇した20P1F12/TMPRSS2の発現であり、それらを示す病理的症候群に侵されている可能性のある患者から得られたもの）における20P1F12/TMPRSS2mRNAの状態の変化を検出する方法は、少なくとも一個のプライマーを使った逆転写により試料からcDNAを作る工程、20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドをセンス及びアンチセンスプライマーとして使用し、このように作られたcDNAを増幅することにより、そこに含まれる20P1F12/TMPRSS2cDNAを増幅する工程、及び増幅された20P1F12/TMPRSS2cDNAの存在を検出する工程からなる。典型的な態様において、生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子を検出する方法は、まずゲノムDNAを試料から単離する工程、20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドをセンス及びアンチセンスプライマーとし、単離したゲノムDNAを増幅することによりそこに含まれる20P1F12/TMPRSS2遺伝子を増幅する工程、及び増幅された20P1F12/TMPRSS2遺伝子の存在を検出する工程からなる。適当なセンス及びアンチセンスプローブの組合せは、20P1F12/TMPRSS2の塩基配列（図1、配列番号：1）から幾つでも設計でき、この目的の為に使用してもよい。また、別の態様において、生体試料における20P1F12/TMPRSS2タンパク質の存在を検出する方法は、まず、試料を20P1F12/TMPRSS2抗体、その20P1F12/TMPRSS2反応性断片、または、20P1F12/TMPRSS2抗体の抗原結合部位を含む組換えタンパクに接触させる工程、及び次に、それと20P1F12/TMPRSS2タンパク質の結合を試料において検出する工程からなる。

20

**【0208】**

20P1F12/TMPRSS2を発現、及び/または、異常な発現を示す細胞を確認する方法も提供される。一つの態様において、20P1F12/TMPRSS2遺伝子を発現する細胞を特定するアッセイ法は、細胞における20P1F12/TMPRSS2mRNAの存在を検出する工程からなる。細胞内の特定のmRNAを検出する方法は、公知であり、例えば、相補的DNAプローブを用いたハイブリダイゼーションアッセイ法（標識された20P1F12/TMPRSS2リボプローブ、ノーザンブロット、及び関連した技術を使ったインサイチュハイブリダイゼーション等）、及び様々な核酸増幅アッセイ法（20P1F12/TMPRSS2に特異的な相補的プライマーを使用したRT-PCR、及び他の増幅型検出法、例えば、分岐DNA、SISBA、TMA等）を含む。また、20P1F12/TMPRSS2遺伝子が発現する細胞を確認するアッセイ法は、細胞内の、あるいは、細胞から分泌される20P1F12/TMPRSS2タンパク質の有無を検出する工程からなる。様々なタンパク質検出方法が当技術分野において公知であり、20P1F12/TMPRSS2タンパク質、及び20P1F12/TMPRSS2発現細胞の検出に利用できる。

30

40

**【0209】**

本発明の典型的な態様は、無制御細胞増殖（例えば、異形成、過形成、または癌）に係る疾患を持つ可能性のある個体に由来する生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物の状態を決定し、このように決定した状態とそれに相当する正常な生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物の状態を比較することにより20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物を観察あるいは評価する方法を提供し、生体試料における、正常な生体試料と比較して異常な20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物の存在が、個体における無制御細胞増殖の存在を示す。

**【0210】**

本発明の典型的な態様は、生体試料における20P1F12/TMPRSS2mRNA、あるいは、タンバ

50

ク質発現をそれに相当する正常な試料における発現量と比較した場合の有意な増加、または、減少からなる個体における癌の有無を確認するために有用なアッセイ法を提供する。20P1F12/TMPRSS2mRNAの有無は、例えば、前立腺、大腸、膀胱、腎臓、卵巣や、肺等、及び転移部位由来の血液、血清、並びに、組織サンプルを含む生体試料において評価し得るが、それらに限定されない。その上、癌転移に関係する組織及び部位由来の生体試料も評価し得る。また、相当する正常組織が20P1F12/TMPRSS2mRNAまたはタンパク質を発現しないか、あるいは、低レベルで発現するため、これらの組織のどれにおいても、有意なレベルの20P1F12/TMPRSS2発現、及び/または、20P1F12/TMPRSS2の変化の存在は、これらの癌の発生、存在、転移、及び/または、重症度を示すのに有用となり得る。

#### 【0211】

本発明の典型的態様は、被験細胞、または組織サンプルにおける20P1F12/TMPRSS2mRNA、あるいは、タンパク質発現をそれに相当する正常な細胞、または組織における発現量と比較した場合の有意な増加の検出からなる個体における無制御細胞増殖（例えば、癌において起こるようなもの）の有無を確認するために有用なアッセイ法を提供する。大腸のサンプルにおける20P1F12/TMPRSS2mRNAの存在は、例えば、大腸癌の発生、存在、及び/または重症度を示し得る。また、関連する態様において、20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物の状態は、核酸レベルではなく、タンパク質レベルで確認し得る。例えば、そのような方法あるいはアッセイ法は、被験組織試料内の細胞により発現される20P1F12/TMPRSS2タンパク質の量を確認する工程、及びこのように確認された量とそれに相当する正常な試料において発現している20P1F12/TMPRSS2の量を比較する工程からなる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質の有無は、例えば、免疫組織化学的方法により評価し得る。20P1F12/TMPRSS2抗体、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質を検出できる結合相手は、当技術分野で公知なこの目的のための様々なアッセイ形式に利用してもよい。

#### 【0212】

上記のように、ここに説明する20P1F12/TMPRSS2mRNA、またはタンパク質の発現を検出、及び定量する方法は、当技術分野において公知である様々な標準的な核酸及びタンパク質の検出及び定量技術のどれも利用できる。20P1F12/TMPRSS2mRNAを検出、及び定量する標準的な方法は、標識された20P1F12/TMPRSS2リボプローブを使用したインサイチュハイブリダイゼーション、20P1F12/TMPRSS2ポリヌクレオチドプローブを使用したノーザンブロット及び関連技術、20P1F12/TMPRSS2に特異的なプライマーを使用したRT-PCR分析、及び増幅系検出方法、例えば、分岐DNA、SISBA、TMA等を含む。以下に記載の実施例で説明するように、特定の態様において、20P1F12/TMPRSS2mRNA発現を検出及び定量するために、半定量的RT-PCRを使用してもよい。この目的のためには、20P1F12/TMPRSS2を増幅できるプライマーを幾つでも使用してよく、ここに具体的に説明する様々なプライマーセットが含まれるが、それらに限定されない。タンパク質の標準的な検出及び定量方法をこの目的の為に使用できる。特定の態様において、20P1F12/TMPRSS2タンパク質と特異的に反応するポリクローナル、またはモノクローナル抗体は、生検組織の免疫組織化学的アッセイ法において使用し得る。

#### 【0213】

上記の方法に関連する態様においては、生体試料における20P1F12/TMPRSS2塩基配列、及びアミノ酸配列の完全性を評価することにより、これらの分子の構造における摂動、例えば、挿入、欠失、置換等を確認できる。塩基配列及びアミノ酸配列における摂動は、増殖無制御の表現型に関連する多くのタンパク質において見られるため（例えば、Marrogiら、J. Cutan. Pathol. 26(8):369-378 (1999)参照）、このような態様は、有用である。これに関連して、塩基配列、及びアミノ酸配列における摂動を確認する多種のアッセイ法が当技術分野において公知である。例えば、20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物の核酸、あるいは、アミノ酸配列の大きさ、及び構造は、ここに説明するノーザン、サザン、ウエスタン、PCR、及びDNA配列決定プロトコルにより観察してもよい。更に、塩基配列、及びアミノ酸配列における摂動を観察する他の方法、例えば、一本鎖立体配座多形性分析は、当技術分野において公知である（例えば、米国特許第5,382,510号、及び5,952,170号参照）。

10

20

30

40

50

## 【0214】

また、別の態様においては、生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子のメチル化状態が検査できる。遺伝子の5'制御領域におけるCpG島の異常な脱メチル化、及び/または、高メチル化は、不死化、及び形質転換した細胞において頻繁に起こり、様々な遺伝子の变化した発現が起こる結果となる。例えば、クラスグルタチオン-S-トランスフェラーゼのプロモーターの高メチル化（正常な前立腺において発現するタンパク質だが、>90%の前立腺癌種においては発現しない）は、この遺伝子の転写を永久的に抑えると見られ、また、前立腺癌種において最も頻繁に検出される遺伝子の改変である（De Marzoら、Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)）。更に、この改変は、少なくとも70%の高度前立腺上皮内異常増殖（prostatic intraepithelial neoplasia; PIN）において存在する（Brooksら、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536）。また、別の例において、LAGE-1腫瘍特異的遺伝子の発現（正常な前立腺においては発現しないが、20~25%の前立腺癌において発現する）は、リンパ芽球腫細胞においてデオキシアザシチジンにより誘導され、発現が脱メチル化に起因することを示唆する（Letheら、Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998)）。これに関連して、遺伝子のメチル化状態を検査する様々なアッセイ法が当技術分野において公知である。例えば、サザンハイブリダイゼーション手法において、メチル化されたCpGサイトを含む配列を切断することのできないメチル化感受性制限酵素を利用することにより、CpG島全体のメチル化状態を評価できる。その上、MSP（メチル化特異的PCR）は、特定の遺伝子のCpG島に存在する全部のCpGサイトのメチル化状態を迅速に概観することができる。この手順は、初めに亜硫酸水素ナトリウムによるDNAの修飾（全てのメチル化されていないシトシンをウラシルに変換する）、その後、メチル化、対、非メチル化DNAに特異的なプライマ-を使用した増幅を伴う。メチル化阻害を伴うプロトコルも、例えば、「分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols In Molecular Biology）」第12章、Frederick M. Ausubelら編、1995に記されている。

10

20

## 【0215】

遺伝子増幅の検査は、20P1F12/TMPRSS2の状態を評価する更なる方法を提供する。例えば、一般的なサザンプロット法やノーザンプロット法によるmRNAの転写の定量（Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)）、ドットプロット法（DNA分析）、またはここに示した配列に基づき、適当に標識されたプローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーション等により、試料において遺伝子増幅を直接測定してもよい。また、二重らせんDNA、二重らせんRNA、及び二重らせんDNA-RNAハイブリッド、またはDNA-タンパク質二重鎖（duplex）を含む、特定の二重鎖を認識できる抗体を利用してよい。次に、その抗体を標識することができ、また、二重鎖が表面に形成された後に二重鎖に結合した抗体の存在を検出し、二重鎖が表面に結合しているところでアッセイ法を行うことができる。

30

## 【0216】

本発明に関連する局面は、無制御の20P1F12/TMPRSS2発現に関係する症候群（癌など）の発症に対する個体の感受性の予測に向けられている。一つの態様において、癌に対する感受性を予測する方法は、生体試料において20P1F12/TMPRSS2mRNA、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質を検出する工程を含み、その存在が癌に対する感受性を示し、存在する20P1F12/TMPRSS2mRNA発現の度合いが、感受性の度合いに比例する。また、特定の態様においては、血清、または前立腺、膀胱、卵巣、肺、または大腸の組織における20P1F12/TMPRSS2の有無、または量を検査し、試料における20P1F12/TMPRSS2の存在が癌に対する感受性（腫瘍の発生あるいは存在）の指標を提供する。また、別の態様においては、血清、または腎臓における20P1F12/TMPRSS2の有無あるいは量を検査し、正常値と比較した場合の試料における20P1F12/TMPRSS2の量の低下が癌に対する感受性（腫瘍の発生あるいは存在）の指標を提供する。密接に関連した態様では、これらの分子の構造における摂動、例えば、挿入、欠失、置換等を確認するために生体試料における20P1F12/TMPRSS2塩基配列、及びアミノ酸配列の完全性を評価することができ、試料内の20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物における一つ以上の摂動の存在が癌に対する感受性の指標（腫瘍の発生、存在、または転移）

40

50

を提供する。

【0217】

また、別の本発明に関連する局面は、腫瘍の活動度を評価する方法に向けられている。一つの態様において、腫瘍の活動度を評価する方法は、血清、精液、尿、便等において、または腫瘍のサンプル内の細胞が発現している20P1F12/TMPRSS2mRNAまたは20P1F12/TMPRSS2タンパク質の量を決定する工程、及びこのように決定された量を、同じ個体、または正常組織の対照標準試料から得たそれに相当する正常な試料において発現している20P1F12/TMPRSS2mRNA、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質の量と比較する工程からなり、正常な試料と比較した場合の被験試料における20P1F12/TMPRSS2mRNA、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質の発現の度合いが活動度の指標となる。特定の態様において、前立腺、膀胱、卵巣、肺、または大腸の腫瘍、あるいは、転移性腫瘍の活動度は、個体からの試料において20P1F12/TMPRSS2が発現している程度を決定することにより評価され、より高い発現レベルはより活発な腫瘍を示す。密接に関連した態様では、これらの分子の構造における摂動、例えば、挿入、欠失、置換等を確認するために、生体試料における20P1F12/TMPRSS2塩基配列、及びアミノ酸配列の完全性を評価することができ、一つ以上の摂動の存在が、より活発な腫瘍を示す。

10

【0218】

また、本発明に関係する別の局面は、経時的に個体における悪性度の進行を観察する方法に向けられている。ひとつの態様において、経時的に個体における悪性度の進行を観察する方法は、生体試料において発現される20P1F12/TMPRSS2mRNA、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質の量を決定する工程、及びこのように決定された量を、同一の個体から異なる時期に採取した同等の生体試料において発現している20P1F12/TMPRSS2mRNA、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質の量と比較する工程からなり、試料における20P1F12/TMPRSS2mRNA、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質の経時的な発現の程度が癌の進行度の情報を提供する。特定の態様において、癌の進行は、腫瘍細胞における20P1F12/TMPRSS2発現の経時的变化の度合いを決定することにより評価し、より高い発現レベルは癌の進行を示す。別の態様において、癌の進行は、血清における20P1F12/TMPRSS2発現の経時的变化の度合いを決定することにより評価し、より高い濃度は癌の進行を示す。また、密接に関連した態様において、これらの分子の構造における摂動、例えば、挿入、欠失、置換等を確認するために生体試料における20P1F12/TMPRSS2塩基配列、及びアミノ酸配列の完全性を評価でき、一つ以上の摂動の存在が、癌の進行を示す。

20

30

【0219】

上記の診断方法は、当技術分野において公知の多様な予診、及び診断プロトコールのいずれかと組合せてもよい。例えば、ここに開示した本発明の別の態様は、組織サンプルの状態を診断及び予診する手段として、20P1F12/TMPRSS2遺伝子の発現及び20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物間の同所共存（または、20P1F12/TMPRSS2遺伝子、及び20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物における摂動）、及び悪性度に関係する因子を観察する方法に向けられている。これに関連して、悪性度に関係する多様な因子は、例えば、その他の点で悪性度に関係する遺伝子の発現（PSA、PSCA、PSM、及びヒト腺状カリクレインの発現を含む）、並びに、総細胞学的観測（例えば、Bockingら、Anal Quant Cytol. 6(2): 74-88 (1984)、Eptsein, Hum Pathol. 1995 Feb; 26(2): 223-9 (1995)、Thorsonら、Mod Pathol. 1998 Jun; 11(6): 543-51; Baisdenら、Am J Surg Pathol. 23(8):918-24 (1999)参照）等に利用することが可能である。20P1F12/TMPRSS2遺伝子及び20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物間の同所共存（または、20P1F12/TMPRSS2遺伝子、及び20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物における摂動）を観察する方法、及び悪性度に関係する追加の因子は、例えば、同時に起こる多数の特異的な因子、あるいはそのセットの存在が、組織サンプルの状態の診断及び予診に必須の情報を提供するため有用である。

40

【0220】

典型的な態様において、20P1F12/TMPRSS2遺伝子と20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物間の同所共存（または20P1F12/TMPRSS2遺伝子、及び20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物における摂動）を

50

観察する方法、及び悪性度に関係する因子は、生体試料における20P1F12/TMPRSS2mRNA、またはタンパク質の過剰発現を検出する工程、生体試料におけるPSAmRNA、またはタンパク質の過剰発現を検出する工程、並びに、20P1F12/TMPRSS2mRNAまたはタンパク質、及びPSAmRNAまたはタンパク質の過剰発現の同時発生を観察する工程を伴う。特定の態様においては、血清、あるいは、前立腺、膀胱、卵巣、肺、腎臓、または大腸の組織における20P1F12/TMPRSS2及びPSAmRNAの発現を検査する。また、好ましい態様において、試料における20P1F12/TMPRSS2及びPSAmRNAの過剰発現の同時発生は、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、あるいは、大腸癌の徴候、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、あるいは、大腸癌に対する感受性、またはそのような腫瘍の発生、存在、あるいは、転移を示し、腎臓癌においては、その逆を示す。

10

#### 【0221】

これらの方法では、20P1F12/TMPRSS2の状態の検査が多数の生体試料、例えば、尿、便、精液、並びに、前立腺、膀胱、卵巣、腎臓、肺、大腸、及び例えば、癌が転移する際にもたらす他の組織由来の細胞標本において可能である。これらの試料に加え、末梢血、及び/または、血清における20P1F12/TMPRSS2タンパク質、または、例えば、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌や大腸癌、及び転移癌を含むが、それらに制限されない癌細胞の存在は、簡単にアッセイできる。生体試料における20P1F12/TMPRSS2の状態は、当技術分野において許容される方法、例えば、サザン分析、ノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析、及び免疫検定のいずれかにより評価される。生体試料は、好ましくは、20P1F12/TMPRSS2mRNA発現、あるいは、20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現の量を検査することにより評価される。本発明の特に好ましい方法において、無制御細胞増殖は癌の徴候である。また、別の好ましい方法において、無制御細胞増殖は大腸癌の徴候である。好ましくは、生体試料において評価される20P1F12/TMPRSS2は、無制御増殖を示す細胞より分泌される。

20

#### 【0222】

本発明の別の態様は、個体から得た被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子の発現量を検査し、個体から得た生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量（例えば、病態の証拠を有すると思われるもの）を類似の正常な生体試料に見られる20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現量（例えば、病態の証拠を有すると思われないもの）と比較することにより個体における新生物の証拠を確認する方法からなり、被験生体試料と正常な生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子産物の量を比較した場合の差が新生物に関係する方法である。好ましくは、被験生体試料は20P1F12/TMPRSS2mRNA発現、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現の量を検査することにより評価される。本発明の特に好ましい方法において、新生物は、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、または大腸癌である。また、別の好ましい方法において、新生物は、転移癌である。

30

#### 【0223】

本発明の典型的な好ましい態様は、個体から得た生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現を検査し、次に、無制御細胞増殖に関連する因子の存在を確認するために個体を検査することにより、個体において癌を検出する方法からなり、個体から得た被験生体試料における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現、及び無制御細胞増殖に関連する因子の存在の同時発生が癌の徴候である。これに関連して、無制御細胞増殖に関連する多数の因子を、その他の点において無制御細胞増殖に関連する遺伝子の発現（ムチン、ラミニン-5、PSA、PSCA、及びPSMの発現を含む）、並びに、全体の細胞学的観測等に関連する因子としても利用することができる（例えば、Pykeら、Cancer Res. 1995 Sep 15; 55(18): 4132-9、Bockingら、Anal Quant Cytol. 6(2):74-88 (1984)、Eptsein, Hum Pathol. 1995 Feb; 26(2):223-9 (1995)、Thorsonら、Mod Pathol. 1998 Jun; 11(6):543-51、Baisdenら、Am J Surg Pathol. 23(8):918-24 (1999)参照）。本発明の特に好ましい方法において、癌は前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、または大腸癌である。また、別の好ましい方法において、新生物は転移癌である。この方法の特定の態様においては、サザン分析、ノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析、または免疫検定法を使用することにより20P1F12/

40

50

TMPRSS2mRNA発現量、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現量を検査する。被験生体試料において評価される20P1F12/TMPRSS2は、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、肺癌、または大腸癌細胞、あるいは、転移癌細胞より分泌されてもよい。

#### 【0224】

##### 20P1F12/TMPRSS2と相互作用する分子の同定

ここに開示する20P1F12/TMPRSS2タンパク質の配列は、当技術分野において許可される様々なプロトコルのいずれかにより当業者がこれらと相互作用する分子を同定することを可能にする。例えば、いわゆる相互作用トラップシステム類の一つを利用することができる（「2ハイブリッド法」とも呼ばれる）。このようなシステムでは、相互作用する分子は、転写因子及びレポーター遺伝子の直接発現を再構成し、その発現をアッセイする。典型的なシステムは、真核転写アクチベーターの再構成により生体内におけるタンパク質-タンパク質相互作用を確認し、これらは、米国特許第5,955,280号、第5,925,523号、第5,846,722号、及び第6,004,746号に開示されている。

10

#### 【0225】

実施例12に記載のとおり、20P1F12/TMPRSS2と相互作用しそうな（類似の分子、例えばPSAとの観察に基づいた）公知の分子群、例えば、血清及び精液セリンプロテアーゼ阻害剤を検査することにより、20P1F12/TMPRSS2タンパク質配列と相互作用する分子のスクリーニングが可能となる。また、ペプチドライブラリーをスクリーニングすることにより20P1F12/TMPRSS2タンパク質配列と相互作用する分子を同定できる。このような方法において、選択された受容体分子と結合するペプチド、例えば、20P1F12/TMPRSS2は、無作為あるいは調製したアミノ酸の集まりをコードするライブラリーをスクリーニングすることにより同定される。ライブラリーによりコードされるペプチドは、バクテリオファージコートタンパク質の融合タンパク質として発現しており、次に、目的のレセプターに対してバクテリオファージ粒子をスクリーニングする。従って、多数の利用法、例えば、治療または診断薬としての利用法のあるペプチドは、予想されるリガンド、または受容体分子の構造について何の予備情報無くても同定できる。20P1F12/TMPRSS2タンパク質配列と相互作用する分子を同定するために用いることのできる典型的なペプチドライブラリー、及びスクリーニング方法は、例えば、米国特許第5,723,286号、及び第5,733,731号に開示されている。

20

#### 【0226】

また、20P1F12/TMPRSS2を発現する細胞系は、20P1F12/TMPRSS2を介するタンパク質-タンパク質相互作用を確認するために使用できる。この可能性は、当技術分野において公知である免疫沈降技術を利用することにより検査が可能であり、図22に示すデータをもたらずと説明されているものを含む（Hamilton, B. J.ら、1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 261:646-51も参照）。一般的に20P1F12/TMPRSS2タンパク質は、抗20P1F12/TMPRSS2抗体を使用することにより、20P1F12/TMPRSS2を発現する癌細胞系より免疫沈降することができる。また、20P1F12/TMPRSS2を発現するよう設計された細胞系においてHisタグに対する抗体を使用できる（ベクターは上に説明されている）。ウエスタンブロット法、タンパク質の<sup>35</sup>Sメチオンin標識、タンパク質のマイクロシーケンシング、銀染色、及び二次元ゲル電気泳動等の手順により、免疫沈降した複合体におけるタンパク質会合を検査できる。

30

40

#### 【0227】

このようなスクリーニングアッセイ法に関連する態様は、20P1F12/TMPRSS2と相互作用する低分子を同定する方法を含む。典型的な方法は、米国特許第5,928,868号に記載され、少なくとも一つのリガンドが低分子であるハイブリッドリガンド形成の方法を含む。例示的態様において、このハイブリッドリガンドは、細胞内に導入され、その細胞は、一次及び二次発現ベクターを有する。それぞれの発現ベクターは、転写モジュールのためのコード配列にリンクした標的タンパク質をコードするハイブリッドタンパク質を発現するためのDNAを含む。この細胞はさらにレポーター遺伝子を含み、その発現は、第一番及び第二番目のハイブリッドタンパク質の互いの近接度によって調節されるが、これは、ハイブ

50

リッドリガンドが両方のハイブリッドタンパク質の標的部に結合した場合にのみ起こる出来事である。レポーター遺伝子を発現する細胞が選択され、未知の低分子、または未知のハイブリッドタンパク質が同定される。

#### 【0228】

本発明の典型的な態様は、分子を20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列に接触させる工程、相互作用を促す条件下で分子群と20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列を相互作用させる工程、及び20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列と相互作用する分子の存在を確認し、次に20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列と相互作用しない分子と20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列と相互作用する分子を分離する工程からなる、図1に示す20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列と相互作用する分子をスクリーニングする方法を含む。特定の態様において、更にこの方法は、20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列と相互作用する分子を精製する工程を含む。また、好ましい態様においては、20P1F12/TMPRSS2アミノ酸配列をペプチドのライブラリーと接触させる。

10

#### 【0229】

##### キット

本発明は、更に上に記載または提案した診断的及び治療的応用のためのキットを提供する。このようなキットは、閉ざされた場所に一つ以上の容器の手段、例えば、バイアル、チューブ等を受け入るための区画化された収容手段からなってもよく、それぞれの容器の手段がこの方法において使用される別々の要素の内のいずれかを含む。例えば、容器の手段の内の一つは、20P1F12/TMPRSS2タンパク質をコードするベクターを含んでもよい。また、容器の手段の内の一つは、検出可能なように標識した、あるいは、標識できるプローブを含んでもよい。このようなプローブは、20P1F12/TMPRSS2タンパク質に特異的な抗体（例えば、ELISAアッセイ法に使用するもの）、または20P1F12/TMPRSS2タンパク質または遺伝子/mRNAに特異的なポリヌクレオチドであってよい。このキットが核酸ハイブリダイゼーションを利用して標的核酸を検出する場合、そのキットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチドの入っている容器、及び/またはレポーターの手段、例えば、アビジンまたはストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質が、酵素、蛍光、または放射性同位元素標識等のレポーター分子に結合したものを含む容器も有してよい。

20

#### 【0230】

本発明のキットの特徴としては、上記の容器、及び商業的及び使用者の立場において望ましい物質、例えば、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、注射器、及び添付の使用説明書を含む一つ以上の他の容器を含む。組成物が特定の治療的、または非治療的用途に使用されることを表示するため、更に、生体内または体外における使用方法、例えば上記のようなものを表示するためにラベルが容器に存在してもよい。

30

#### 【0231】

##### 実施例

実施例1：SSHクローン化および発現解析による、20P1F12/TMPRSS2遺伝子に相当するcDNAの単離

##### 材料および方法

##### 細胞株およびヒト組織

本研究において使用される全てのヒト癌細胞株はATCCから取得した。全ての細胞株は10%ウシ胎児血清を有するDMEM中で維持した。PrEC（初代前立腺表皮細胞）はクロンテックス（Clonetics）から取得し、そして増殖因子（クロンテックス）を補ったPrEBM培地中で増殖させた。

40

#### 【0232】

全てのヒト前立腺癌異種移植片は元々はCharles Sawyers（UCLA）（Kleinら、1997；Craftら、Cancer Res. 1999 Oct 1；59（19）：5030～6）により提供された。LAPC-4 ADおよびLAPC-9 AD異種移植片は、宿主SCID雄中で小さな組織塊として定型的に継代した。LAPC-4 AIおよびLAPC-9 AI異種移植片は以前に記載されているように由来しており（Kleinら、1997；Craftら、Cancer Res. 1999 Oct 1；59（19）：5030～6）、そして去勢雌または雌SCIDマウス中で継代した。

50

## 【 0 2 3 3 】

RNAおよびタンパク質解析のためのヒト組織は、UCLA（ロサンジェルス、カリフォルニア州）ヒト組織資源センター（HTRC）から、およびクオルテック社（QualTek, Inc）（サンタバーバラ、カリフォルニア州）から取得した。良性前立腺肥大組織試料は患者由来であった。

## 【 0 2 3 4 】

RNA単離

腫瘍組織および細胞株は、総RNAを単離するために、10ml/g組織または10ml/10<sup>8</sup>細胞を用いて、トリゾール（Trizol）試薬（ライフテクノロジー（Life Technologies）、ギブコBRL）中でホモジナイズした。ポリA RNAは、キアゲンのオリゴテックス（Oligotex）mRNAミニおよびミディ（Midi）キットを用いて総RNAから精製した。総およびmRNAは分光光度計解析（O.D. 260/280nm）により定量し、そしてゲル電気泳動により解析した。

## 【 0 2 3 5 】

オリゴヌクレオチド

以下のHPLC精製オリゴヌクレオチドを使用した。

RSACDN (cDNA 合成プライマー):

5'TTTTGTACAAGCTT<sub>30</sub>3' ( 配列番号 :6)

アダプター1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT3' ( 配列番号 :7)

3'GGCCCGTCCA5' ( 配列番号 :14)

アダプター2:

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT3' ( 配列番号 :8)

3'CGGCTCCA5' ( 配列番号 :15)

PCR プライマー1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3' ( 配列番号 :9)

ネステッドプライマー(NP)1:

5'TCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT3 ( 配列番号 :10)

ネステッドプライマー(NP)2:

5'AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT3' ( 配列番号 :11)

## 【 0 2 3 6 】

サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション (Suppression Subtractive Hybridization)

サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション（SSH）は、良性前立腺肥大と比較してアンドロゲン依存性前立腺癌において増加調節されうる遺伝子に相当するcDNAを同定するために使用された。

## 【 0 2 3 7 】

LAPC-4 AD異種移植片（テスター）およびBPH組織（テスター）に相当する二本鎖cDNAは、クロンテック（Clontech）のPCRセレクトcDNAサブトラクションキットおよび1ngのオリゴヌクレオチドRSACDNをプライマーとして用いて、上述のように、異種移植片およびBPH組織から単離した2μgのポリ(A)<sup>+</sup>RNAから合成した。第一および第二鎖合成はキットの使用者マニュアルプロトコール（クロンテックプロトコール番号第PT1117-1、カタログ番号K1804-1）に記載されているように実施した。結果として生じるcDNAはRsaIを用いて37で3時間消化した。消化されたcDNAはフェノール/クロロホルム（1:1）を用いて抽出し、そしてエタノール沈殿した。

10

20

30

40

50

## 【0238】

ドライバーcDNA (BPH) は、マウス遺伝子がテスターcDNA (LAPC-4 AD) からサブトラクションされることを確実にするために、RsaI消化BPH cDNAをマウス肝臓由来の消化されたcDNAと4:1の比で組み合わせることにより生成した。

## 【0239】

テスターcDNA (LAPC-4 AD) は、1  $\mu$ lのRsaI消化LAPC-4 AD cDNA (400ng) を5  $\mu$ lの水中に希釈することにより生成した。消化cDNA (2  $\mu$ l、160ng) はその後、400単位のT4DNAリガーゼ (クロンテック) を用いて総容量10  $\mu$ l中で16  $^{\circ}$ Cにて一晩、2  $\mu$ lのアダプター1およびアダプター2 (10  $\mu$ M) の別々のライゲーション反応においてライゲーションした。ライゲーションは1  $\mu$ lの0.2M EDTAおよび72  $^{\circ}$ C 5分間の加熱を用いて終了した。

10

## 【0240】

最初のハイブリダイゼーションは、1.5  $\mu$ l (20ng) のアダプター1およびアダプター2がライゲーションしたテスターcDNAを含む2個のチューブの各々に、1.5  $\mu$ l (600ng) のドライバーcDNAを添加することにより実施した。最終容量4  $\mu$ l中において、試料は鉱物油で重層し、MJリサーチサーマルサイクラーにおいて98  $^{\circ}$ Cで1.5分間変性し、そしてその後68  $^{\circ}$ C 8時間ハイブリダイゼーションした。2個のハイブリダイゼーションはその後、付加的な1  $\mu$ lの新たに変性したドライバーcDNAと共に混合し、そして68  $^{\circ}$ C一晩ハイブリダイゼーションした。2番目のハイブリダイゼーションはその後、20mMヘペスpH8.3、50mM NaCl、0.2mM EDTAの200  $\mu$ l中に希釈し、70  $^{\circ}$ Cで7分間加熱し、そして-20  $^{\circ}$ Cにて保存した。

20

## 【0241】

SSHから生成された遺伝子断片のPCR増幅、クローン化および配列決定

SSH反応から生じる遺伝子断片を増幅するために、2個のPCR増幅を実施した。最初のPCR反応においては、希釈した最終ハイブリダイゼーション混合物1  $\mu$ lを、PCRプライマー1 (10  $\mu$ M)、0.5  $\mu$ lのdNTP混合物 (10  $\mu$ M)、2.5  $\mu$ lの10x反応緩衝液 (クロンテック) および0.5  $\mu$ lの50xアドバンテージcDNAポリメラーゼ混合物 (クロンテック) 1  $\mu$ lに添加し、最終容量を25  $\mu$ lとした。PCR1は以下の条件を用いて実施した: 75  $^{\circ}$ Cで5分間、94  $^{\circ}$ Cで25秒間、その後94  $^{\circ}$ Cで10秒、66  $^{\circ}$ Cで30秒、72  $^{\circ}$ Cで1.5分を27サイクル。5個の別々の一次PCR反応を各実験に関して実施した。産物はプールし、そして水で1:10に希釈した。2番目のPCR反応に関しては、プールされて希釈された一次PCR反応に由来する1  $\mu$ lを、PCRプライマー1の代わりにプライマーNP1およびNP2 (10  $\mu$ M) が使用される以外はPCR1で使用したのと同じの反応混合物に添加した。PCR2は94  $^{\circ}$ Cで10秒、68  $^{\circ}$ Cで30秒、72  $^{\circ}$ Cで1.5分を10~12サイクル用いて実施した。PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。

30

## 【0242】

PCR産物はT/Aベクタークローニングキット (インビトロゲン) を用いてpCR2.1に挿入した。形質転換された大腸菌は青/白およびアンピシリン選択に供した。白色コロニーを選択し、そして96ウェルプレート中に配置し、そして液体培養中で一晩増殖した。インサートを同定するために、PCR1の条件および、プライマーとしてNP1およびNP2を用いて、細菌培養物1mlに関してPCRを実施した。PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。

40

## 【0243】

細菌クローンは96ウェル形式において20%グリセロール中に保存した。プラスミドDNAは調製し、配列決定し、そしてゲンバンク、dBestおよびNCI-CGAPデータベースの核酸相同性検索に供した。

## 【0244】

RT-PCR発現解析

第一鎖cDNAは、ギブコBRLスーパークリプト前増幅 (Pre-amplification) システムを用いるオリゴ (dT) 12-18プライミングを使用して、1  $\mu$ gのmRNAから生成した。製造元のプロトコルを使用し、そして逆転写酵素を用いる42  $^{\circ}$ Cでの50分間のインキュベーション、および続けて37  $^{\circ}$ Cでの20分間のRNAseH処理が含まれた。反応完了後、標準化の前に水を用いて容量を200  $\mu$ lに増加した。16個の異なる正常ヒト組織由来の第一鎖cDNAはクロンテ

50

ックから取得した。

【0245】

多数の組織由来の第一鎖cDNAの標準化は、アクチンを増幅するためのプライマー

5'ATATCGCCGCGCTCGTCTCGACAA3' (配列番号 :28) および

5'AGCCACACGCAGCTCATTGTAGAAGG3' (配列番号 :29)

を用いて実施した。第一鎖cDNA (5 µl) は、0.4 µMプライマー、0.2 µMの各dNTP、1XPCR緩衝液 (クロンテック、10mMトリス塩酸、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>、50mMのKCl、pH8.3) および1Xクレンタック (Klentaq) DNAポリメラーゼ (クロンテック) を含む総容量50 µl中で増幅した。5 µlのPCR反応物を18、20および22サイクル時において採取し、そしてアガロースゲル電気泳動に使用した。PCRはMJリサーチサーマルサイクラーを用いて以下の条件下で実施した：最初の変性は94 で15秒間、続いて94 で15秒、65 で2分、72 で5秒を18、20および22サイクル。72 での最終の伸長は2分間実施した。アガロースゲル電気泳動後、多数の組織由来の283bpのアクチンバンドのバンド強度を目視検査により比較した。第一鎖cDNAの希釈係数は、22サイクルのPCR後に全ての組織において同一のアクチンバンド強度を結果生じるように計算された。22サイクルのPCR後に全ての組織において同一のバンド強度を達成するためには3ラウンドの標準化が必要とされた。

10

【0246】

20P1F12遺伝子の発現レベルを決定するために、5 µlの標準化第一鎖cDNAが、MITの支援を受けて設計された (詳細は、www.genome.wi.mit.eduを参照)。以下のプライマーを用いて25、30および35サイクルの増幅のPCRにより解析した。

20

5' AGT CTT CCT GCT GAG TCC TTT CC 3' (配列番号 :12)

5' CAA GGG CAC TGT CTA TAT TCT CAC C 3' (配列番号 :13)

【0247】

半定量発現解析は、薄いバンド強度を与えるサイクル数においてPCR産物を比較することにより達成された。

【0248】

結果

いくつかのSSH実験が、材料および方法、前記において記載されているように実施され、そして多数の候補遺伝子断片クローンの単離につながった。全ての候補クローンは、相当する遺伝子の同一性に関する情報を提供する、および差別的発現に関して特定の遺伝子を解析する決定を導き出すことを支援するために、配列決定され、そして主要な公共遺伝子およびESTデータベース中の全配列に対して相同性解析に供された。

30

【0249】

20P1F12と名づけられた、cDNAクローンの1つは、最近記載されたセリンプロテアーゼ<sup>TM</sup> PRSS2と同一性を示した (Paoloni-Giacobinoら、1997、Genomics 44 : 309 ~ 320)。単離された20P1F12のcDNA断片は388bpの長さであり、そして図4に示されるヌクレオチド配列を有している。RT-PCRによる差別的発現解析は、20P1F12遺伝子が正常前立腺およびLAPC-4およびLAPC-9異種移植片においておよそ同レベルで発現していることを示した (図5、パネルA)。16個の正常組織由来の第一鎖cDNAのさらなるRT-PCR発現解析は前立腺において最大レベルの20P1F12発現を示した。かなり低いレベルの発現がいくつかの他の正常組織において観察された (すなわち、大腸、膵臓、腎臓、肝臓および肺) (図5、パネルBおよびC)。

40

【0250】

実施例2：20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現のノーザンプロット分析

標識化20P1F12/TMPRSS2プローブ (図4の20P1F12 SSH cDNAに相当する) を用いた16個の正常ヒト組織パネルのノーザンプロット分析を、最初にRT-PCR発現解析により確立された20P1F12/TMPRSS2発現の前立腺特異性を確認するために実施した。図6に示されている結果は、RT-PCR解析を確認および発展させ、そして前立腺における発現が、肺、腎臓、膵臓または大腸における発現よりも大きいので、相対的に前立腺特異的であることを示している

50

。このパネルにおいて使用される他の11個の正常組織の任意のものにおいて検出可能な発現は観察されなかった。

#### 【0251】

加えて、LAPC-4およびLAPC-9異種移植片における20P1F12/TMPRSS2発現レベルもまたノーザンブロット分析により検討した。ノーザンブロッティングは、ランダムヘキサマー（ベーリンガーマンハイム）標識された20P1F12/TMPRSS2 cDNAを用いて、細胞株およびLAPC異種移植片から調製した10 μgの総RNAに関して実施した。図6および7に示されている結果は、LAPC-9 AI異種移植片においてより低いレベルの発現が見られ、異種移植片および正常組織においては類似の発現レベルを示す。癌細胞の大きなパネルの20P1F12/TMPRSS2発現の更なるノーザンブロット分析は以下の実施例4に記載されている。

10

#### 【0252】

##### 実施例3：全長20P1F12 cDNAのクローン化

20P1F12/TMPRSS2遺伝子をコードする全長cDNAがヒト前立腺ライブラリーから単離され、そして20P1F12-GTC1と名づけられた。20P1F12-GTC1のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は図1に示されている。プラスミド20P1F12-GTC1（20P1F12-GTC1 cDNAを保持している）は1999年2月12日にATCC（マナッサス（Manassas）、バージニア州）に寄託され、そしてATCC命名番号207097が与えられた。約3.5kbの20P1F12-GTC1 cDNAは、完全にではないが、以前に記載された配列とほとんど同一の492アミノ酸のタンパク質をコードする（図2）。発表されているTMPRSS2配列と比較して、20P1F12-GTC1 cDNAのヌクレオチド配列にはいくつかの差異が存在し、図3のアミノ酸アライメントに示されているように、その中の6個は異なるアミノ酸をコードする結果となる。具体的には、アミノ酸差異の4個はプロテアーゼドメインに存在し、そのうちの3個はプロテアーゼ機能および/または特異性に影響を与える可能性がある非保存的アミノ酸差異である。配列の詳細な検査は、以前に発表された配列と比較して、160位、242位、329位、449位、489位および491位の部位において6個のアミノ酸差異を生じる結果となるヌクレオチド配列における8個の差異を示す。6個の差異全ては、付加的な20P1F12/TMPRSS2 cDNAクローン、および正常前立腺、LAPC-4およびLAPC-9 cDNAライブラリーに由来する遺伝子断片を配列決定することにより確認した。これらの差異は全て膜関連ドメインに生じており、そのうちの2個（160位および242位のアミノ酸）はスカベンジャー受容体システインリッチ（SRCR）ドメインに存在し、一方他のものは全てプロテアーゼドメイン内に存在する。これらのアミノ酸配列差異が生物学的活性にどのように影響を与えるかは不明である。しかしながら、20P1F12/TMPRSS2およびTMPRSS2が、正常ヒト組織における発散したmRNA発現パターンを示す申請者のデータの見地からは差異的に発現している可能性はある。

20

30

#### 【0253】

##### 実施例4：前立腺および大腸癌における20P1F12/TMPRSS2の発現

癌組織および細胞株における20P1F12/TMPRSS2の発現を解析するために、ノーザンブロッティングをLAPC異種移植片および前立腺および非前立腺癌細胞株のパネルに由来するRNAに関して実施した。結果は、全てのLAPC異種移植片および大腸癌細胞株において20P1F12/TMPRSS2の高い発現レベルを示す（図7）。類似した発現レベルは、前立腺、LAPC-4 AD、LAPC-4 AI、LAPC-9 ADおよびLNCaPにおいて検出された。より低いレベルの20P1F12/TMPRSS2がLAPC-9 AIおよびAI PC-3細胞で見られ、DU145においては発現が見られなかった。高いレベルの20P1F12/TMPRSS2発現はまた、LoVo、T84およびCoLo-205を含む4個の大腸癌細胞株のうち3個においても検出された。

40

#### 【0254】

上記のように、20P1F12/TMPRSS2に関する最初の報告（Paoloni-Giacobinoら、1997、Genomics 44：309～320）は本明細書において開示されている20P1F12/TMPRSS2に非常に関連しているが、しかし構造的に異なるタンパク質をコードするcDNAを同定した。さらに、Paoloni-Giacobinoらにより開示されたTMPRSS2遺伝子はまた、20P1F12/TMPRSS2の発現プロファイルと比較して非常に異なる発現パターンを示した。しかしながら、最近、20P1F12/TMPRSS2配列および様々な組織における発現パターンの両方に関してこのデータを確認す

50

る2番目の報告が刊行された (Linら、1999 Cancer Res . Sep 1 ; 59 ( 17 ) : 4180 ~ 4 ) 。

【 0 2 5 5 】

#### 実施例5：20P1F12/TMPRSS2タンパク質の特性化

##### 20P1F12/TMPRSS2モノクローナル抗体の生成

TMPRSS2は前立腺および大腸癌の潜在的な治療標的を表している。分泌型プロテアーゼ断片ならびに細胞表面関連抗原として、それは抗体治療の特に良い標的でありうる。この可能性を探索し、そしてさらに20P1F12/TMPRSS2タンパク質を特性化するために、GST-20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質に対するモノクローナル抗体が生成された。具体的にはマウスMAbは、細菌グルタチオン-S-トランスフェラーゼ ( GST ) に融合したプロテアーゼのカルボキシル末端領域 ( 残基362 ~ 440 ) に対して生成された。GST融合タンパク質は、20P1F12/TMPRSS2配列を増幅するために以下のプライマーを用いてPCRにより生成された。

5'-TTGAATTCCAAACCAGTGTGTCTGCCC-3' ( 配列番号 : 16),

5'-AAGCTCGAGTCGTCACCCTGGCAAGAAT-3' ( 配列番号 : 17)

PCR産物はEcoRIおよびXhoIクローン化部位を用いてpGEX-4T-3に挿入した。GST融合タンパク質は精製し、そしてマウスを免疫するために使用した。免疫原はプロテアーゼドメイン内の約8kD領域、具体的には362位から440位のアミノ酸残基を含んでいた ( 図1を参照 ) 。

【 0 2 5 6 】

マウスは精製されたGST-TMPRSS2を用いて免疫され、そしてハイブリドーマが生成された。ハイブリドーマ上清は、20P1F12/TMPRSS2をトランスフェクションした293T細胞由来の溶解物を用いてウエスタンブロッティングにより、特異的抗体に関してスクリーニングされた。1,205ウェルが3~5ウェルのプールおよびマルチレーンウエスタン器具を用いたウエスタンブロットによりスクリーニングされた ( 全てのレーンは、GST融合タンパク質および切断産物に関してELISAにより陽性であった ) 。サブクローンは限界希釈クローン化およびウエスタンブロットによるスクリーニングにより導き出した。7個のハイブリドーマがウエスタンブロッティングにより20P1F12/TMPRSS2を特異的に認識することが同定され、そして1F9 ( IgG1、K ) 、 2D10 ( IgG1、K ) 、 2F8 ( IgG1、K ) 、 6B11 ( IgG1、K ) 、 3G3 ( IgG1、K ) 、 8C6 ( IgG1、K ) および9G8 ( IgG2a、K ) と名づけられた。ある一つのクローン1F9を全ての研究において引き続き使用した。組織、異種移植片および癌細胞株の溶解物のウエスタンブロッティングを20 μgの細胞溶解物タンパク質に関して実施した。抽出物の標準化は、細胞溶解物を抗GRB-2抗体 ( トランスダクションラボラトリーズ ) を用いて調査することにより、または膜のボンソーS染色によりレーンの総タンパク質量を可視化することにより達成された。

【 0 2 5 7 】

##### 抗TMPRSS2 mAbのエピトープマッピング

エピトープマッピング研究に関して、抗TMPRSS2 mAbの1F9、2F8および8C6が、製造元のプロトコールにしたがって「EZ-link」スルフォ-NHS-LC-ビオチン化キット ( ピアス、ロックフォード、イリノイ州 ) を用いて抗体分子当たり約4~7分子のビオチンで、ビオチン化された。これらのビオチン化抗体は、標的抗原としてGST-TMPRSS2プロテアーゼドメイン ( アミノ酸255 ~ 492 ) を用いて、他の7個の非標識抗TMPRSS2抗体 ( 1F9、2D10、2F8、3G3、6B11、8C6、および9G8 ) の各々の50倍過剰の存在および非存在下で、競合ELISAにおいて使用した。ELISAプレートは100ng/ウェルのGST-TMPRSS2プロテアーゼドメインを用いてコーティングし、そして3%ミルクを含むPBSを用いてブロッキングした。プレートはその後過剰の非標識mAb ( 12.5 μg/ml ) 存在または非存在で室温 ( RT ) にて1時間インキュベーションした。プレートは洗浄し、そしてその後250ng/mlのビオチン下2F8または8C6 mAbのいずれか、または100ng/mlの1F9 mAbとともにRTで1.5時間インキュベーションした。プレートは洗浄し、そしてその後1 : 2000希釈のアビジン-HRP結合物 ( ニュートラライト、フィッシャーサイエンティフィック ) とともに1時間インキュベーションした。プレートは洗浄し、TMB基質を用いて現像し、1MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いて中和し、そしてウェルのODを450nmにおいて取得した。

10

20

30

40

50

## 【0258】

下の表2はこれらのエピトープマッピング研究の結果を提供する。表2のデータは2回の決定の平均±範囲である。1F9-B、2F8-B、8C6-BはmAbのビオチン化型である。表2において、ビオチン化Abの結合に関して競合する非標識mAbは太字で示されている。

## 【0259】

上記の抗体は20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドを解析および特性化するために有用である。約54(20P1F12/TMPRSS2の予測分子量(MW))および約32キロダルトンの2個の主要なタンパク質バンドが、20P1F12/TMPRSS2 cDNAおよび1F9を用いたインビトロ翻訳アッセイにおいて同定されている。LNCaP、LAPC-4およびLAPC-9の細胞溶解物のウエスタンブロットリングは約70および32キロダルトン(kD)の2個の主要なタンパク質バンドを同定する(図8b)。ウエスタンブロットタンパク質バンドの分子量は、目盛りとしての前染色分子量マーカー(パイオラッド)とともにアルファイース(AlphaEase)イメージ解析ソフトウェア(アルファイノテック(Alpha Innotech)社、サンレアンドロ、カリフォルニア州)の分子量計算機能を用いて決定された。20P1F12/TMPRSS2の予測分子量(MW)が54kDであるので、このデータは70kDアイソフォームは、おそらくはグリコシル化により修飾されていることを示唆する。32kD型は、抗体により認識されるカルボキシル末端エピトープを含む、タンパク質分解により切断された断片である。

10

## 【0260】

付加的な20P1F12/TMPRSS2 mAbを、細胞ベースのELISA用のスクリーニング薬剤として20P1F12/TMPRSS2を発現するLAPC-9細胞を用いて細胞ベースで免疫することにより生成してもよい。加えて、20P1F12/TMPRSS2 mAbは、分泌型プロテアーゼドメイン断片などの精製された20P1F12/TMPRSS2タンパク質を免疫原として用いて生成してもよい。例えば、アミノ末端にHisタグを有する組換え20P1F12/TMPRSS2をpBlueBac4.5(インビトロゲン)を用いてバキュロウイルスシステム中で発現させてもよい。Hisタグ付き20P1F12/TMPRSS2はその後、ニッケルカラムを用いて精製し、定量し、そして免疫原として使用してもよい。または20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼドメインは、本明細書に記載されている1F9抗体などの抗20P1F12/TMPRSS2抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーを用いて生物学的試料(例えば精漿)から精製してもよい。モノクロナールのスクリーニングは、例えば、LNCaPおよびPC-3/TMPRSS2細胞などの細胞ベースのELISAを用いて実施してもよい。

20

## 【0261】

組織染色

ホルマリン固定、パラフィン包埋組織の1F9 MAbを用いた免疫組織化学解析を4ミクロンの組織切片に関して実施した。クエン酸ナトリウム(10mM、pH6.0)中での水蒸気処理の後、スライドは10 µg/mlの1F9 MAbとともにインキュベーションし、続いてビオチン化ウサギ抗マウスIgGとともにインキュベーションした。競合的阻害研究は50 µg/mlのGSTまたはGST-20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質存在下で実施した。反応物はアビジン結合ホースラディッシュペルオキシダーゼ(ベクターラボ(Vector Labs)、バーリングアム(Burlingame)、カリフォルニア州)を用いて可視化された。

30

## 【0262】

細胞局在

20P1F12/TMPRSS2タンパク質の特性を研究するために、20P1F12 cDNA(図1)を、カルボキシル末端に6-Hisタグを提供するpcDNA3.1 Myc-His(インビトロゲン)にクローン化した。構築物は293T細胞にトランスフェクションし、そして細胞表面ビオチン化により解析した。ビオチン化細胞表面タンパク質はストレプトアビジンセファロースを用いて親和性精製した。ストレプトアビジン親和性精製されたタンパク質の抗His抗体を用いたウエスタンブロット分析により、様々な生物学的試料中に20P1F12/TMPRSS2タンパク質が存在することが証明された(例えば、図9Aおよび図23を参照)。したがって、20P1F12/TMPRSS2は、分泌型細胞ならびに細胞表面の両方において見出されうる。

40

## 【0263】

LNCaPおよびPC-3前立腺癌細胞における表面局在型の内在性20P1F12/TMPRSS2を検討する

50

ために、ビオチン化細胞表面タンパク質をストレプトアビジンセファロースを用いて親和性精製し、そして抗20P1F12/TMPRSS2抗体を用いて検査した。ストレプトアビジン精製されたタンパク質のウエスタンブロッティングは、32および70kDタンパク質バンドとして現れる、LNCaPおよびPC-3両細胞中の内在性20P1F12/TMPRSS2の細胞表面ビオチン化を示唆する(図9b)。付加的な対照においては、20P1F12/TMPRSS2タンパク質は非ビオチン化細胞由来のストレプトアビジン沈殿物においては検出されなかった(図8b)。

#### 【0264】

興味深いことに、カルボキシル末端Hisタグ付きの20P1F12/TMPRSS2をトランスフェクションした293T細胞は主に70kDのタンパク質を発現する(図9a)。20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼドメインはカルボキシル末端に位置するので、32kDは自己触媒切断の結果であり(以下の実施例10を参照)、Hisタグにより阻害されている可能性が高い。関連分子ヘプシン(hepsin)(TMPRSS1)は濃度依存性様式において自己活性化能を有するようである(Vuら、1997、j. Biol. Chem. 272:31315~31320)。この自己触媒切断は20P1F12/TMPRSS2活性を阻害する低分子を同定するために利用されてもよい。切断阻害を特異的にみるために細胞は低分子阻害剤の存在または非存在で増殖させてもよい。上記で議論されているように、そのような低分子は癌治療薬として利用されうる。

10

#### 【0265】

##### 20P1F12/TMPRSS2のグリコシル化

20P1F12/TMPRSS2の予測MWはウエスタンブロッティングにより検出される見かけのMWより有意に小さい。これは20P1F12/TMPRSS2がグリコシル化されている可能性を示唆する。GTC1配列は、コンセンサス配列NXS/Tを有する3個の潜在的なグリコシル化部位が存在することを示している(128、213、249位の残基)。20P1F12/TMPRSS2がグリコシル化されている可能性を探索するために、Hisタグ付き20P1F12/TMPRSS2を293T細胞にトランスフェクションし、そしてニッケルアガロース(インビトロゲン)を用いて精製した。親和性精製タンパク質は50mM EDTA、pH8.0を用いて溶出し、そして製造元のプロトコールにしたがってN-グリコシダーゼ-F(ベーリンガーマンハイム)を用いて、脱グリコシル化した。非処理および脱グリコシル化されたタンパク質は抗His抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。結果は、N-グリコシダーゼ-F処理を用いて20P1F12/TMPRSS2の5~8kDのMWシフトを示す、これは20P1F12/TMPRSS2が実際にグリコシル化されたタンパク質であることを示している。脱グリコシル化された20P1F12/TMPRSS2は依然として予測サイズよりも少なくとも5~10kD大きいMWを示しており、これは脱グリコシル化反応が完全ではないか(またはそのグリコシル化がO結合型である)、または20P1F12/TMPRSS2が付加的な翻訳後修飾(例えばリン酸化、硫酸化など)を示すかもしれないかのいずれかを示している。

20

30

#### 【0266】

##### アンドロゲン制御

ノーザンブロッティングは、20P1F12/TMPRSS2の発現が、アンドロゲン非依存性LAPC-9異種移植片およびアンドロゲン非依存性細胞株PC-3およびDU145において減少しているように示しており(図6)、これは20P1F12/TMPRSS2がアンドロゲン制御される遺伝子である可能性を示している。この可能性を探索するために、アンドロゲン依存性の十分なレベルの20P1F12/TMPRSS2を発現するLNCaP細胞を、2%のチャコール除去したウシ胎児血清(FBS)を含む培地中でそれらを増殖させることにより、1週間アンドロゲンを欠乏させた。細胞はその後、様々な時間点で、合成アンドロゲン類似体であるミボレロンを用いて刺激した。細胞はRNAおよびノーザンブロッティングのために回収した。ローディング対照として、同一プロットをアクチンを用いて検査した。結果(図11)は、アンドロゲン欠乏の間の20P1F12/TMPRSS2の明確な発現減少を示す(図11)。ミボレロン添加は20P1F12/TMPRSS2発現を有意に増加させ、それがアンドロゲン応答性遺伝子であることを示している。同一試料中の前立腺特異的抗原(PSA)の発現を、アンドロゲン制御の陽性対照としてモニターした(図11)。

40

#### 【0267】

20P1F12/TMPRSS2誘導の最適時間を決定するために、アンドロゲン欠乏細胞は様々な時

50

間点でミボレロンを用いて刺激した。ノーザンおよびウエスタンブロッティングを実施するために、それぞれRNAおよびタンパク質単離用に細胞を回収した。結果(図12)は、20P1F12/TMPRSS2メッセージの誘導は刺激3時間以内であり、そしてホルモン添加後24時間を通じて増加したことを示した。加えて、20P1F12/TMPRSS2発現はLAPC-4異種移植片においてはわずかに減少するようである。

#### 【0268】

タンパク質レベルを解析するために、1F9 mAbを用いた細胞溶解物のウエスタンブロッティングを実施した。20P1F12/TMPRSS2発現の付加的対照は、neoまたは20P1F12/TMPRSS2のいずれかをコードするレトロウイルスを感染させたPC-3細胞を含んだ。感染PC-3細胞はG418中で2~3週間選択し、そしてウエスタンブロッティングのために回収した。結果は、20P1F12/TMPRSS2ウイルス感染細胞においては20P1F12/TMPRSS2の発現を示し、そしてneo細胞においては20P1F12/TMPRSS2の検出可能な発現を示さなかった。

10

#### 【0269】

アンドロゲン欠乏LNCaP細胞を見ると、20P1F12/TMPRSS2の発現は依然として検出可能であるが、アンドロゲン刺激細胞と比較すると、明らかに減少していた。しかしながら、誘導された発現の最初の時間点は刺激9時間後に現れており、20P1F12/TMPRSS2のタンパク質発現はRNA誘導に遅れることを示している(図12)。さらに、図21は、アンドロゲン誘導および32kD自己タンパク質分解断片のLAPC-4およびLNCaP細胞上清への放出、および新規の103kD抗TMPRSS2免疫応答性タンパク質複合体の出現を示している。

20

#### 【0270】

これらの結果は、20P1F12/TMPRSS2が、PSAおよびhK2(Youngら、1995、J. Androl. 16:97)などの他の前立腺特異的プロテアーゼと類似して、アンドロゲン制御される遺伝子であることを証明している。

#### 【0271】

#### NIH3T3の形態に与える20P1F12/TMPRSS2の効果

20P1F12/TMPRSS2は前立腺特異的発現を示し、そしてアンドロゲンにより制御されるようである。異所性の非前立腺癌細胞株に20P1F12/TMPRSS2を発現させる効果を決定的ために、20P1F12/TMPRSS2レトロウイルスがNIH3T3細胞感染のために使用された。20P1F12/TMPRSS2レトロウイルスを感染された細胞の形態は、対照(neo)ウイルス感染細胞の形態と比較した。感染細胞の集団は、対照細胞と比較して、別個の空胞性の様態を示した(図13)、これは高レベルの発現と相関しているようである。この感染細胞集団を継代すると、20P1F12/TMPRSS2の明らかな発現減少と共に空胞保持細胞は徐々に減少した。

30

#### 【0272】

#### 20P1F12/TMPRSS2機能の評価

20P1F12/TMPRSS2機能は、20P1F12/TMPRSS2を発現するように設計された哺乳類細胞において評価した。この目的に関しては、20P1F12/TMPRSS2はpcDNA3.1 myc-Hisタグ(インビトロゲン)、レトロウイルスベクター-pSR tkneo(Mullerら、1991、MCB 11:1785)およびエクジソン誘導可能発現系であるpIND(インビトロゲン)を含むいくつかのベクターにクローン化した。これらの発現ベクターを用いて、20P1F12/TMPRSS2はPC-3を含むいくつかの細胞株において発現された。20P1F12/TMPRSS2の発現は、抗20P1F12/TMPRSS2抗体を用いてウエスタンおよびFACS解析によりモニターした。精製された20P1F12/TMPRSS2は基質を同定するために使用される。

40

#### 【0273】

20P1F12/TMPRSS2を発現するような哺乳類細胞株は、その後、細胞増殖、細胞接着、組織培養中の膜浸潤培養系(MICS)(Welchら、Int. J. Cancer 43:449~457)を用いての細胞膜浸を含むいくつかのインビトロ、およびSCIDマウスにおける腫瘍形成を含むインビボアッセイにおいて試験することが可能である。20P1F12/TMPRSS2細胞表現型は、20P1F12/TMPRSS2を発現しない細胞の表現型と比較される。

#### 【0274】

20P1F12/TMPRSS2の異なるドメインの機能的役割を評価するために、以下の欠失変異体

50

および点突然変異体で生成される：(i) SRCR (93アミノ酸の欠失)；(ii) LDLRA (35アミノ酸の欠失)；および(iii) 触媒三つ組の変異体：H296Q、D345NおよびS441A (単一点突然変異体)。20P1F12/TMPRSS2変異体は哺乳類細胞における発現のためにレトロウイルスベクター-pSR tkneoにクローン化した。結果として生じる変異体は異なるドメインおよび残基の重要性を導き出すために有用である (例えば下の実施例10を参照)。加えて、これらの変異体は、そのような変異体がドミナントネガティブ分子として機能するかを決定するために有用である。ドミナントネガティブ活性が、LNCaPなどの内在性20P1F12/TMPRSS2を発現する細胞において顕著であるかもしれない。ドミナントネガティブ活性は、プロテアーゼドメインを介する、またはタンパク質-タンパク質相互作用ドメイン介する、基質との相互作用のためであるかもしれない。変異体20P1F12/TMPRSS2分子は、野生型20P1F12/TMPRSS2と同一のインビトロおよびインビボアッセイ法において試験される (上を参照)。そのようなドミナントネガティブ20P1F12/TMPRSS2分子は治療上も有用であるかもしれない。例えばドミナントネガティブ20P1F12/TMPRSS2は癌細胞 (膀胱、卵巣、肺、腎臓、または大腸癌細胞、または転移性癌細胞など) に、相当するコード配列を前立腺癌細胞に送達および発現する能力がある遺伝子治療ベクターを介して導入されてもよい。

10

#### 【0275】

正常マウス組織およびトランスジェニックマウスにおける20P1F12/TMPRSS2の発現特性を決定することは、20P1F12/TMPRSS2機能に関するさらなる情報を提供する。本明細書において提供されている20P1F12/TMPRSS2配列から設計されたプローブを用いたノーザンブロットは、マウス20P1F12/TMPRSS2の発現パターンを規定するために使用されてもよい。加えて、マウス胚の発生中の20P1F12/TMPRSS2の発現が解析されうる。結果として生じるデータはマウス遺伝子をクローン化するための組織原料を同定する、およびトランスジェニックマウスノックアウト研究においてどの組織が影響をうけるであろうかを予測するであろう。

20

#### 【0276】

インビボ環境における20P1F12/TMPRSS2の生物学的役割を規定するためにトランスジェニックマウスが生成され、そして使用されてもよい。ある一つの方法においては、ヒトまたはマウス20P1F12/TMPRSS2遺伝子がトランスジェニックマウスを生成するために使用される。マウスにおける自然発生的な腫瘍形成の過剰発現が、トランスジェニックマウスを用いた研究であってもよい。別の方法においては、20P1F12/TMPRSS2遺伝子ノックアウトがマウスにおいて生成されてもよい。そのようなマウスはまた、前立腺癌の侵襲性および転移に対する影響を研究するため、そして疾患進展における変化を観察するために、TRAMPモデル (Greenbergら、1995、PNAS 92 : 3439) などの他の前立腺癌マウスモデルと交配してもよい。

30

#### 【0277】

セリンプロテアーゼ阻害剤との20P1F12/TMPRSS2機能的相互作用を試験する実験はまた、20P1F12/TMPRSS2機能に関する情報を提供するであろう。この目的に関しては、低分子阻害剤または生物学的阻害剤を用いて阻害が達成される。

#### 【0278】

実施例6：20P1F12/TMPRSS2タンパク質は組織および細胞株においてタンパク質分解により切断される

40

マウスMAbが20P1F12/TMPRSS2のプロテアーゼドメインに対して生成された。1F9 MAbを用いた293T細胞由来タンパク質抽出物のウエスタンブロッティングは、20P1F12/TMPRSS2トランスフェクション細胞においてのみ、70および32キロダルトン (kd) の見かけ上の分子量を有する2個のタンパク質種の等しい発現を示したが、対照ベクタートランスフェクション細胞においては示さなかった (図15)。20P1F12/TMPRSS2の予測分子量 (MW) は54kdであり、70kdアイソフォームがおそらくはグリコシル化により修飾されていることを示唆する。20P1F12/TMPRSS2タンパク質配列は、128、213、および249位の残基に可能性のある3つのN結合型グリコシル化部位を含んでいる。エンドグリコシダーゼF処理した20P1F12/TMPRSS2タンパク質を用いた予備研究は、タンパク質が実際にグリコシル化されているこ

50

とを示している。32kd型は、抗体により認識されるカルボキシル末端エピートープを含む、タンパク質分解により切断された断片であるかもしれない。

【0279】

ノーザンブロッティングにより様々なレベルの20P1F12/TMPRSS2を発現するヒト組織および細胞株の解析は、20P1F12/TMPRSS2トランスフェクション293T細胞におけるのと同じのタンパク質発現パターンを示した。20P1F12/TMPRSS2発現は、LAPC-4 AD、LAPC-9 ADおよびLNCaP細胞由来のタンパク質溶解物において検出されたが、しかしアンドロゲン非依存性のPC-3およびDU145細胞においては検出されなかった。マッチングした正常隣接組織を有する3個の前立腺癌標本の解析は、正常前立腺組織を含む全ての試料における20P1F12/TMPRSS2タンパク質の有意な発現を示した。高い発現は大腸癌細胞株Colo-205においても検出された(図14)。

10

【0280】

興味深いことに、図23に示されているように、28歳の事故犠牲者である男性の正常前立腺由来の全組織溶解物(パネルC)においては、20P1F12/TMPRSS2の70KDおよび32KD種の間の比は、癌に罹患している個人の前立腺由来の全組織溶解物(パネルB)において観察されるものと異なっているようであり、タンパク質分解の誘導が疾患と相関しうる証拠を提供する。

【0281】

実施例7: 20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現はアンドロゲン受容体シグナル依存性である

我々の解析は、20P1F12/TMPRSS2の発現が、アンドロゲン依存性異種移植片および細胞株と比較して、アンドロゲン非依存性LAPC-9異種移植片およびアンドロゲン非依存性細胞株PC-3およびDU145においてより低いことを示している。アンドロゲン依存性LAPC-9腫瘍を有する雄マウスは去勢により、20P1F12/TMPRSS2発現が劇的に減少する。これらの発見を発展するために、アンドロゲン依存性であり、そして十分なレベルの20P1F12/TMPRSS2を発現するLNCaP細胞を、1週間アンドロゲンを欠乏させた。アンドロゲン欠乏細胞における20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現を、ミボレロン処理細胞における発現と比較した。結果は、アンドロゲン欠乏の間20P1F12/TMPRSS2発現が有意に減少したことを示す(図16A)。ミボレロンを用いたアンドロゲン欠乏LNCaP細胞の9時間および24時間の刺激により、非処理LNCaP細胞においてみられるのと同程度の20P1F12/TMPRSS2発現の増加が生じた。PSAタンパク質レベルも平行して測定され、類似の制御が示された。

20

30

【0282】

通常はアンドロゲン受容体を発現せず(Tilleyら、1990、Cancer Res. 1990、50:5382~5386)、そしてアンドロゲン非依存性様式で増殖する、PC-3細胞は、20P1F12/TMPRSS2をほとんど発現しないか、全く発現していない。しかしながら、野生型アンドロゲン受容体を発現するように設計されたPC-3細胞は、ミボレロン処理した時、低いレベルの20P1F12/TMPRSS2発現を示す(図16A)。これは前立腺癌細胞における20P1F12/TMPRSS2発現はアンドロゲン受容体シグナル依存性であり、そしてアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞においてこの経路を回復することは20P1F12/TMPRSS2発現を再活性化することを示す。PC-3細胞におけるPSA発現もまた、アンドロゲン受容体の異所性発現および随伴的アンドロゲン刺激により誘導されうる(Daiら、1996、Steroids 61:531~539)。これらの研究は、PSAに類似して、20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現はアンドロゲン受容体経路に決定的に依存していることを証明する。

40

【0283】

実施例8: 20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼは前立腺癌細胞の培地に放出される

20P1F12/TMPRSS2の構造予測は、それがプロテアーゼドメインを有するタイプ2膜貫通タンパク質であることを示唆している。切断された32KDの20P1F12/TMPRSS2断片の大きさは、それが全プロテアーゼ領域を含むことを示唆する。このドメインの切断はしたがって、細胞外空間へのプロテアーゼの放出を結果として生じる。この仮説を試験するために、培地をアンドロゲン欠乏およびアンドロゲン刺激LNCaPおよびLAPC-4細胞から回収した。培地はその後、抗20P1F12/TMPRSS2 MAbを用いた免疫沈降法およびウエスタンブロッティング

50

グにより、20P1F12/TMPRSS2タンパク質の存在が解析された。結果は、アンドロゲン刺激細胞の培地において、しかしアンドロゲン欠乏細胞においてはそうではない、切断された20P1F12/TMPRSS2タンパク質の明らかな検出を示す(図16B)。培地中に存在するプロテアーゼの量は、細胞抽出物中に存在する20P1F12/TMPRSS2タンパク質の量に直接的に相関しており、ミボレロンの用量増加と共に増加する(図16B)。分泌された20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼはLNCaP細胞を保持するマウスの血清においてもまた検出される。

【0284】

実施例9：20P1F12/TMPRSS2は前立腺および大腸癌細胞の分泌表皮において発現している

前立腺癌生検および手術試料における20P1F12/TMPRSS2の発現が免疫組織化学解析により検討された。20P1F12/TMPRSS2タンパク質の特異的染色は、1週間アンドロゲンを欠乏させ、そしてその後非処理で放置させたか、またはミボレロンで9時間刺激させたかのいずれかのLNCaP細胞を用いて確認された。細胞はその後固定し、パラフィン中に包埋し、そして1F9抗20P1F12/TMPRSS2抗体を用いて染色した。アンドロゲン欠乏LNCaPの20P1F12/TMPRSS2染色では、ほとんど染色されない細胞が示された。対照的に、アンドロゲン刺激細胞の大部分では、強い細胞内染色が示された(図17A、B)。定常培地において増殖するLNCaP細胞はアンドロゲン刺激細胞と類似した染色を示した。出現した染色の大部分は細胞内の顆粒状構造に局在した。

【0285】

20個の臨床標本の解析は、試験した全ての正常前立腺、PINおよび前立腺癌試料の腺上皮において中度から強度の染色を示した(以下の図17CおよびD、および表1)。シグナルは分泌細胞の頂点側において最強のようであり、そしていくつかの事例においてはLNCaP細胞において観察されたように顆粒状染色が見られた。GST単独ではできなかったが、GST-20P1F12/TMPRSS2免疫原が競合的に前立腺癌組織の染色を阻害することができたので、前立腺組織染色は特異的であった。PSAに類似して、20P1F12/TMPRSS2タンパク質は表皮腺の内腔内に集積していることが見出され(図17E、F)、20P1F12/TMPRSS2タンパク質が分泌上皮により分泌されていることを示している。

【0286】

検査された正常前立腺試料の基底細胞層においてはタンパク質発現は検出されなかった。この染色パターンは、主に正常前立腺の腺の基底細胞層における20P1F12/TMPRSS2 RNAの発現を示した、RNAインサイチュウハイブリダイゼーション解析とは対照的である(Linら、1999)。

【0287】

いくつかの非前立腺組織の解析は、いくらかの20P1F12/TMPRSS2メッセージを発現する腎臓、肺を含む、ほとんどの組織において染色を示さなかった(表1)。タンパク質発現は、正常膵臓試料、正常大腸組織および大腸癌組織において検出された(表1)。膵臓での染色は錐体外分泌腺房細胞に局限されていた。ランゲルハンス島には染色は検出されなかった。正常大腸における染色は主として粘膜ライニングに現れた(図17G)。大腸癌における染色は一般的には正常大腸組織よりも顕著であった。20P1F12/TMPRSS2のかなりの蓄積がまた内腔側領域にも検出され(図17H)(プロテアーゼドメインに対する抗体を用いた染色により示されているように)、抗原分泌の証拠を提供している。さらに、例えば、図17Hにおいて図解されているように、癌においては、組織構築は破壊されており、それがPSAと類似の様式において、20P1F12/TMPRSS2の血流への漏出の結果となる可能性が高い。

【0288】

実施例10：20P1F12/TMPRSS2切断は自己触媒活性の結果である

20P1F12/TMPRSS2の単一点突然変異体が2段階PCR法を用いて生成された。アルギニン残基240、252および255はグルタミンに変異され、セリン441はアラニンに変異された。全長cDNAクローンを鋳型として用いて、5'-20P1F12/TMPRSS2 PCR断片が、一つの変異導入プライマー(S441A変異体に対しては(5'-GGCCCTCCAGCGTCACCC-3'(配列番号 :18)

10

20

30

40

50

、R240Qに対しては

5'-CCGCAGGCTATACATTGTAAAGAAACC-3' ( 配列番号 :19)

、R252Qに対しては

5'-TCCTGCTCTGTTGGCTTGAGTTCA-3' ( 配列番号 :20)

、およびR255Qに対しては

5'-CCCACAATCTGGCTCTGGCG-3' ( 配列番号 :21)

) および開始コドン、コザック配列、およびクローン化用のEcoRI部位を含む一つの5'特異的20P1F12/TMPRSS2プライマー

(5'-CGAATTCGCAAGATGGCTTTGAAC-3')( 配列番号 :22)

を用いて生成された。3'断片は変異導入プライマーの逆向き相補体 (S441Aに対しては

(5'-GGGTGACGCTGGAGGGCC-3')( 配列番号 :23)

、R240Qに対しては

5'-GGTTTCTTTACAATGTATAGCCTGCGG-3' ( 配列番号 :24)

、R252Qに対しては

5'-TGAAGCAAGCCAACAGAGCAGGA-3' ( 配列番号 :25)

、およびR255Qに対しては

5'-CGCCAGAGCCAGATTGTGGG-3' ( 配列番号 :26)

) および、終始コドンおよびクローン化用のXhoI部位を含む3'特異的20P1F12/TMPRSS2プライマー

(5'-CGTCTAGATTAGCCGTCTGCCCTCA-3')( 配列番号 :27)

を用いてPCRにより生成された。第2ラウンドのPCRに関しては、3'および5'断片が鋳型として使用された。最終PCR産物はEcoRIおよびXbaIを用いて消化し、そしてpSR MSV-tkNeoにクローン化した。タンパク質発現は293T細胞へのトランスフェクションの後、解析された。

#### 【 0 2 8 9 】

20P1F12/TMPRSS2は、優勢的に、タンパク質分解による切断の結果である可能性が最も高い32KDタンパク質として発現している。この切断が20P1F12/TMPRSS2の触媒活性のためかを決定するために、プロテアーゼドメインの触媒トライアドのセリン残基441がアラニンに変異された (S441A)。20P1F12/TMPRSS2変異体cDNAは293T細胞における発現のためにレトロウイルスベクターにクローン化した。野生型またはS441A変異体20P1F12/TMPRSS2のいずれかをトランスフェクションした293T細胞の細胞抽出物のウエスタンブロット分析は、野生型タンパク質とは対照的に、20P1F12/TMPRSS2 S441Aは見かけ上の分子量が70KDを有する単一のタンパク質種として出現したことを示した。興味深いことにカルボキシル末端にmyc-Hisタグを有する20P1F12/TMPRSS2もまた、いくつかの切断産物が検出されるけれども、優勢的には、全長タグ付きタンパク質の発現を示した。これは、プロテアーゼドメインのカルボキシル末端のmyc-Hisタグが、タンパク質分解による切断にいくつかの阻害活性を発揮することを示唆している (図18)。これらの実験のこれらの結果は、細胞および組織内における20P1F12/TMPRSS2のタンパク質分解による切断は自己触媒活性の結果であることを証明している。

#### 【 0 2 9 0 】

20P1F12/TMPRSS2のプロテアーゼドメインはアルギニンまたはリジン残基の後に切断活性を有するセリンプロテアーゼS1ファミリーに属する。タンパク質配列の検討は、20P1F12/TMPRSS2のプロテアーゼドメインのアミノ末端領域近くの3個のアルギニン残基の存在を明らかにする (240、252、255位のアミノ酸)。プロテアーゼドメインの実際の切断部位

10

20

30

40

50

を同定するために、3個のアルギニン残基がグルタミン残基に変異された。変異体は一過性トランスフェクションにより293T細胞において発現され、そしてウエスタンブロッティングにより解析された。R255Q変異のみが自己触媒切断を消失する結果となり、アルギニン255-イソロイシン256結合がタンパク質分解による切断部位であるとして同定された。これらの結果は図34に示されている。

#### 【0291】

##### 実施例11：異なる生物学的試料における異なる20P1F12/TMPRSS2種の観察

20P1F12/TMPRSS2タンパク質の自己触媒および32kD断片の生成が、前立腺および大腸癌において生物学的および臨床的意義を有しうることを決定するために、20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現は、ヒト臨床大腸および前立腺癌血清試料およびLNCaP前立腺癌異種移植片を保持するマウス由来の血清中でモニターされた。これらの血清試料の、抗20P1F12/TMPRSS2 1F9 mAbを用いた免疫沈降法/ウエスタン分析は、LNCaPマウス血清および前立腺および大腸癌試料において32kD切断断片の発現を証明したが、しかし解析された2個の正常男性血清試料においてはそうではなかった(図23AおよびB)。ヒト血清試料において32kD断片を表すバンドは、免疫沈降法において残る同分子量のヒト軽鎖免疫グロブリンの優勢な存在のために、LNCaP上清中の断片よりも低い分子量に泳動する。20P1F12/TMPRSS2のタンパク質分解による断片が癌には存在するが、正常血清試料には存在しないことは、20P1F12/TMPRSS2が膀胱、卵巣および肺癌および転移性癌ならびに、前立腺および大腸癌の血清診断マーカーでありうることを示唆する。LNCaP細胞の組織培養上清においてそうであるように、32kD断片が発現している血清試料において、103kDの抗20P1F12/TMPRSS2免疫応答性複合体が検出された。本明細書において提供されている開示により、32kD断片が生物学的に活性のあるセリンプロテアーゼをコードすること、および103kDの新規バンドが20P1F12/TMPRSS2の32kDプロテアーゼドメインおよび血清セリンプロテアーゼ阻害剤(セルピン(serpin))の複合体を表しうることの証拠が提供される。そのような血清複合体は、各々が血清中に、遊離型およびセルピン 1抗キモトリプシンとの複合体として存在する前立腺特異的カリクレインPSAおよびhK2に関してよく記載されている(例えば、Grauer, LSら、「前立腺癌血清におけるその前駆体型およびプロテアーゼ阻害剤との複合体としてのヒト腺カリドレイン、hK2の検出(Detection of human glandular kallidrein, hK2, as its precursor form and in complex with protease inhibitors in prostate carcinoma serum)」J. Androl. 19: 407~411, 1998; Christensson Aら、「前立腺癌の指標としての、1抗キモトリプシンと複合体形成した血清前立腺特異的抗原(Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer)」J. Urol. 150: 100~105, 1993; Clements JA. 「ヒトカリクレイン遺伝子ファミリー：発現および機能の多様性(The human kallikrein gene family: a diversity of expression and function)」Mol. Cell. Endocrinol. 99: C1~C6, 1994を参照)。興味深いことに、若い正常男性(28歳)由来の前立腺組織の20P1F12/TMPRSS2発現解析は、前立腺癌患者および細胞株由来の試料と比較して全長20P1F12/TMPRSS2の優勢な発現を示す(図23C)。この観察により、切断断片の全長20P1F12/TMPRSS2に対する相対比が、健康な前立腺および大腸組織に対して疾患では増加するかもしれないとの証拠が提供される。

#### 【0292】

前立腺特異的アンドロゲン制御セリンプロテアーゼであるPSAおよび20P1F12/TMPRSS2の類似性のために、PSAのように20P1F12/TMPRSS2の本来の機能が、精液中の分泌型セリンプロテアーゼでありうるか否かを調査した。正常精漿のウエスタン分析は、若干小さな30kD断片ならびに20P1F12/TMPRSS2の32kD切断断片の高レベルの発現を証明する(図24A)。組織溶解物中で見られるような、全長70kDの20P1F12/TMPRSS2タンパク質の検出可能な発現は精漿中には見られなかった、しかしながら20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼドメインおよび精漿セルピンの共有結合複合体を表すかもしれない90kDの新規のより高分子量の免疫応答性バンドが見られる。LNCaP上清および精漿中の20P1F12/TMPRSS2の免疫沈降法/ウエスタン分析により、両者において32kD断片の、しかし精漿(90kD)と比較して、上清を含む

血清中においては異なるより高分子量の複合体の発現が証明される。PSAは血清中で 1抗キモトリプシンと、しかし精漿中ではプロテインC阻害剤と複合体形成することが発見されている (Españaら、Thromb. Res. 64: 309~320、1991; Christenssonら、Eur. J. Biochem. 220: 45~53、1994)。103kD血清バンドおよび90kD精漿バンドが異なるセルピンの複合体を表す、およびこれらの液体中のセルピンの相対的濃度が複合体形成を支配するかもしれない点で、類似の状況が20P1F12/TMPRSS2に関しても存在するかもしれない。興味深いことに、90kDのより小さなバンドはLNCaP上清免疫沈降物においてもまた見られる (図24B)。

#### 【0293】

加えて、図26に示されているように、20P1F12/TMPRSS2の32kD切断断片の高レベルの発現が、正常大腸組織と比較して、大腸癌細胞株および大腸癌組織試料において見られる。具体的には、マッチングされた大腸癌組織または正常隣接組織 (プロットの左側) を表す臨床標本の、および大腸癌細胞株 (プロットの右側)、およびLAPC4およびLAPC9前立腺癌異種移植片の溶解物が1F9 mAbを用いた抗TMPRSS2ウエスタンプロットに供された。矢印は、32kD自己触媒断片および70kD全長20P1F12/TMPRSS2タンパク質の位置を示す。32kD断片のより高い発現が、マッチングさせた正常隣接組織におけるものよりも、大腸癌組織において見られる。同様に、大腸癌細胞株に存在する優勢な免疫応答性種はまた32kD断片である。興味深いことに、大腸試料においては全長20P1F12/TMPRSS2タンパク質の非常に低い発現しかないが、しかし32kD断片の複合体を表しうる~90kDおよび~50kDの抗TMPRSS2免疫応答性バンドの強い発現が大腸組織において存在する。

#### 【0294】

実施例12：前立腺、膀胱、卵巣、肺、腎臓または大腸癌の診断および/または治療標的として20P1F12/TMPRSS2の使用を決定するための方法論

当技術分野においてよく知られている多様な方法論が、前立腺および大腸癌の診断および/または治療標的として20P1F12/TMPRSS2の使用を検討するため、および前立腺および大腸癌患者の臨床液体において20P1F12/TMPRSS2タンパク質を特性化および定量するために使用されうる。例えば、上記の実施例5において記載されているようにmAbの既存のパネル (6個のIgG1、1個のIgG2a) を用いて、高感度補足ELISAをさらに開発することが可能である。そのようなELISAのプロトコールは例えば、「分子生物学の最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」第11章、Frederick M Ausubelら編、1995に見出すことが可能である。付加的には、上記で説明のように、例えばウエスタン戦略を用いて、異なる状況における20P1F12/TMPRSS2の発現および複合体形成を評価するために、当業者は臨床試料のスペクトルを解析することが可能である。そのようなウエスタン戦略は、例えば、「分子生物学の最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」第10章、Frederick M Ausubelら編、1995に記載されている。付加的には、当業者はELISA開発において、20P1F12/TMPRSS2結合相手と複合体を形成する抗体の潜在的な使用方法 (PSAおよび抗セルピン抗体に関して観察されるものと類似の方法) を決定することが可能である。さらには、プロテアーゼ以外のドメイン (SRCR、LDL、細胞内など) ならびにプロテアーゼドメインに対するmAbのパネルを生成することが可能である。

#### 【0295】

加えて、当技術分野においてよく知られている多様な方法論が、血清 (103kD) および精液 (90kD) 中の新規の高分子量20P1F12/TMPRSS2免疫応答性バンドを同定および特性化するために使用されうる。例えば、当業者は、20P1F12/TMPRSS2複合体形成を同定するために、血清および精液セルピンなどの20P1F12/TMPRSS2と相互作用する可能性が高い (PSAなどの類似分子の観察に基づいて) 分子の既知のパネルをスクリーニングすることが可能である。そのような候補分子はまた、1抗キモトリプシン (血清中のPSAおよびhK2の複合体)、プロテインC阻害剤 (精液中のPSAおよびhK2の複合体)、2マクログロブリン、1抗トリプシン、2抗プラスミン、抗トロンピンIIIおよび他のセルピンもまた含む。または、既知のタンパク質精製 (親和性カラムなど) および配列決定技術を用いて結合相手を単離し、そして配列決定することができる。

## 【0296】

加えて、当技術分野においてよく知られている多様な方法論が、20P1F12/TMPRSS2のタンパク質分解活性および基質特異性を同定および特性化するために使用されうる。特に、例えば20P1F12/TMPRSS2ポリペプチドのインビトロおよびインビボ腫瘍増殖に与える効果を検討するために、精製または組換え20P1F12/TMPRSS2（プロテアーゼドメイン断片ならびに全長分子の両方）を用いてプロテアーゼアッセイ法を活用することが可能である。加えて、セメノゲリン（semenogelin）IおよびII（PSAおよびhK2に標的される）、フィブロネクチン（PSAおよびhK2に標的される）、PSA（hK2に標的される）、高分子量キニノーゲン（hK1、hK2に標的される）などの潜在的なインビボ基質（それは精液中の天然標的であってもよい）、プラジキニン放出および自己触媒をアッセイすることが可能である。加えて、当技術分野における既知の方法は、蛍光ペプチド基質が切断特異性を決定するために使用することができる。

10

## 【0297】

加えて、当技術分野においてよく知られている多様な方法論が、抗20P1F12/TMPRSS2 mAbの腫瘍増殖に与えるインビボおよびインビトロの効果を検討するために使用されうる。例えば、SCIDモデルにおける腫瘍生着および転移に対するそのような分子の効果を検討することが可能である（例えば、Satoら、Cancer Res. 1997 Apr 15; 57(8): 1584~9）。

## 【0298】

または、例えば、癌システムモデルを提供する下記および当技術分野において既知のマトリゲルアッセイ法を用いて、インビトロの増殖/浸潤/コロニー増殖に与えるそのような分子の効果を検討することが可能である（たとえば、Baeら、Breast Cancer Res. Treat. 24(3): 241~55(1993)を参照）。

20

## 【0299】

実施例13：20P1F12/TMPRSS2による浸潤の調節

この実施例において提供されているデータにおいて開示されているように、20P1F12/TMPRSS2はPSAにおいて観察されたものと類似の抗浸潤活性を示すプロテアーゼである。

## 【0300】

様々なコンテキストで20P1F12/TMPRSS2に暴露された腫瘍細胞の浸潤能を比較するために、これらの集団がトランスウェルインサートシステム（ベクトンディッキンソン）を用いてそれらの浸潤能に関してアッセイした。製造元の指示書にしたがって、細胞に蛍光色素、すなわちカルセイン（Calcein）をロードし、そしてトランスウェルインサートの上部ウェルに播種した。浸潤はその後、全細胞集団の蛍光に対する、低部チャンパー内の細胞の蛍光を測定することにより決定した。すべてのアッセイは3回実施した。

30

## 【0301】

これらの実験においては、記載されたアッセイの性能を容易にするために、浸潤チャンパーおよびアッセイを記載したベクトンディッキンソン技術要覧が当てにされた。2個の適切な要覧は(i)技術要覧427:「改良型マトリゲル浸潤チャンパー(an improved MATRIGEL Invasion Chamber)」および(ii)技術要覧428:「蛍光阻止膜インサートが細胞運動能アッセイの解析を増強する(An Fluorescence Blocking Membrane Insert Enhances Analysis of Cell Motility Assays)」であり、そして両要覧からの情報が我々のアッセイシステムを最適化するために使用された。購入した材料は(i)8ミクロン蛍光ブロック(FluoroBlock)インサート、および(ii)マトリゲルであった。インサートをマトリゲルを用いてコーティングし、一晚乾燥し、そして最短でも2時間再水和した。その後例えば図27において示されているように、親および設計されたPC3細胞を蛍光指示薬、カルセインを用いて標識し、そしてマトリゲルコーティングされたインサート中にてインキュベーションした。浸潤は、上部チャンパーからマトリゲルコーティングされたインサートを通じて、下部チャンパーに移動した細胞の蛍光を測定することにより、検出した。「総細胞数」または「総浸潤」の対照として、細胞は直接下部チャンパーに播種した。浸潤パーセントは以下の公式により計算した:(下部ウェルに移動した細胞の蛍光/総細胞の蛍

40

50

光) x100. *Cancer Res.* 1999 Dec 1; 59 (23) 6010~4; *Clin Exp Metastasis.* 1998 Aug; 16 (6) 513~28および *J Urol.* 2000 Mar; 163 (3) 985~92において議論されている処理もまた参照のこと。

#### 【0302】

本明細書において使用されているインビトロマトリゲルアッセイ法は、前立腺、膀胱、卵巣、肺、腎臓、および大腸癌を含む病理において生じる癌細胞浸潤の特異的条件(例えば、前立腺からリンパ節への前立腺癌細胞の移動)に相関するとして認識されている癌細胞浸潤の研究のためのよく知られたモデルである。結果としてこのモデルは基底膜への腫瘍および内皮細胞浸潤に關与する機構を同定するための、および抗浸潤薬剤をスクリーニングするための特別に有用なツールを提供する(例えばAlbini、*Pathol. Oncol. Res.* 1998、4 (3) : 230~241ページ; Hazanら、*J Cell. Biol.* 2000 Feb 21; 148 (4) : 779~90ページ、およびXingら、*Endocrinology* 1999 Sep; 140 (9) : 4056~64ページを参照)。結果としてこのシステムは広範囲な癌の治療薬を評価するために広く使用される(例えばFestucciaら、*Clin. Exp. Metastasis* 1998、16 (6) : 513~528ページ、Festucciaら、*Oncol. Res.* 1999、11 (1) : 17~31ページ、Hiscoxら、*Clin. Exp. Metastasis* 1995、13 (5) : 396~404ページ、およびRaoら *J. Neurooncol.* 1994、18 (2) : 129~138ページを参照)。

10

#### 【0303】

図27A~27Cにおいて示されている結果においては、親PC3細胞および20P1F12/TMPRSS2を安定的に発現しているPC3細胞を、トランスウェルインサートシステム(ベクトンディッキンソン)を用いて、それらの浸潤能に関してアッセイした。細胞には蛍光色素、すなわちカルセインをロードし、そしてトランスウェルインサートの上部ウェルに播種した。浸潤は、全細胞集団の蛍光に対する、低部チャンパー内の細胞の蛍光を測定することにより決定した。図27A~27Cのデータは、20P1F12/TMPRSS2を発現している細胞が浸潤能が減少していることを示し、かつ20P1F12/TMPRSS2発現がインビボにおいて腫瘍浸潤を抑制することの証拠を提供することを示す。

20

#### 【0304】

図28に示されている結果においては、20P1F12/TMPRSS2がタンパク質分解活性を有することが示されている。特に、精製組換えGST-20P1F12/TMPRSS2は普遍的な基質、すなわちカゼインを用量依存的方法で切断することが可能である。モリキュラープローブ(Molecular Probes)社から購入したキットを用いて(エンズチエック(EnzChek)プロテアーゼアッセイ法、カタログ#E-6638)、および製造元のプロトコールにしたがって、精製組換えGST-20P1F12/TMPRSS2(255~492位のアミノ酸)が、フルオレセイン-チオカルバモイル標識(FTC)カゼイン(モリキュラープローブ)を基質として用いて、プロテアーゼ活性に関してアッセイされた。異なる用量のGST-20P1F12/TMPRSS2をFTC-カゼインとともに37にて、全体で6時間インキュベーションした。蛍光は蛍光光度計を用いて10分間隔で測定した。20P1F12/TMPRSS2によるカゼインの切断は蛍光の増加により検出される。アッセイ法は3回実施し、そして6時間の間に渡り、各10分ごとに読取りを実施しながら行った。

30

#### 【0305】

図29に示されている結果においては、精製組換え20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質の浸潤に対する効果が証明される。カルセインロードされたPC3細胞は、培地のみ、または精製組換え20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質、すなわちGST-TMPRSS2(255~492位のアミノ酸)存在下において、浸潤チャンパー内に播種した。精製GSTを対照として使用した。浸潤は、全細胞集団の蛍光に対する、低部チャンパー内の細胞の蛍光を測定することにより決定した。図29のデータは、20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼ断片が細胞外基質を介してどのようにPC3細胞の浸潤を減少させるかを証明しており、そして20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼドメインが腫瘍形成をインビボにおいて阻害可能であることの証拠を提供する。

40

#### 【0306】

図30に示されている結果においては、カルセインロードされたPC3細胞を、培地のみ、または1ng/mlの精製組換え20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質、すなわちGST-20P1F12/TMPRSS2

50

S2 (255~492位のアミノ酸)存在下において、浸潤チャンパー内に播種した。対照または抗20P1F12/TMPRSS2 (1F9) mAbは指示された試料に添加した。浸潤は、全細胞集団の蛍光に対する、低部チャンパー内の細胞の蛍光を測定することにより決定した。アッセイ法は3回実施した。図30のデータは、抗20P1F12/TMPRSS2抗体がどのようにして20P1F12/TMPRSS2の浸潤阻害活性を除去できるかを証明し、そしてこの分子がインビボにおける腫瘍形成を阻害することができる確証的証拠を提供する。

【0307】

実施例14：20P1F12/TMPRSS2発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

上記のように、当業者はインビトロノックアウト細胞を生成することが可能であり、かつ腫瘍進行、浸潤および血管新生における20P1F12/TMPRSS2の役割を確認するために20P1F12/TMPRSS2タンパク質を発現するまたは欠失する細胞を比較することが可能である。LNCaP細胞は内在性に十分な量の20P1F12/TMPRSS2タンパク質を発現および分泌するので、この株はアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドを用いた予備試験的な確認研究の実験モデルとして選択された。

【0308】

最初の確認研究においては、モルフォリノオリゴヌクレオチドに暴露された細胞の100%がロード後24時間においてこれらオリゴヌクレオチドを保持していることを証明する(図31)。2番目の確認研究においては、これらのアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドを用いて、LNCaP細胞における全長20P1F12/TMPRSS2の発現を特異的に消滅させる能力を証明する(図32、レーン3および4)。

【0309】

このインビトロKOシステムは機能的アッセイ法を用いて、アンチセンスKOおよび親LNCaP細胞を直接比較することを可能にする、そして他のモデルシステムを用いて生成された結果を確認することを可能にする。特に親およびアンチセンス20P1F12/TMPRSS2 KO LNCaP細胞は、それらのマトリゲル浸潤能に関してよく記載されているトランスウェルシステムを用いて比較されてもよい。平行してこれらの細胞はSCIDマウスにおいて腫瘍を形成する能力に関して比較されてもよい。それらはまた内皮細胞増殖および管形成を測定するインビトロ血管新生アッセイ法を用いて評価される。

【0310】

実施例15：PC3細胞におけるTMPRSS2の恒常的発現は皮下腫瘍形成の増強を結果として生じる

方法：PC3細胞は、標準的なレトロウイルス遺伝子送達を用いる感染により、TMPRSS2 cDNAを発現するように設計した。対照として、PC3細胞の別の集団がネオマイシン耐性遺伝子のみを含む空のレトロウイルス構築物を用いて感染された。ネオマイシン類似体G418を用いて、薬剤耐性に関してこれらの細胞集団を選択し、そして、それぞれPC3-TMPRSS2およびPC3-neoと称する。PC3-TMPRSS2細胞におけるTMPRSS2タンパク質の発現はウエスタンブロット分析により確認された。

【0311】

細胞注射に関しては、両集団を対数増殖期まで培養中で増殖させ、トリプシン処理により回収し、そして培地およびマトリゲルの1:1希釈物に、 $1 \times 10^7$ 細胞/mlの密度にて再懸濁した。雄SCIDマウスは2群に分割し(各群n=7)そして、いずれかの細胞集団100  $\mu$ l ( $1 \times 10^6$ )を用いて右皮下側腹部に注射した。腫瘍が明らかになった時に、長さX幅X高さ( $\text{mm}^3$ )からなる測径器測定を週2回実施した。

【0312】

結果および結論：腫瘍測定は21日に開始し、そして続く3.5週間において週2回実施した(図37を参照)。最初の時間点(21および24日)において、PC3-TMPRSS2およびPC3-neo腫瘍間に増殖の差はなかった。しかしながら、28日から始めて、平均腫瘍容積はPC3-TMPRSS2注射マウスにおいてより大きく、そして実験終了(45日)まで速度が増加しながら増殖しつづけた。PC3-TMPRSS2注射マウスの増殖における増加は、PC3-neo注射マウスと比較して、28日、31日、35日、38日、42日および45日において、それぞれ25%、76%、81%、10

10

20

30

40

50

0%、156%および102%であった。

【0313】

増加パーセントが各時間点において徐々に大きくなった事実は、TMPRSS2発現腫瘍の成長率が増大したことを表す。この実験は繰り返し行った結果、そしてPC3-neo腫瘍と比較してPC3-TMPRSS2では、より大きな腫瘍および増殖率の増大の両方を再び生じた。

【0314】

これは、TMPRSS2の恒常的発現により増殖が増強し、そして前立腺癌患者の腫瘍形成にTMPRSS2の恒常的発現が関与しうることを証明する。プロテアーゼとして機能するTMPRSS2は、それら全てが潜在的に腫瘍増殖を刺激しうる細胞表面タンパク質、細胞外基質因子または増殖因子を、タンパク質分解により活性化できる可能性がある。また、LDLRA/SRCRドメインを含む細胞表面上に残るTMPRSS2の一部が、自分自身または細胞外リガンドのいずれかに直接結合した後、正の増殖シグナルを送達する可能性もある。もしTMPRSS2セリンプロテアーゼ断片が腫瘍形成または腫瘍増殖を促進するならば、セリンプロテアーゼ阻害剤の投与は治療に活用されてもよい。

【0315】

実施例16 1F9抗TMPRSS2MAbによるLAPC-9皮下腫瘍形成の増強

方法：LAPC-9異種移植片は、ノーザンおよびウエスタンブロット分析により、それぞれTMPRSS2 RNAおよびタンパク質を発現することが以前に示されている。LAPC-9腫瘍細胞をSCIDマウスに注射する前に、以前に記載されているように(Craftら、Cancer Research 1999)単一細胞懸濁物を調製した。腫瘍はSCIDマウスから回収し、はさみおよび鉗子を使って非常に小さな断片に刻み、イスコベ(Iscove's)培地中で一度洗浄し、プロナーゼの1%溶液中で室温にて20分間消化した。消化後、細胞懸濁液は10%FBSを含むイスコベ培地中で二度洗浄し、その後PrEGM培地(クロネティクス(Clonetics)、ウォーカーズビル(Walkersville)、メリーランド州)に再懸濁した。一晚インキュベーションした後、細胞を回収し、PrEGM中で一度洗浄し、そしてその後大きな塊および残骸を除去するために100ミクロンのナイロンフィルターを通過させた。フィルターを通過した細胞は収集し、遠心分離し、PrEGM培地に再懸濁し、そして注射前に計数した。

【0316】

皮下注射に関しては、LAPC-9腫瘍は上記のように単一細胞に調製し、そしてマトリゲルを用いて1:1希釈で混合した(コラボレイティブリサーチ、ベッドフォード、マサチューセッツ州)。雄SCIDマウスは、100μl容積中の $0.5 \times 10^6$ 細胞の単回皮下注射を右側腹部にうけた。腫瘍形成に対する抗TMPRSS2 MAb 1F9の効果を試験するために、500μgの精製抗体を、腫瘍細胞注射と同じ日(0日)に開始した腹腔内注射および3、5、7、9および12日の処置により投与した。対照として腫瘍注射マウスはPBSを用いて注射した(PBS群に関してn=8; 1F9群に関してn=6)。腫瘍サイズは明白な腫瘍に関して、ノギス測定により計測し、そして平均腫瘍容積は長さX幅X高さとして計算した。腫瘍容積測定は1週間に1~2回日常的に記録した。マウスは結果の節において示されている時間点において採血し、そして平均循環PSAレベルをPSA ELISAキットを用いて血清中において決定した(アノゲン(Anogen)、トロント、カナダ)。

【0317】

結果および結論：LAPC-9腫瘍細胞および500μgの1F9を注射した雄SCIDマウスにおける、抗TMPRSS2 MAb 1F9のLAPC-9腫瘍形成に対する効果は図38において示されている。腫瘍増殖率およびLAPC-9腫瘍サイズは、PBSを用いて処理した対照マウスと比較して、1F9抗体を用いて処理したマウスにおいて増大していた(図38A)。腫瘍増殖の独立した相関物として、循環PSAレベルが処理および非処理マウスにおいて決定された。有意に高いレベルの循環PSAが、PBS処理マウスに対して1F9処理マウスにおいて観察された(図38B)。この実験は、類似の結果を持ってさらに2回繰り返した、実験により、1F9処理はSCIDマウスにおいてLAPC-9腫瘍形成を増大することが示唆された。

【0318】

腫瘍増殖の抗体媒介性増強の機構は、制限することなく、以下の可能性を含むことがで

きる。第一には、抗体はTMPRSS2のセリンプロテアーゼドメインに結合し、そしてその触媒活性を活性化する可能性があり、その結果腫瘍増殖を促進する。第二に、TMPRSS2のセリンプロテアーゼドメインに結合することにより、抗体はセリンプロテアーゼ阻害剤（例えばセルピン）との潜在的な相互作用を阻害することができ、それによりTMPRSS2を恒常的に活性にする。三番目には、抗体はTMPRSS2プロテアーゼドメインを腫瘍細胞表面の上または近くに隔離する可能性があり、そしてそれにより、その後腫瘍増殖を刺激するその基質（例えば増殖因子）を触媒させる。

【0319】

実施例17：マウスポリクロナール抗体によるLNCaP細胞上のTMPRSS2 LDLRA/SRCRドメインの認識

タグ5 TMPRSS2 LDLRA/SRCRドメインタンパク質（111～255のアミノ酸）を用いて免疫した3匹のマウス由来の血清を、TMPRSS2を発現するLNCaP細胞、およびTMPRSS2発現を欠失する293T細胞を染色するために使用した。LNCaPおよび293T細胞を、免疫前マウス血清（薄い線）または抗LDLRA/SRCR血清（濃い線）のいずれかの1：50希釈物とともにインキュベーションし、洗浄し、そしてその後ヤギ抗マウスIgG FITC結合型二次抗体の1：200希釈物とともにインキュベーションした。洗浄に続いて、5,000細胞をコールターエピックスXLフローサイトメーター上で蛍光染色に関して解析した。免疫前血清と比較して、293T細胞ではそうではない、LNCaP細胞中の抗LDLRA/SRCR染色集団の特異的な蛍光シフトが矢印で示されている。

【0320】

これらのデータは2つの発見を示す：1) LDLRA/SRCRドメインがLNCaP細胞表面に発現している；および2) 抗TMPRSS2 LDLRA/SRCR pAbは特異的に、これらの細胞表面のこのドメインを認識する。

【0321】

実施例18：ヒト血清における抗TMPRSS2 LDLRA/SRCR抗体の相対的力価

28人の正常個人および40人の前立腺癌患者由来の臨床血清試料が、ELISAによりTMPRSS2のLDLRA/SRCRドメインに反応する抗体の存在に関して解析された。簡単には、LDLRAおよびSRCRドメインを含む、TMPRSS2の111～255位のアミノ酸をコードする精製タグ5タンパク質が50mM炭酸塩緩衝液（pH9.6）中に希釈され、そして100ng/ウェルにて一晚ELISAプレートをコートするために使用された。ウェルはその後2%BSAを含むPBSを用いて37℃2時間ブロッキングされた。1%BSAを含むPBS中で1：100に希釈された血清50μlは、その後コーティングされていないBSAブロッキングウェルならびにタグ5タンパク質コーティングされたウェルに3箇所ずつ添加した。そして室温で1時間インキュベーションした。ウェルは0.2%ツイーン（Tween）20を含むPBS（PBS-T）を用いて4回洗浄し、そして1%BSAを含むPBS-T中のヤギ抗ヒトIgG HRP標識二次抗体の1：5,000希釈物50μlを用いてインキュベーションした。ウェルは再度4回洗浄し、そしてTMB基質（200μl/ウェル）を用いて現像した。反応は50μlの1M（H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）を添加することにより停止させ、そしてウェルの光学密度（OD）を450nmにて決定した。血清試料の相対的力価（図40A）が、タグ5タンパク質コーティングされたウェルからコーティングされていないウェル（バックグラウンド）の平均ODを引き、そしてその後、LDLRA/SRCRドメインに対するマウスpAbの様々な希釈物を用いて、由来するプレートの標準曲線に対してODを標準化することにより決定された。

【0322】

図40Bに描写されているように、前立腺癌血清集団の平均力価は $4.27 \times 10^{-5} \pm 2.80 \times 10^{-5}$ （平均±標準偏差）であり、正常集団のそれ $2.58 \times 10^{-5} \pm 3.08 \times 10^{-5}$ とは有意に異なった（\*P=0.0152、両側t検定）。注記事項として、負の力価値は、標準曲線のy切片が0より大きく、そして実験試料のODよりも大きいという事実から生じた。

【0323】

これらのデータはTMPRSS2タンパク質が免疫原性であることを示している。さらに、前立腺癌患者は正常の人々に比べて増加したレベルの抗LDLRA/SRCRドメイン抗体を発現する。したがって、前立腺癌患者は癌性組織中に発現しているTMPRSS2タンパク質に対する液

10

20

30

40

50

性免疫応答が上昇している可能性がある。したがって、LDLRA/SRCRドメインは、前立腺癌などのTMPRSS2を発現する癌に関する治療および/または診断標的として使用される。さらに、抗LDLRA/SRCRドメイン抗体の血清力価は前立腺癌などのTMPRSS2を発現する癌に関する診断方式として使用される。

## 【0324】

〔表1〕 抗TMPRSS2モノクローナル抗体を用いたヒト組織の免疫組織化学染色

染色強度	組織	優勢的染色局在		
		細胞質	管腔表面/ 分泌	
なし	腎臓 皮膚 肺 肝臓 精巣 脾臓			10
軽度	ファロピウス管 大腸癌 (1/4)	+	+	
中度から強度	前立腺 (7/7) BPH (7/7) PIN (1/1) 大腸 (4/4) 膵臓 (4/4)	+	+	20
	前立腺癌 (5/5) 大腸癌 (3/3)	+	+	

## 【0325】

〔表2〕 抗TMPRSS2 mAbのエピトープマッピング

試験 mAb	なし	競合 mAb						
		1F9	2D10	2F8	3G3	6B11	8C6	9G8
1F9-B	2.371±0.012	0.269±0.001	0.730±0.004	2.230±0.037	0.359±0.005	0.353±0.008	2.625±0.033	2.183±0.105
2F8-B	1.390±0.015	1.258±0.020	1.169±0.005	<b>0.407±0.032</b>	1.250±0.009	1.242±0.020	<b>0.371±0.005</b>	<b>0.611±0.039</b>
8C6-B	1.512±0.004	1.899±0.013	1.434±0.031	1.216±0.062	1.803±0.044	1.806±0.056	<b>0.161±0.005</b>	1.473±0.014

30

## 【0326】

過剰の非標識抗体の存在下でのピオチン化抗体のシグナル強度の減少は、mAbが同一のまたは重複する結合部位に関して競合することを示している（太字で示されている）。表2において示されているように、ピオチン化1F9（1F9-B）のシグナル強度の減少が、mAb 2D10、3G3、および6B11および自分自身の存在下においては見られるが、しかし2F8、8C6および9G8によっては見られない。これらの結果は、mAb 1F9、2D10、3G3、6B11は、2F8、8C6および9G8のそれらとは異なる同一の（または重複する）エピトープを共有することを示す。MAb 2F8-Bは自分自身により、およびmAb 8C6および9G8により競合され、これらのmAbが同一のまたは重複するエピトープを共有することを示している。MAb 8C6-Bは自分自身により、および中度にmAb 2F8により競合される。総合すると、これらの結果は、抗TMPRSS2抗体のパネルがTMPRSS2プロテアーゼドメイン内の異なるエピトープを認識することを示す。

40

## 【0327】

〔表3〕 アミノ酸略語

一文字	三文字	完全な名前
F	Phe	フェニルアラニン
L	Leu	ロイシン
S	Ser	セリン
Y	Tyr	チロシン
C	Cys	システイン
W	Trp	トリプトファン
P	Pro	プロリン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
I	Ile	イソロイシン
M	Met	メチオニン
T	Thr	スレオニン
N	Asn	アスパラギン
K	Lys	リジン
V	Val	バリン
A	Ala	アラニン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
G	Gly	グリシン

10

20

【 0 3 2 8 】

〔 表 4 A 〕

スーパーモチーフ	位置 2(一次アンカー)	位置 3(一次アンカー)	位置 C末端(一次アンカー)
A1	<i>TLVMS</i>		<b>FWY</b>
A2	<i>LIVMATQ</i>		<b>IVMATL</b>
A3	<i>VSMATLI</i>		<b>RK</b>
A24	<i>YFWIVLMT</i>		<b>FIWVLM</b>
B7	<b>P</b>		<b>VILFMWYA</b>
B27	<b>RHK</b>		<b>FYLWMIVA</b>
B44	<b>ED</b>		<b>FWYLMVA</b>
B58	<b>ATS</b>		<b>FWYLIVMA</b>
B62	<i>QLIVMP</i>		<b>FWYMIVLA</b>
<b>MOTIFS</b>			
A1	<b>TSM</b>		<b>Y</b>
A1		<b>DEAS</b>	<b>Y</b>
A2.1	<i>LMVQIAT</i>		<b>VLMAT</b>
A3	<i>LMVISATFCGD</i>		<b>KYRHFA</b>
A11	<i>VTMLISAGNCDF</i>		<b>KRYH</b>
A24	<i>YFWM</i>		<b>FLIW</b>
A*3101	<i>MVTALIS</i>		<b>RK</b>
A*3301	<i>MVALFIST</i>		<b>RK</b>
A*6801	<i>AVTMSLI</i>		<b>RK</b>
B*0702	<b>P</b>		<b>LMFWYIV</b>
B*3501	<b>P</b>		<b>LMFWYIVA</b>
B51	<b>P</b>		<b>LIVFWYAM</b>
B*5301	<b>P</b>		<b>IMFWYALV</b>
B*5401	<b>P</b>		<b>ATIVLMFWY</b>

30

40

太字残基は好ましい、斜体字残基はあまり好ましくない：上記表において特定されているように、モチーフまたはスーパーモチーフに関して、各一次アンカー位置に一次アンカー

50



【 0 3 3 1 】  
〔 表 4 D 〕

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	C 未端
位置										
ズーパ-モーター										
A1		<u>I°アンカニ</u> TULYMS								<u>I°アンカニ</u> FWY
A2		<u>I°アンカニ</u> LIVMATO								<u>I°アンカニ</u> LIVMAT
A3	好ましい	<u>I°アンカニ</u> VSMATLJ	YFW (4/5)	YFW (4/5)	YFW (4/5)	YFW (4/5)	YFW (4/5)	YFW (4/5)	P (4/5)	<u>I°アンカニ</u> RK
	有害	DB (3/5); P (5/5)	DE (4/5)							
A24		<u>I°アンカニ</u> YFWYLM T								<u>I°アンカニ</u> FYWYLM
D7	好ましい	FWY (5/5) LIVM (3/5)	<u>I°アンカニ</u> P	FWY (4/5)					FWY (3/5)	<u>I°アンカニ</u> VILFMYTA
	有害	DB (3/5); P (5/5); G (4/5); A (3/5); QN (3/5)		DE (3/5)	O (4/5)	QN (4/5)	DE (4/5)			
B27		<u>I°アンカニ</u> RHK								<u>I°アンカニ</u> FYLWMYA
B44		<u>I°アンカニ</u> ED								<u>I°アンカニ</u> FWYLIMYA
B58		<u>I°アンカニ</u> ATS								<u>I°アンカニ</u> FWYLIPMA
D62		<u>I°アンカニ</u> QLVMP								<u>I°アンカニ</u> FWYMIPLA

10

20

30

40

【 0 3 3 2 】  
〔 表 4 E 〕

位置

0	1	2	3	4	5	6	7	8	C 末端
---	---	---	---	---	---	---	---	---	------

位置

0	1	2	3	4	5	6	7	8	C 末端
---	---	---	---	---	---	---	---	---	------

モチーフ

A1 好ましい  
9-mer

GPVW	I <sup>o</sup> アンカー STM	DBA	YFW	P	DEQN	YFW	I <sup>o</sup> アンカー Y
DE		RHKLIVM P	A	A			

有害

A1 好ましい  
9-mer

GRHK	ASTCLV M	I <sup>o</sup> アンカー DEAS	GSTC	ASTC	LIVM	DE	I <sup>o</sup> アンカー Y
A	RHKDQPY FW		DB	RHK	PG	GP	

有害

10

20

30

40







位置

	<b>D</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>C</b> 末端 または C 末端	
<b>D51</b>	好ましい	LIVMFWY	<u>1°アンカー</u> P	FWY	STC	FWY	DB	DBQN	FWY	FWY	<u>1°アンカー</u> LIVFWYAM
	有害	AQPDERHKSTC									
<b>B5301</b>	好ましい	LIVMFWY	<u>1°アンカー</u> P	FWY	STC	FWY		LVIKQN	LIVMFWY	FWY	<u>1°アンカー</u> IMFWYALY
	有害	AQPQN									
<b>D5401</b>	好ましい	FWY	<u>1°アンカー</u> P	FWYLIVM		LIVM		ALIVM	FWYAP		<u>1°アンカー</u> ATVLMFWY
	有害	QPQNDE		QDESTC		RHKDB		QNDDB	DB		

斜体字の残基はあまり好ましくないかまたは「許容できる」残基を示す。  
表2の情報は特に特定されないならば9merに特異的である。

10

20

30

40

50

【0333】

この出願を通じて、様々な刊行物、ウェブサイト、特許および特許出願が参照される。これらの刊行物、ウェブサイト、特許および特許出願の開示は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる（ウェブサイトはワールドワイドウェブのアドレスである、それらのユニフォームリソースロケータースなわちURLにより参照される）。

【0334】

本発明は、本発明の個々の局面の1つの説明であるとして意図され、本明細書に開示されている実施態様により、範囲を制限されるものではなく、そして機能的に同等ないかなるものが本発明の範囲内である。本明細書において記載されているものに加えて、本発明のモデルおよび方法に対する様々な修飾は、前述の記載および開示から当業者には明らか

であると思われ、かつ本発明の範囲内に入ることが同様に意図される。そのような修飾または他の実施態様は本発明の真の範囲および精神から逸脱することなく実施されうる。

【図面の簡単な説明】

【0335】

本特許出願は有色で作製した少なくとも1つの図画を含む。有色図画を有する本特許のコピーは、要請および必要経費の支払いに応じて特許商標局により提供されると思われる。

【図1】cDNAクローン20P1F12-GTCの1ヌクレオチド（配列番号：1）および推定アミノ酸（配列番号：2）配列（実施例3）（ATCCに登録されているように；アクセション番号207097）。

【図2】Paoloni-Giacobinoら、1997、Genomics 44：309～320に刊行されたTMPRSS2遺伝子配列のヌクレオチド（配列番号：3）および推定アミノ酸（配列番号：4）配列。

【図3 A B】図3Aは20P1F12-GTC1 cDNA（実施例3）をTMPRSS2の以前に刊行された配列（Paoloni-Giacobinoら、1997、Genomics 44：309～320）と比較するアミノ酸配列アライメントを示す。アミノ酸差異は太字で示されている。図3Bは20P1F12/TMPRSS2のドメイン構造の概略的説明を示す。

【図4】最初に単離したSSHクローン20P1F12のヌクレオチド配列（配列番号：5）。

【図5 A - D】正常前立腺および3個の前立腺癌異種移植片においてほぼ等しいレベルの発現を示す（図5A）；および、大腸、膵臓、腎臓および肺（図5BおよびC）における有意に低い発現レベルが検出可能である、正常ヒト組織における概して前立腺特異的な発現を示す、前立腺癌異種移植片、正常前立腺および他の組織および細胞株における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現のRT-PCR分析。20P1F12はまた膀胱癌組織においても発現していることが示されている（図5D）。

【図6】標識化クローン20P1F12 cDNAプローブを用いた、正常ヒト組織および前立腺癌異種移植片における20P1F12/TMPRSS2遺伝子発現のノーザンブロット分析。16個の正常組織における発現は、腎臓、膵臓および肺で10～20倍低い発現レベルを示し、概して前立腺に限局されている。

【図7 A B】前立腺および大腸癌細胞株における20P1F12/TMPRSS2の発現（図7A）。異種移植片および細胞株のフィルターはレーン当り10 μg総RNAを用いて調製した。プロットは20P1F12/TMPRSS2由来遺伝子断片プローブを用いて解析された。全てのRNA試料はエチジウムブロマイド染色により標準化された。キロベース=Kb。LAPC-9 AIを除いて、異種移植片における20P1F12/TMPRSS2の発現は、正常前立腺試料において観察されたレベルと同等であった。加えて、扁平上皮癌細胞株A431における、より低いレベルの発現が観察された。20P1F12/TMPRSS2はまた、転移性癌のプール（大腸から肺、大腸から肝臓、卵巣からファロピウス管）ならびに膀胱、肺および卵巣癌組織においても発現している（図7B）。しかしながら発現パターンは正常腎臓/腎臓癌において逆転している：20P1F12は正常腎臓において発現しているが、しかし、腎臓癌においてはずっと低いレベルで発現している（図7B）（腎臓癌プールは2個のグレード2腎臓癌および1個のグレード3腎臓癌に由来している）。

【図8】20P1F12/TMPRSS2に対するモノクローナル抗体の特性化。20P1F12/TMPRSS2に対するモノクローナル抗体は、実施例5に記載されているように精製GST-20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質を用いて生成された。モノクローナル抗体は、myc His-20P1F12/TMPRSS2をコードするPcDNA3.1ベクターをトランスフェクションした293T細胞由来の溶解物に対してウエスタンブロッティングによりスクリーニングした。（A）特異的に20P1F12/TMPRSS2を認識する6個のmAb：1F9（IgG1、K）、2D10（IgG1、K）、2F8（IgG1、K）、6B11（IgG1、K）、8C6（IgG1、K）および9G8（IgG2a、K）が、20P1F12/TMPRSS2（レーン1）またはneo（対照として、レーン2）をトランスフェクションした293T細胞由来の細胞溶解物由来のウエスタンブロットを検査するために使用された。（B）20P1F12/TMPRSS2（レーン1）またはneo（対照として、レーン2）のいずれかをトランスフェクションした293T細胞、LAPC-9 ADおよびLNCaP由来の細胞溶解物が、1F9抗TMPRSS2 mAbを用いて検査された。分子量標準は

10

20

30

40

50

キロダルトン (KD) にて横に示されている。

【図 9】20P1F12/TMPRSS2のビオチン化。(A) ヒスタグ付き20P1F12/TMPRSS2またはneo (対照として) を293T細胞にトランスフェクションした。細胞タンパク質をビオチン化するために、無傷細胞はビオチンとともにインキュベーションした。細胞溶解物はウエスタンブロッティングにより直接解析するか (レーン1および2)、または全ての標識細胞タンパク質を親和性精製するためにストレプトアビジンとともにインキュベーションするかのいずれかであった。ストレプトアビジン精製した細胞タンパク質は抗His抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析された (レーン3および4)。ビオチン化タンパク質は20P1F12/TMPRSS2をトランスフェクションした細胞においてのみ検出された。(B) ビオチン化PC-3 (レーン2) およびLNCaP (レーン4) および非標識PC-3 (レーン1) およびLNCaP (レーン3) はストレプトアビジンゲルとともにインキュベーションし、そしてその後1F9 mAbを用いたウエスタンブロッティングにより解析した。20P1F12/TMPRSS2はビオチン化試料においてのみ検出された。分子量標準はキロダルトン (KD) にて横に示されている。

10

【図 10】トランスフェクションした293T細胞における20P1F12/TMPRSS2の脱グリコシル化。293T細胞にトランスフェクションされたHisタグ付き20P1F12/TMPRSS2はニックル-アガロースを用いて精製した。20P1F12/TMPRSS2タンパク質はその後、N-グリコシダーゼFを用いて、脱グリコシル化した。非処理20P1F12/TMPRSS2 (レーン1) および脱グリコシル化されたタンパク質 (レーン2) は抗His抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。分子量シフトが脱グリコシル化を用いて観察された。分子量標準は横にキロダルトン (KD) で示されている。

20

【図 11】20P1F12/TMPRSS2細胞表面プロテアーゼのアンドロゲン制御。LNCaP細胞は、2%チャコール除去したウシ胎児血清中で細胞を増殖させることにより、1週間の間 (レーン1) または24時間 (レーン3) アンドロゲンを欠乏させた。アンドロゲン制御は10nMミボレロン (アンドロゲン類似体) を用いて9時間の間、24時間欠乏細胞を刺激することにより決定された (レーン4)。20P1F12/TMPRSS2の発現は、20P1F12/TMPRSS2プローブを用いて検査する10 μgのRNA/レーンのノーザンブロッティングにより、完全培地中で増殖するLNCaP細胞における20P1F12/TMPRSS2発現レベル (レーン2) と比較された。等量のRNAロードがエチジウムブロマイド染色および引き続くアクチンプローブを用いた検査により決定された。PSAレベルはアンドロゲン制御の対照として決定された。分子量標準は横にキロベース (Kb) で示されている。

30

【図 12】LNCaPにおける20P1F12/TMPRSS2のアンドロゲン制御。LNCaP細胞は、2%チャコール除去したウシ胎児血清中でそれらを増殖させることにより、1週間の間アンドロゲンを欠乏させた。アンドロゲン制御はミボレロン (Mib) を用いて様々な時間点に関して細胞を刺激することにより決定された。20P1F12/TMPRSS2の発現は、抗1F9mAbを用いた細胞溶解物のウエスタンブロッティングにより決定された。付加的な対照として、neo (対照として) または20P1F12/TMPRSS2のいずれかを用いて感染させたPC-3細胞由来の細胞溶解物を使用した。抗Grb2抗体 (トランスダクションラポラトリーズ) を用いてウエスタンブロットを検査することにより、等しいタンパク質ローディングが決定された。20P1F12/TMPRSS2のタンパク質発現は、20P1F12/TMPRSS2プローブを用いて検査する10 μgのRNA/レーンのノーザンブロッティングにより、RNAレベルと比較された。等量のRNAロードがノーザンブロットをアクチンプローブを用いて検査することにより決定された。

40

【図 13】NIH-3T3細胞における20P1F12/TMPRSS2発現の効果。NIH3T3細胞は、neo (対照として) または20P1F12/TMPRSS2のいずれかをコードするレトロウイルスを用いて感染させた。感染48時間後、細胞は光学顕微鏡により解析した。多数の液胞を蓄積するようにみえた細胞は矢印で示した。

【図 14】前立腺、前立腺癌および大腸癌細胞における20P1F12/TMPRSS2の高レベルの発現。正常組織、前立腺癌異種移植片および細胞株および大腸癌細胞株由来のRNAを含むノーザンブロットが20P1F12/TMPRSS2 cDNA断片を用いて検査された。試料は、1. 前立腺、2. LAPC-4 AD、3. LAPC-4 AI、4. LAPC-9 AD、5. LAPC-9 AI、6. LNCaP、7. PC-3、8. DU145、9. CaCo-2、10. LoVo、11. T84、12. Colo-205である。全てのRNA試料はアクチン

50

プローブを用いて標準化された。キロベース (kb) でのサイズ標準は横に示されている。

【図 1 5】20P1F12/TMPRSS2タンパク質は、組織および細胞株において、全長およびタンパク質分解により切断された形として発現する。細胞および組織溶解物 (タンパク質20  $\mu$ g) を試料緩衝液中で調製し、そして1F9抗20P1F12/TMPRSS2 MAbを用いてウエスタンブロット上で検査した。マッチングさせた隣接組織 (N) を有する前立腺腫瘍組織 (T) は、それぞれグリーソン (Gleason) スコア7、9および7を有する患者に由来した。対照ベクターまたは20P1F12/TMPRSS2発現ベクターのいずれかを用いてトランスフェクションした293T細胞由来の溶解物を、それぞれ陰性および陽性対照として使用した。

【図 1 6】20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼはアンドロゲン制御されており、そして前立腺癌細胞培地中に分泌される。(A) LNCaP細胞は10% ウシ胎児血清 (NT) または2% チャコール除去した血清 (CSS) いずれかを含む培地中において1週間増殖させた。CSS中で増殖した細胞は、9または24時間の間、非処理 (-) で放置されたか、またはミボレロン (10nM) を用いて刺激された (+)。PC-3細胞およびアンドロゲン受容体 (AR) 発現PC-3細胞はミボレロンを用いて9時間刺激された。溶解物は1F9 MAbを用いて検査した。(B) LNCaP細胞はアンドロゲン除去され (-)、そしてその後1nMまたは10nMのミボレロンのいずれかを用いて36時間処理された。細胞抽出物および細胞培地を抗1F9ウエスタンブロット用剤に収集した。培地は1F9 MAbを用いた免疫沈降法後 (i.p.) またはニート (20  $\mu$ l) のいずれかで解析した。分子量標準はキロダルトン (KD) にて横に示されている。

【図 1 7】抗20P1F12/TMPRSS2 MAbを用いた前立腺および大腸癌患者試料の免疫組織化学解析。試料は (a) 2% CSSを含む培地中で1週間増殖させたLNCaP細胞、(b) 2% CSSを含む培地中で1週間増殖させ、そしてミボレロン (10nM) を用いて9時間刺激されたLNCaP細胞、(c) 正常前立腺組織、(d) グレード3前立腺癌、(e) 1F9を用いて染色した正常前立腺組織 (1000x拡大)、(f) 抗PSA抗体を用いて染色した正常前立腺組織 (1000x拡大)、(g) 正常大腸、(h) 大腸癌。前立腺の腺内腔内に分泌されたタンパク質の染色が矢印で示されている。異なる指摘があるところを除いて、全ての写真は400x拡大である。例えば、正常大腸および大腸癌における20P1F12/TMPRSS2の染色局在の比較観察は、20P1F12/TMPRSS2の蓄積に関して異なる差異を示し、その発見により、診断および治療標的としての20P1F12/TMPRSS2使用の確定的証拠が提供される。

【図 1 8】20P1F12/TMPRSS2の変異導入解析は自己触媒活性およびタンパク質分解による切断の部位を明らかにする。実施例10において記載されているように異なる20P1F12/TMPRSS2点突然変異体を用いて293T細胞をトランスフェクションした。細胞溶解物 (20  $\mu$ gタンパク質) は1F9 MAbを用いて検査した。分子量標準はキロダルトン (KD) にて横に示されている。

【図 1 9】アンドロゲン刺激によるLAPC4細胞における20P1F12/TMPRSS2および32kD自己タンパク質分解による切断産物の発現増加。10cmディッシュにおいて70% 集密のLAPC4細胞は、2% チャコール-デキストラン処理したFBS (CD-FBS) を含むRPMI培地中で4日間インキュベーションすることによりアンドロゲンを欠乏させた。培地はその後吸引除去し、そして5nMのアンドロゲン類似体ミボレロンの存在または非存在において、新しい2% CD-FBS RPMIを用いて置換した。示された時間において、細胞を回収し、そしてプロテアーゼ阻害剤を含むRIPA緩衝液中に溶解した。比較のために、RPMI + 5% FBS中で増殖させたLNCaPおよびLAPC4細胞の溶解物、およびLAPC4 SCIDマウス異種移植片の全組織溶解物を解析に含めた。示された細胞溶解物25  $\mu$ g/レーンを10~20% 勾配のSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロースに転写し、そして、以下のように抗TMPRSS2 mAb 1F9を用いたウエスタン分析に供した。プロットは、最初に、3% 脱脂ミルクを含む25mMトリスpH7.5および150mM NaCl (TBS) 中で2時間ブロッキングした。プロットはその後、1% ミルクを含む高塩TBS (500mM NaCl + 0.15% ツィーン20 (hTBS-T) ) 中で2  $\mu$ g/mlの1F9 mAbを用いて4時間インキュベーションした。プロットはhTBS-Tを用いて洗浄し、そしてその後、hTBS-T + 1% ミルク中で、1:4000希釈のヤギ抗マウスIgG1-HRP結合二次抗体 (サザン バイオテクノロジー) を用いて室温にて1時間インキュベーションした。洗浄に続いて、抗TMPRSS2免疫応答性バンドは増強化学発光およびオートラジオグラフィフィルムに露光することにより可視

10

20

30

40

50

化した。矢印は70kDの全長20P1F12/TMPRSS2タンパク質および自己タンパク質分解による32kD切断産物を示す。

【図20】20P1F12/TMPRSS2は前立腺癌異種移植片、前立腺癌細胞株、正常精液および臨床組織において発現している。20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現解析は図19に示されているように、抗TMPRSS2 mAb 1F9を用いてウエスタンブロットにより実施した。293T試料は、空ベクターまたは、野生型20P1F12/TMPRSS2または20P1F12/TMPRSS2のプロテアーゼ欠損点突然変異体のいずれかをコードするレトロウイルス発現プラスミドのいずれかを用いて一過性にトランスフェクションされた細胞に由来する。LAPC4細胞株(LAPC4CL)、LNCaP細胞、LAPC4およびLAPC9異種移植片、およびマッチングさせた臨床組織のタンパク質溶解物は、細胞沈殿物、異種移植片および組織を2XSDS-PAGE試料緩衝液に溶解し、および加熱により取得した。溶解物ロードの標準化は、転写後のニトロセルロース膜のボンソーS染色により確認した。正常男性提供者の精液は、細胞および凝固物を沈殿するために5分間14,000Gで回転し、そして上清はRIPA緩衝液中で4倍に希釈した。この液体2 $\mu$ lをSDS-PAGE試料緩衝液と混合し、そして指示されたレーンで泳動した。矢印は、正常精漿中の70kDの全長20P1F12/TMPRSS2タンパク質、32kDの切断産物、および新規の90kDの抗TMPRSS2免疫応答性バンドを示す。

【図21】アンドロゲン誘導、および32kD自己タンパク質分解による断片のLAPC4およびLNCaP細胞上清への放出、および新規の103kDの抗TMPRSS2免疫応答性タンパク質複合体の出現。LAPC4およびLNCaP細胞(10cmディッシュで70%集密)は、2% CD-FBSを含むRPMI培地で5日間インキュベーションすることによりアンドロゲンを欠乏させた。培地は吸引除去し、そして1または10nMのいずれかのミボレロンが存在するかまたは非存在の新しいRPMI + 2% CD-FBS培地4mlを用いて置換し、そしてさらに48時間インキュベーションした。全細胞溶解物(「WCL」、25 $\mu$ g/レーン)または調整組織培養上清(25 $\mu$ l、0.22 $\mu$ M滅菌濾過)を、図19に示されているように、SDS-PAGEおよび1F9 mAbを用いた抗TMPRSS2ウエスタン分析に供した。矢印は調整培地中の32kDの自己タンパク質分解による断片および103kDの抗TMPRSS2免疫応答性複合体を示す。商業的に利用可能なELISA(アノゲン)により決定される、上清のPSA濃度が、既知のアンドロゲン誘導性分泌タンパク質との比較のために示される。

【図22】20P1F12/TMPRSS2タンパク質のタンパク質分解断片の、LNCaP細胞培養上清への放出、およびLNCaP異種移植片保持SCIDマウス血清への放出。図21に記載されているように処理した、またはRPMI + 5% FBS中で増殖させたLNCaP細胞のRIPA緩衝液全細胞溶解物および調整組織培養上清、またはLNCaP異種移植片保持SCIDマウス由来の血清は、以下のようプロテインGビーズに共有結合された抗TMPRSS2 mAbを用いて免疫沈降させた。1mlのRIPA全細胞溶解物(総タンパク質600 $\mu$ g)、等量のRIPA緩衝液を用いて希釈した調整物、およびRIPA緩衝液を用いて1mlに希釈したSCID血清340 $\mu$ l(総タンパク質15mg)を、RIPA緩衝液中で50%プロテインGビーズ懸濁物50 $\mu$ lとともにインキュベーションすることにより、4にて3時間、まず事前に精製(preclear)した。1F9抗TMPRSS2 mAbは、「抗体の使用、実験マニュアル(Using Antibody, a Laboratory Manual)」、HarlowおよびLane、1999、323ページ、に記載されているように、ホモ二官能性クロスリンキング試薬ジメチルピメリミデート(DMP)を用いてプロテインGビーズに共有結合させた。その後、50 $\mu$ lの1F9/プロテインGビーズの50%懸濁物(~50 $\mu$ gのmAb)を各試料に添加し、そして4で一晩インキュベーションした。免疫沈降物はRIPA緩衝液中で4回洗浄し、そして免疫複合体は35 $\mu$ lの3xSDS-PAGE試料緩衝液の添加および加熱により解離させた。25 $\mu$ lの各試料はその後、図19において記載されているように、SDS-PAGEおよび1F9 mAbを用いたウエスタンブロットングに供した。293T細胞のRIPA緩衝液溶解物(293T wcl)および2% CD-FBS RPMI(培地)を陰性対照としてIP/ウエスタンブロットコールに供した。矢印は、アンドロゲン刺激上清およびSCID血清における全長70kDの20P1F12/TMPRSS2タンパク質、32kDの切断断片および新規の103kDの抗20P1F12/TMPRSS2免疫応答性複合体を示す。

【図23】前立腺および大腸癌患者およびLNCaP腫瘍を保持するSCIDマウス血清試料における、20P1F12/TMPRSS2の32kD切断断片、および103kDの新規の20P1F12/TMPRSS2免疫応答

性複合体の発現。ナイーブまたはLNCaP腫瘍保持SCIDマウスのいずれか由来の血清100  $\mu$ l (A) または指示されたヒト臨床血清試料1ml (B) が、以下のように共有結合された1F9抗TMPRSS2モノクローナル抗体/プロテインGアガロースビーズを用いて免疫沈降された。SCIDマウス血清およびヒト血清を、RIPA緩衝液(25mM トリス、pH7.5、150mM NaCl、1% トライトン-X-100、0.5% ソジウムデオキシコレート、0.1% SDS、0.5mM EDTA)を用いてそれぞれ1mlおよび2mlに調節し、そしてプロテインGアガロースビーズを用いて4 にて3時間、事前に精製した。1F9抗TMPRSS2 mAbは、「抗体の使用、実験マニュアル」、HarlowおよびLane、1999、pg323、に記載されているように、ホモ二官能性クロスリンキング試薬ジメチルピメリミデート(DMP)を用いてプロテインGビーズに共有結合された。その後、50  $\mu$ lの1F9/プロテインGビーズの50%懸濁物(~50  $\mu$ gのmAb)を各試料に添加し、そして4 10  
で一晚インキュベーションした。免疫沈降物はRIPA緩衝液中で4回洗浄し、そして免疫複合体は40  $\mu$ lの3xSDS-PAGE試料緩衝液の添加および加熱により解離させた。25  $\mu$ l/レーンの指定された免疫沈降物またはLNCaP調整組織培養培地、または(C)28歳の事故犠牲者である男性の正常前立腺由来の指定された量の全組織溶解物は、SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロースに転写し、そして図19に記載されているように、1F9 mAbを用いた抗TMPRSS2ウエスタン分析に供した。矢印は32kDの20P1F12/TMPRSS2切断断片および103kDの新規の抗TMPRSS2免疫応答性バンドを示す。パネルAの下部のより強い露光は、LNCaP腫瘍保持マウス血清中の32kD断片をよりよく可視化するために提示されている。

【図24】正常精漿中の20P1F12/TMPRSS2の32kD切断断片および新規の90kDの20P1F12/TMPRSS2免疫応答性複合体の発現。パネルA：LAPC-4およびLAPC-9 SCIDマウス異種移植片およびLNCaPおよびLAPC-4細胞株培養、または正常精漿の組織溶解物を、抗TMPRSS2 mAb1F9を用いたウエスタン分析に供した。パネルB：正常精漿または、チャコール/デキストラン除去した2%FBS中で4日間インキュベーションし、そしてその後10nMのミボレロンの存在(+)または非存在(-)において48時間インキュベーションしたLNCaP細胞の細胞溶解物および調整上清が、1F9 mAbを用いた免疫沈降法およびウエスタン分析に供された。矢印は、32kDの切断断片、全長70kDの20P1F12/TMPRSS2タンパク質、および、それぞれ調整LNCaP上清および精漿中に存在する新規の103kDおよび90kDの20P1F12/TMPRSS2免疫応答性複合体を示す。 20

【図25】7個の抗TMPRSS2モノクローナル抗体によるLAPC-9前立腺癌異種移植片、LNCaP前立腺癌細胞株、および正常精液における20P1F12/TMPRSS2タンパク質発現の検出。LAPC-9 SCIDマウス異種移植片、ミボレロン刺激LNCaP細胞(10nMで48時間)および正常ヒト精漿の組織溶解物は10~20%のSDS-PAGE勾配ゲルにより分離し、ニトロセルロースに転写し、そして以下のように7個の抗TMPRSS2モノクローナル抗体ハイブリドーマの調整無血清培養上清を用いたウエスタン分析に供した。プロットは、最初に、TBS(25mM トリスpH7.5、150mM NaCl)+3%脱脂ミルクを用いて、室温で2時間ブロッキングした。プロットはその後、0.15% ツィーン20を含む高塩TBS(hTBS; 25mM トリスpH7.5、500mM NaCl)(hTBS-T)および1%脱脂ミルク中で、1:6希釈の調整無血清ハイブリドーマ上清を用いて4 30  
で一晚インキュベーションした。プロットはhTBS-Tを用いて3回洗浄し、そしてその後、hTBS-T+1%ミルク中で、1:4000希釈のヤギ抗マウスIgG-HRP結合物を用いて室温にて1時間インキュベーションした。プロットはその後hTBS-Tを用いて3回洗浄した。抗TMPRSS2免疫応答性バンドは、その後増強化学発光およびオートラジオグラフィフィルムに露光することにより可視化した。矢印は70kDの全長20P1F12/TMPRSS2タンパク質および自己タンパク質分解による32kD切断断片および90kDの精漿バンドを示す。 40

【図26】正常大腸組織と比較しての、大腸癌細胞株および大腸癌組織試料における20P1F12/TMPRSS2の32kD切断断片の高発現。マッチングされた大腸癌組織または正常隣接組織(プロットの左サイド)を表す臨床標本の溶解物、および大腸癌細胞株(プロットの右サイド)、およびLAPC4およびLAPC9前立腺癌異種移植片の溶解物が1F9 mAbを用いた抗TMPRSS2ウエスタンプロット分析に供された。矢印は、32kD自己触媒断片および70kD全長20P1F12/TMPRSS2タンパク質の位置を示す。32kD断片の、マッチングされた正常隣接組織における発現よりも高い発現が、大腸癌組織において見られる。同様に、大腸癌細胞株に存在す 50

る優勢な免疫応答性種はまた32kD断片である。興味深いことに、大腸試料においては全長20P1F12/TMPRSS2タンパク質の非常に低い発現しかないが、しかし32kD断片の複合体を表しうる~90kDの抗TMPRSS2免疫応答性バンドの強い発現が大腸組織において存在する。

【図27A-C】親PC3細胞および20P1F12/TMPRSS2を安定的に発現しているPC3細胞を、トランスウェルインサートシステム（ベクトンディッキンソン）を用いて、それらの浸潤能に関してアッセイした。細胞に蛍光色素、すなわちカルセインをロードし、そしてトランスウェルインサートの上部ウェルに播種した。浸潤は、全細胞集団の蛍光に対する、低部チャンパー内の細胞の蛍光を測定することにより決定した。アッセイ法は3回実施した。

【図28】20P1F12/TMPRSS2のプロテアーゼ活性。精製組換えGST-20P1F12/TMPRSS2（255~492位のアミノ酸）が、フルオレセイン-チオカルバモイル標識（FTC）カゼイン（モリキュラープローブ）を基質として用いて、プロテアーゼ活性に関してアッセイされた。異なる用量のGST-20P1F12/TMPRSS2をFTC-カゼインとともに37℃にて、全体で6時間インキュベーションした。蛍光は蛍光光度計を用いて10分間隔で測定した。20P1F12/TMPRSS2によるカゼインの切断は蛍光の増加により検出される。アッセイは3回実施した。

【図29】精製組換え20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質の浸潤に対する効果。カルセインロードされたPC3細胞を、培地のみ、または20P1F12/TMPRSS2プロテアーゼドメインを含む精製組換え融合タンパク質、すなわちGST-TMPRSS2（255~492位のアミノ酸）存在下において、浸潤チャンパー内に播種した。精製GSTが対照として使用された。浸潤は、全細胞集団の蛍光に対する、低部チャンパー内の細胞の蛍光を測定することにより決定された。アッセイ法は3回実施した。

【図30】カルセインロードされたPC3細胞を、培地のみ、または1ng/mlの精製組換え20P1F12/TMPRSS2融合タンパク質、すなわちGST-TMPRSS2（255~492位のアミノ酸）存在下において、浸潤チャンパー内に播種した。対照または抗TMPRSS2（1F9）mAbを指示された試料に添加した。浸潤は、全細胞集団の蛍光に対する、低部チャンパー内の細胞の蛍光を測定することにより決定した。アッセイ法は3回実施した。

【図31】20P1F12/TMPRSS2アンチセンスオリゴヌクレオチド。LNCaP細胞は10または30μMのFITC標識モルフォリノオリゴヌクレオチドのいずれかを用いてスクレイブロードした。細胞は24時間増殖させ、フローサイトメトリーを用いて蛍光に関して評価した。このヒストグラムはモルフォリノオリゴヌクレオチドに暴露した細胞の100%がロード後24時間においてこれらオリゴヌクレオチドを保持していることを示す。

【図32】20P1F12/TMPRSS2アンチセンスオリゴヌクレオチドは20P1F12/TMPRSS2タンパク質レベルを減少させる。LNCaP細胞は10または30μMのモルフォリノオリゴヌクレオチドのいずれかを用いてスクレイブロードした。細胞は48時間増殖させ、抗TMPRSS2 1F9抗体を用いてウエスタンブロッティングにより20P1F12/TMPRSS2発現を評価した。20P1F12/TMPRSS2アンチセンスオリゴヌクレオチドにより、LNCaP細胞における全長20P1F12/TMPRSS2の発現を特異的に消滅する能力が証明される（レーン3および4）。

【図33】患者癌標本におけるTMPRSS2の発現。TMPRSS2の発現を、RNAドットプロット上のヒト腎臓癌（T）および各々のマッチングされた正常組織（N）（正常組織は腫瘍に隣接する正常領域から採取した）のパネルにおいてアッセイした。腎臓組織において、TMPRSS2発現は腫瘍組織と比較して、正常においてほとんどで検出される。ある1つの例においては、TMPRSS2は正常組織と比較して腫瘍組織において増加調節されているようである。

【図34】プロテアーゼドメイン切断に続く、TMPRSS2 LDLRA/SRCRドメイン断片の認識。プロテアーゼドメインを欠失するTMPRSS2細胞外領域に対するマウスポリクロナール抗体（pAb）が、LDLRAおよびSRCRドメイン（111~255位のアミノ酸）をコードする金属キレート親和性精製タグ5タンパク質を用いた免疫により生成された。この血清は、2%チャコール-デキストラン除去FBSを含むRPMI培地中でインキュベーションすることにより、3日間アンドロゲンを欠乏させた（-A）、または欠乏させ、そして20nMミボレロンとともにインキュベーションすることにより48時間アンドロゲンを用いて再刺激された（+A）LNCaP前立腺細胞株のウエスタンブロット分析において使用した。細胞溶解物は調整し、そして抗

10

20

30

40

50

LDLRA/SRCRマウス血清の1:500希釈物を用いたウエスタンブロット、またはTMPRSS2プロテアーゼドメインを認識する2μg/mlの1F9 MAbを用いたウエスタンブロットに供した(図34B)。1F9 mAbにより認識される全長70kDのTMPRSS2および32kDのプロテアーゼドメイン、およびマウスpAbにより認識される全長およびLDLRA/SRCRドメインを含む40kDの切断後断片が矢印で示されている。これらのドメインはまた図34Aにおいて概略的に図示される。

【図35】図35は様々な条件下でのHUVEC細胞における、TMPRSS2による管形成の阻害を示す。

【図36】図36はTMPRSS2によるHUVEC増殖の阻害を示す。

【図37】PC3細胞におけるTMPRSS2の恒常的発現により皮下腫瘍形成が増強する。PC3細胞は標準的レトロウイルス遺伝子送達を用いて感染によりTMPRSS2 cDNAを発現するように設計した。雄SCIDマウスは腫瘍または対照細胞を用いて注射する。腫瘍測定は21日目に実施し、そして続く3.5週の間、週に2回実施した。

【図38】1F9抗TMPRSS2 MAbによるLAPC-9腫瘍形成の増強。A.腫瘍増殖に対する抗体の効果。B.血清PSAに対する抗体の効果。

【図39】マウスポリクロナール抗体によるLNCaP細胞上のTMPRSS2 LDLRA/SRCRドメインの認識。

【図40】ヒト血清における相対的抗TMPRSS2 LDLRA/SRCR抗体力価。

【図1-1】

```

11      20      29      38      47      56
GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGG CGA GGG GCG GGG AGC GCC GCC TGG AGC GCG GCA
5'
65      74      83      92      101     110
GGT CAT ATT GAA CAT TCC AGA TAC CTA TCA TTA CTC GAT GCT GTT GAT AAC AGC
119     128     137     146     155     164
AAG ATG GCT TTG AAC TCA GGG TCA CCA CCA GCT ATT GGA CCT TAC TAT GAA AAC
M A L N S G S P P A I G P Y Y E N
173     182     191     200     209     218
CAT GGA TAC CAA CCG GAA AAC CCC TAT CCC GCA CAG CCC ACT GGG GTC CCC ACT
H G Y Q P E N P Y P A Q P T V V P T
227     236     245     254     263     272
GTC TAC GAG GTG CAT CCG GCT CAG TAC TAC GCG TCC CCC GTG CCC CAG TAC GCC
V Y E V H P A Q Y Y P S P V P Q Y A
281     290     299     308     317     326
CCG AGG GTC CTG ACG CAG GCT TCC AAC CCC GTC GTC TGC AGC CAG CCC AAA TCC
P R V L T Q A S N P V V C T Q P K S
335     344     353     362     371     380
CCA TCC GGG ACA GTG TGC ACC TCA AAG ACT AAG AAA GCA CTG TCC ATC ACC TTG
P S G T V C T S K T K K A L C I T L
389     398     407     416     425     434
ACC CTG GGG ACC TTC CTC CTG GGA GCT GCG GCG GCC GCT GGC CTA CTC TGG AAG
T L G T F L V G A A L A A G L L W K
443     452     461     470     479     488
TTC ATG GGC AGC AAG TGC AAC TCT GGG ATA GAG TGC GAC TCC TCA GGT ACC
F M G S K C S N S G I E C D S S G T
497     506     515     524     533     542
TGC ATC AAC CCC TCT AAC TGG TGT GAT GGC GTG TCA CAC TGC CCC GGC GGG GAG
C I N P S N W C D G V S H C P G G E
551     560     569     578     587     596
GAC GAG AAT CCG TGT GPT CGC CTC TAC GGA CCA AAC TTC ATC CTT CAG GTG TAC
D E N R C V R L Y G P N F I L Q V Y
605     614     623     632     641     650
TCA TCT CAG AGG AAG TCC TGG CAC CCT GTG TCC CAA GAC GAC TGG AAC GAG AAC
S S Q R K S W H B V C Q D D W N E N
659     668     677     686     695     704
TAC GGG CCG GGC GCC TGC AGG GAC ATG GGC TAT AAG AAT AAT TTT TAC TCT AGC
Y G R A A C R D M G Y . . N H F Y S S

```

【図1-2】

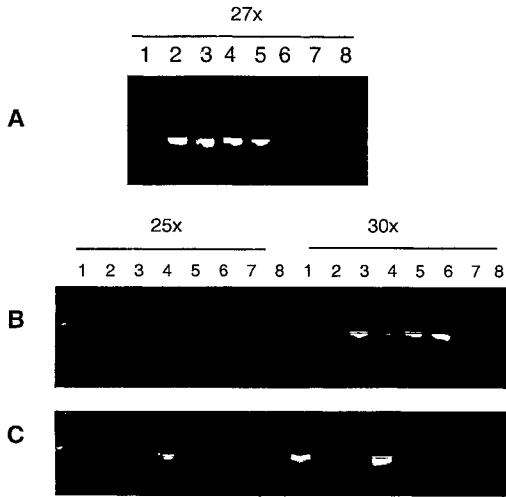
```

713     722     731     740     749     758
CAA GGA ATA GTG GAT GAC AGC GGA TCC ACC AGC TTT ATG AAA CTG AAC ACA AGT
Q G I V D D S G S T S F M K L N T S
767     776     785     794     803     812
GCC GGC AAT GTC GAT ATC TAT AAA AAA CTG TAC CAC AGT GAT GCC TGT TCT TCA
A G N V D I Y K K L Y H S D A C S S
821     830     839     848     857     866
AAA CCA GTG GTT TCT TTA CCG TGP ATA GCC TGC GGG GTC AAC TTG AAC TCA AGC
K A V V S L R C I A C G V N L N S S
875     884     893     902     911     920
CGC CAG ACC AGG ATT GTG GGC GGC GAG AGC CCG CTC CCG GGG GGC TGG CCC TGG
R Q S R I V G G E S A L P Q A W P W
929     938     947     956     965     974
CAG GTC AGC CTG CAC GTC CAG AAC GTC CAC GTG TGC GGA GGC TCC ATC ACC
Q V S L H V Q N V H V C G G S I I T
983     992     1001    1010    1019    1028
CCC GAG TGG ATC GTG ACA GGC GCC CAC TGC GTG GAA AAA CCT CTT AAC AAT CCA
P E W I V T A A H C V E K P L N N P
1037    1046    1055    1064    1073    1082
TGG CAT TGG ACG GCA TTT GCG GGG ATT TTG AGA CAA TCT TTC ATG TTC TAT GGA
W H W T A F A G I L R Q S P M F Y G
1091    1100    1109    1118    1127    1136
GCC GGA TAC CAA GTA GAA AAA GTG ATT TCT CAT CCA AAT TAT GAC TCC AAG ACC
A G Y Q V E K V I S H F N Y D S K T
1145    1154    1163    1172    1181    1190
AAG AAC AAT GAC ATT GGG CTG ATG AAG CTG CAG AAG CCT CTG ACT TTC AAC GAC
K N N D I A L M K L Q K P L T F N D
1199    1208    1217    1226    1235    1244
CTA GTG AAA CCA GTG TGT CTG CCC AAC CCA GGC ATG ATG CTG CAG CCA GAA CAG
L V K P V C L P N P G M M L Q P E Q
1253    1262    1271    1280    1289    1298
CTC TGC TGG ATT TCC GGG TGG GGG ACC ACC GAG GAG AAA GGG AAG ACC TCA GAA
L C W I S G W G A T E E K G K T S E
1307    1316    1325    1334    1343    1352
GTG CTG AAC GCT GCC AAG GTG CTT CTC ATT GAG ACA CAG AGA TGC AAC AGC AGA
V L N A A K V L L I E T Q R C N S R
1361    1370    1379    1388    1397    1406
TAT GTC TAT GAC AAC CTG ATC ACA CCA GCC ATG ATC TGT GCC GGC TTC CTG CAG
Y V Y D N L I T P A M I C A G F L Q

```

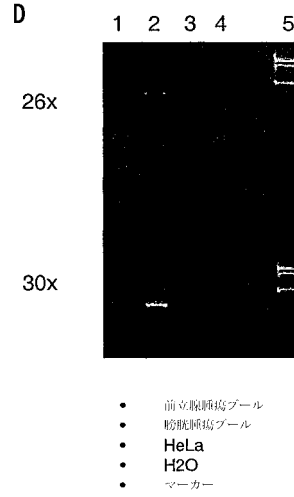


【 図 5 - 1 】



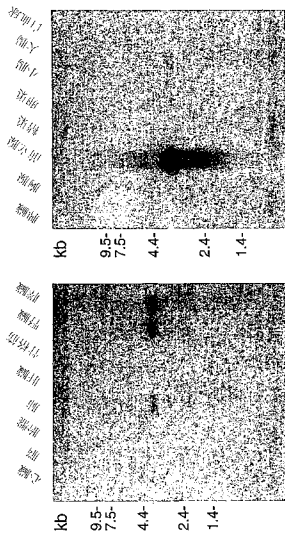
- |   |   |  |
|---|---|--|
| <p><b>A</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 脳</li> <li>2. 前立腺</li> <li>3. LAPC-4 AD</li> <li>4. LAPC-4 AI</li> <li>5. LAPC-9 AD</li> <li>6. HeLa</li> <li>7. マウス cDNA</li> <li>8. 陰性対照</li> </ol> | <p><b>B</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 脳</li> <li>2. 心臓</li> <li>3. 腎臓</li> <li>4. 肝臓</li> <li>5. 肺</li> <li>6. 脾臓</li> <li>7. 胎盤</li> <li>8. 骨格筋</li> </ol> | <p><b>C</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 大腸</li> <li>2. 卵巣</li> <li>3. 白血球</li> <li>4. 前立腺</li> <li>5. 小腸</li> <li>6. 膀胱</li> <li>7. 精巣</li> <li>8. 胸腺</li> </ol> |
|---|---|--|

【 図 5 - 2 】

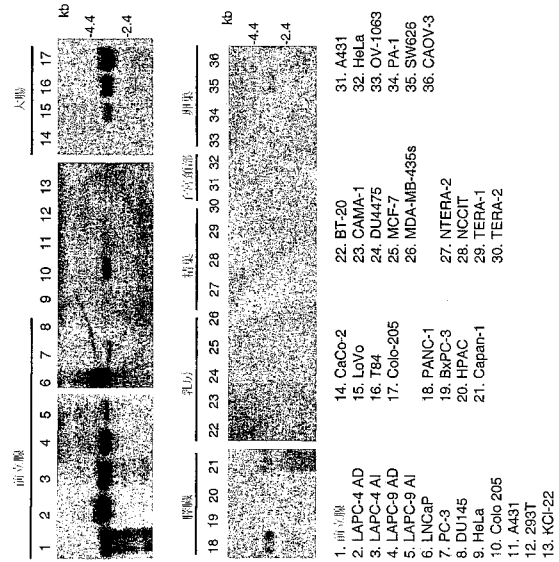


- 前立腺腫瘍プール
- 脳腫瘍プール
- HeLa
- H2O
- マーカー

【 図 6 】

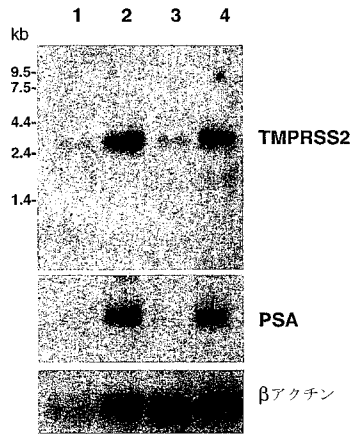


【 図 7 A 】





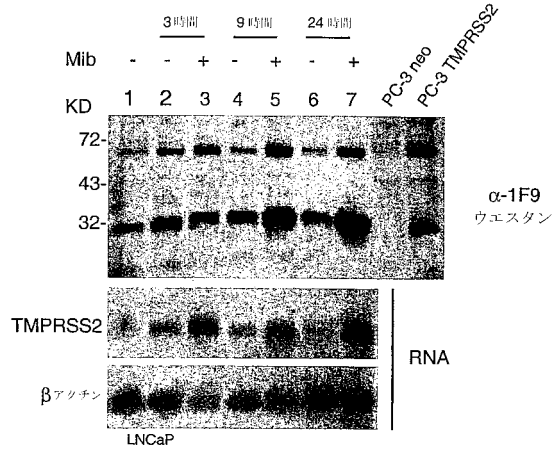
【 図 1 1 】



パネル:

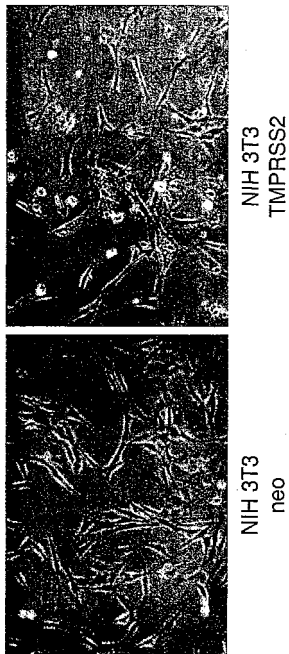
- 1. LNCaP アンドロゲン欠乏 1 週間
- 2. LNCaP FBS
- 3. LNCaP アンドロゲン欠乏 24 時間 + モック 9 時間
- 4. LNCaP アンドロゲン欠乏 24 時間 + Mib 9 時間

【 図 1 2 】

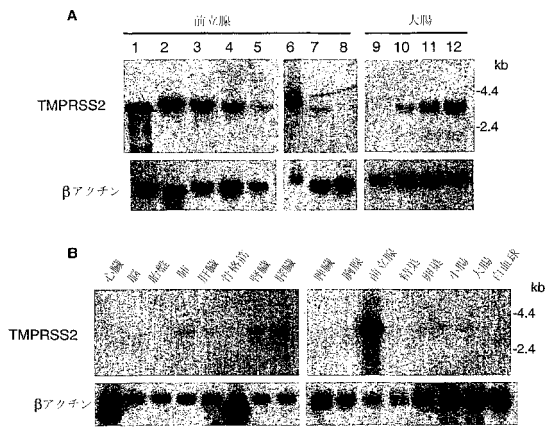


LNCaP細胞は 1 週間アンドロゲンを欠乏させ(2% CS-FBS 中で増殖させる)、そして様々な時間点において 10 nM ミビロロンを用いてその後刺激した。

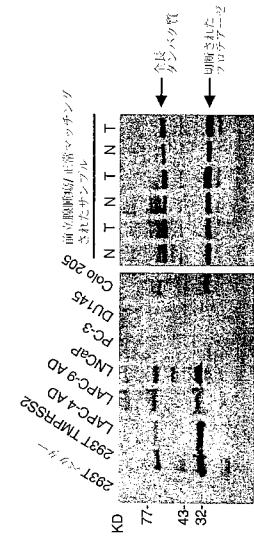
【 図 1 3 】



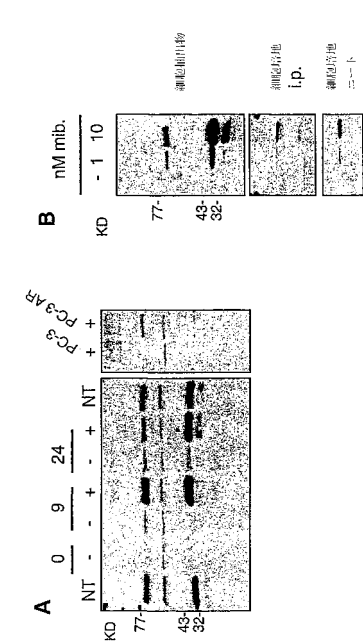
【 図 1 4 】



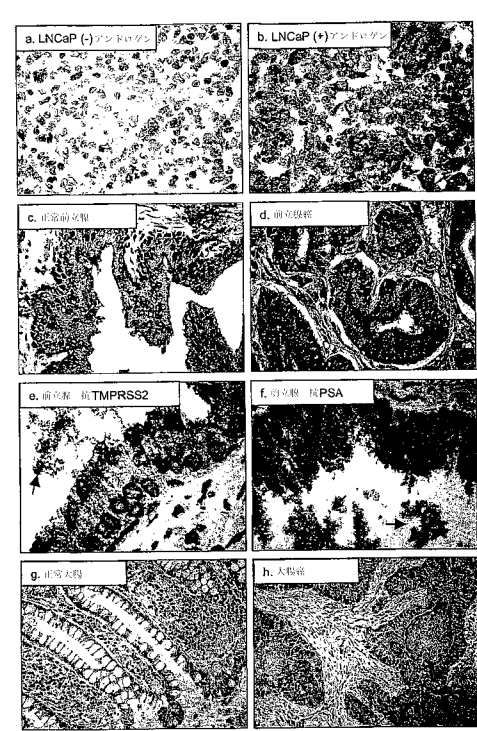
【 図 1 5 】



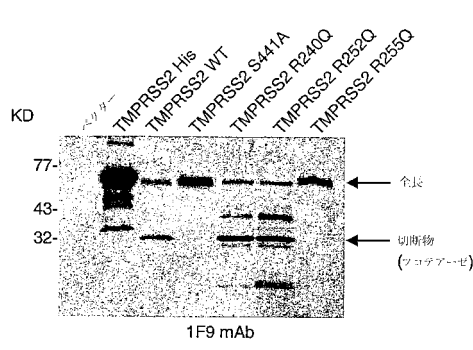
【 図 1 6 】



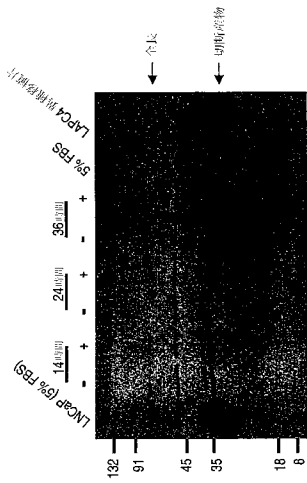
【 図 1 7 】



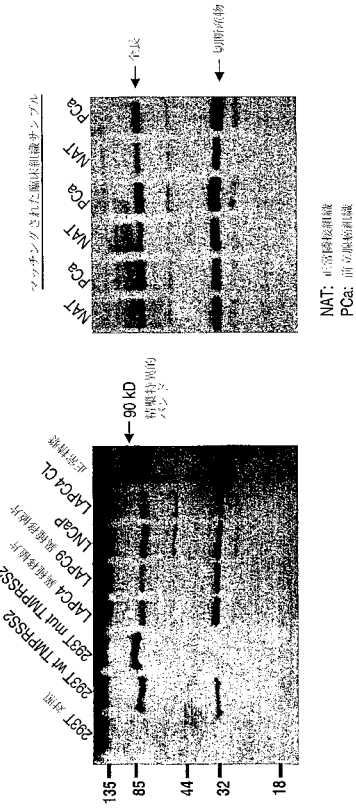
【 図 1 8 】



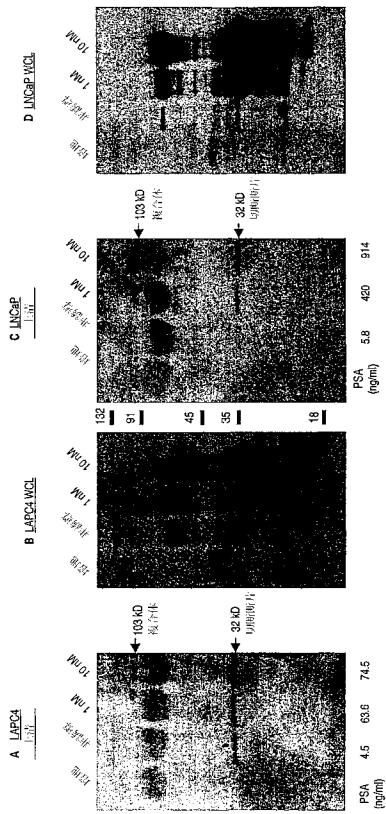
【 図 1 9 】



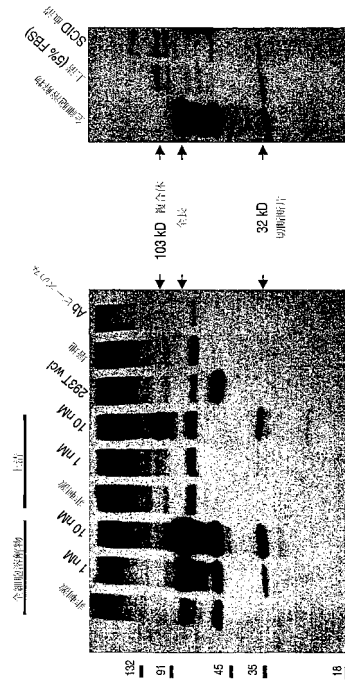
【 図 2 0 】



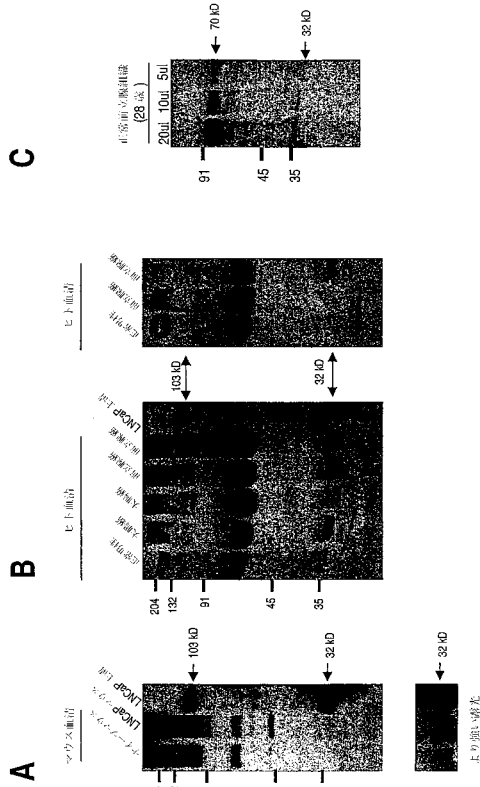
【 図 2 1 】



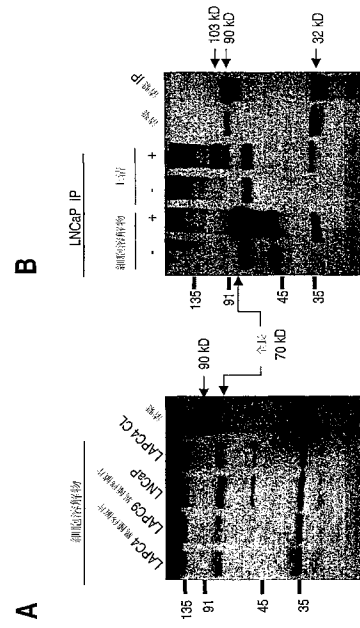
【 図 2 2 】



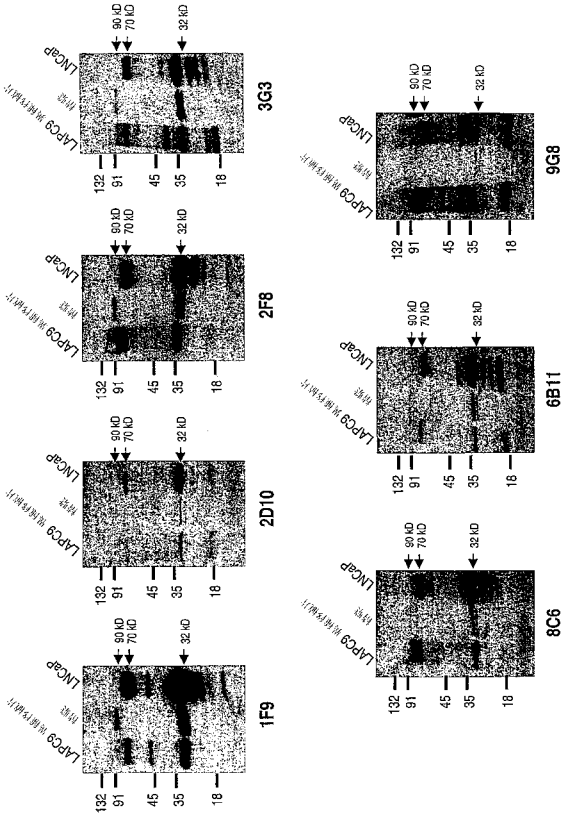
【 2 3 】



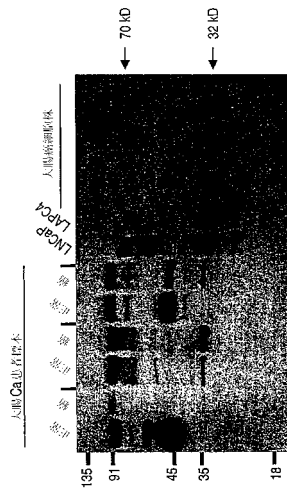
【 2 4 】



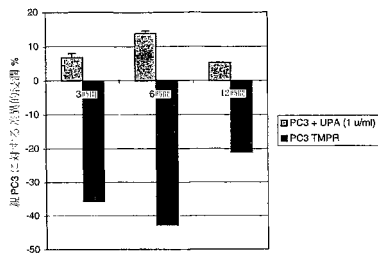
【 2 5 】



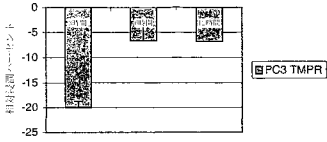
【 2 6 】



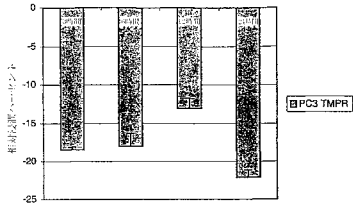
【 2 7 A 】



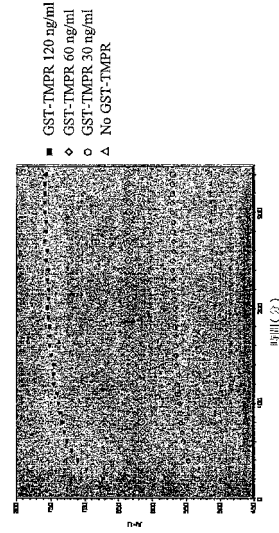
【 図 27 B 】



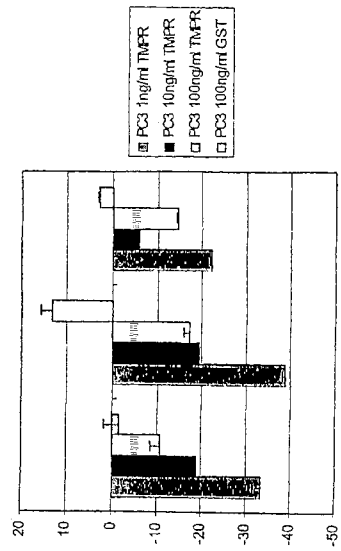
【 図 27 C 】



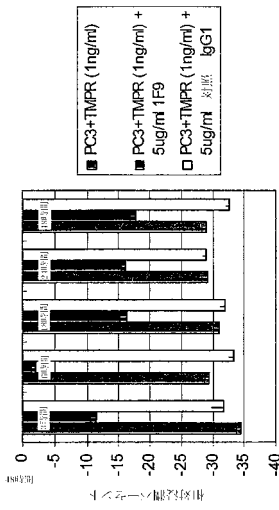
【 図 28 】



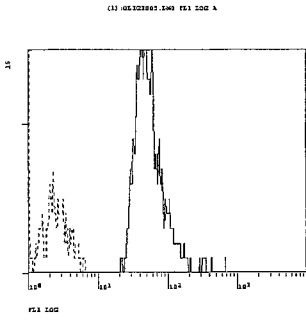
【 図 29 】



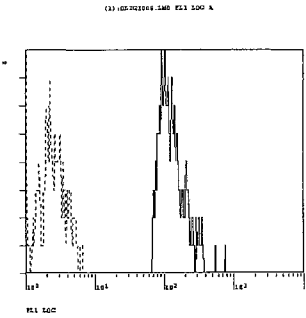
【 図 30 】



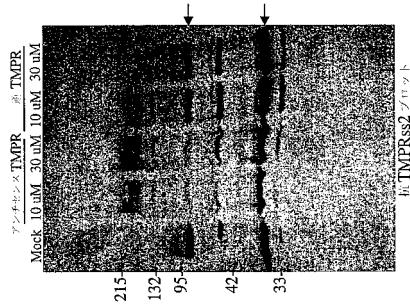
【 図 3 1 A 】



【 図 3 1 B 】



【 図 3 2 】



【 図 3 3 】

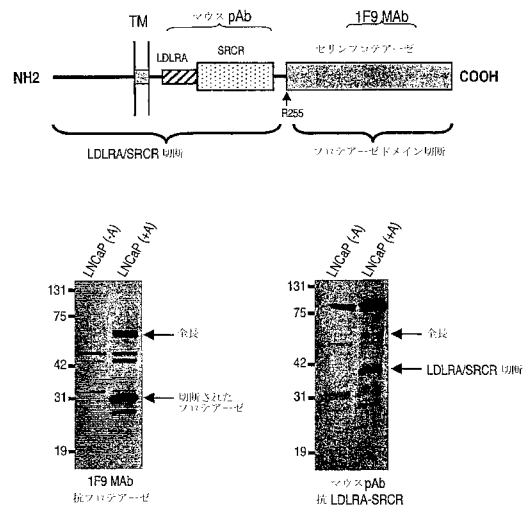
患者腎臓癌標本における TMPRSS2 の発現



T = 腫瘍 RNA  
N = 正常腎臓組織 RNA

【 図 3 4 】

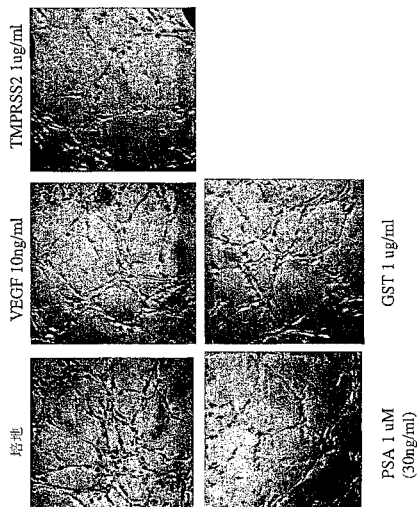
プロテアーゼドメイン切断に続く、TMPRSS2 LDLRA/SRCR ドメイン断片の認識



患者腎臓癌標本における TMPRSS2 の発現

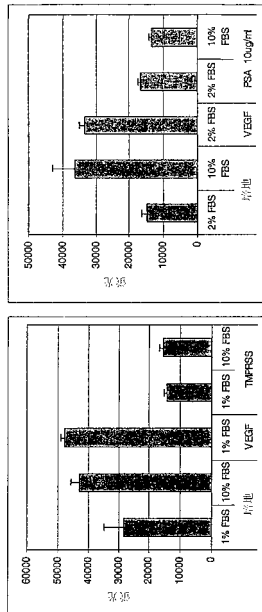
【 図 3 5 】

GST-TMPRSS2 は HUVEC における管形成を阻害する



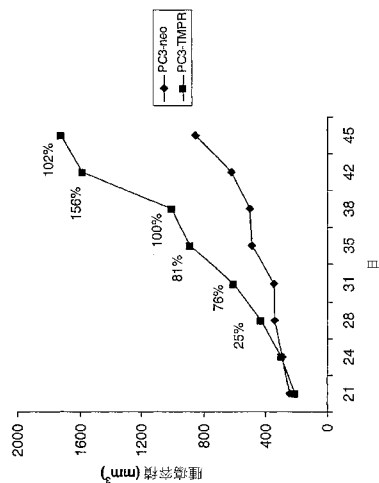
【 図 3 6 】

TMPRSS2はHUVEC増殖を阻害する



【 図 3 7 】

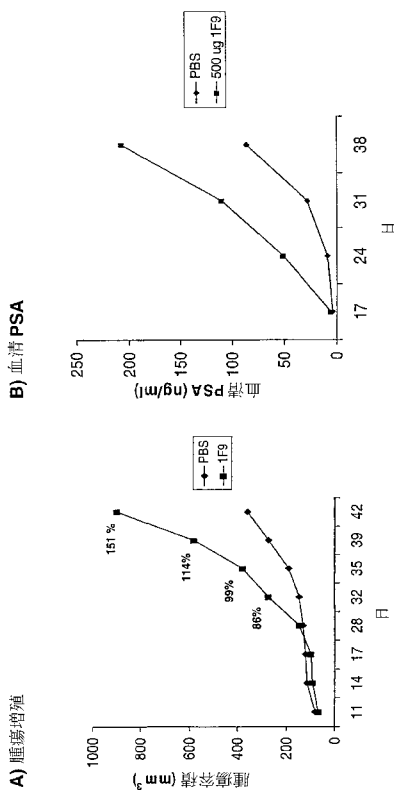
PC3細胞におけるTMPRSS2の恒常的発現は皮下腫瘍形成の増強を結果として生じる



各群は1 x 10<sup>6</sup>のマトリゲル中の指示された細胞を右皮下側腹部に注射された7匹のマウスからなる

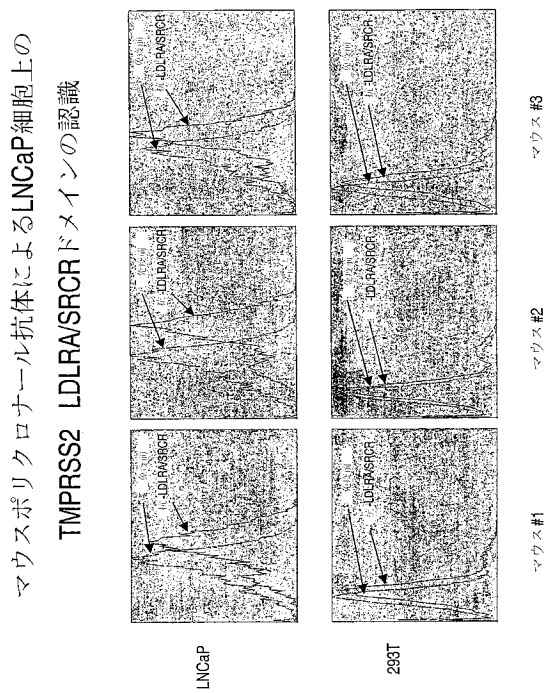
【 図 3 8 】

1F9 抗TMPRSS2 MabによるLAPC-9腫瘍形成の増強



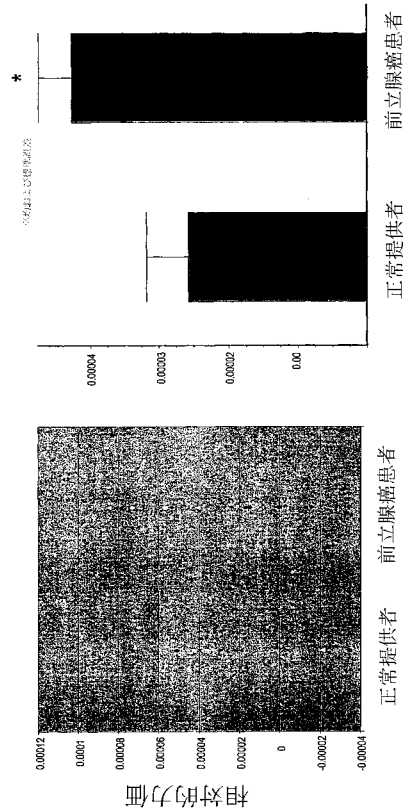
- 500 ugの1F9が0, 3, 5, 7, 9, および12日に注射された
- PBS群に関しては n = 8; 1F9 群に関しては n = 6

【図39】



【図40】

ヒト血清における相対的抗TMPRSS2 LDLRA/SRCR抗体の力価



## 【配列表】

2009148264000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成21年1月26日(2009.1.26)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号：2のアミノ酸配列又はATCC寄託番号207097に含まれるcDNAによりコードされるアミノ酸配列からなる20P1F12/TMPRSS2タンパク質を発現する膀胱癌細胞、肺癌細胞、卵巣癌細胞、または転移癌細胞を治療するための組成物であって、該20P1F12/TMPRSS2タンパク質の細胞外ドメイン内のエピトープに特異的に結合する、有効量の抗体又はその断片を含み、該抗体又はその断片が、腫瘍細胞が細胞障害剤にさらされるように細胞障害剤と共役する、前記組成物。

## 【請求項2】

抗体が主に配列番号：2のタンパク質の細胞表面関連ドメイン内のエピトープと結合する、請求項1記載の組成物。

## 【請求項3】

エピトープが、配列番号：2に記載の配列の255～492位のアミノ酸を含む、請求項2記載の組成物。

## 【請求項4】

細胞障害剤が放射性同位元素である、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 5】

細胞障害剤が化学療法剤である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 6】

配列番号：2 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むベクター及び生理学的に許容される担体を含む、配列番号：2 のアミノ酸配列又は ATCC 寄託番号 207097 に含まれる cDNA によりコードされるアミノ酸配列からなる 20P1F12/TMPRSS2 タンパク質を発現する膀胱癌細胞、肺癌細胞、卵巣癌細胞、または転移癌細胞を治療するための組成物。

## 【請求項 7】

ベクターがウイルスベクターである、請求項 6 記載の組成物。

## 【請求項 8】

膀胱癌、肺癌、卵巣癌、または転移癌に対応する生体試験試料における 20P1F12/TMPRSS2 遺伝子産物の発現レベルを評価する段階、

対応する正常試料における 20P1F12/TMPRSS2 遺伝子産物の発現レベルを評価する段階、および、

試験試料における遺伝子産物の発現レベルと対応する正常試料における遺伝子産物の発現レベルを比較する段階を含む、個体における膀胱癌、肺癌、卵巣癌、または転移癌の検出方法であって、該遺伝子産物は配列番号：2 のアミノ酸配列を含むタンパク質または該アミノ酸配列をコードする mRNA であり、対応する正常試料と比較した試験試料における遺伝子産物の発現レベルの増加によって、膀胱癌、肺癌、卵巣癌、または転移癌が示される、前記方法。

## 【請求項 9】

腎臓組織の試験試料における配列番号：2 のタンパク質をコードする遺伝子産物の発現レベルを決定する段階、

腎臓組織の正常試料における該遺伝子産物の発現レベルを決定する段階、および、

試験試料における遺伝子産物の発現レベルと対応する正常試料における遺伝子産物の発現レベルを比較する段階を含む、腎臓癌の証拠を生体試料において検査する方法であって、該遺伝子産物は配列番号：2 のアミノ酸配列を含むタンパク質または該アミノ酸配列をコードする mRNA であり、対応する正常試料と比較した試験試料における遺伝子産物の発現レベルの減少によって試験試料が腎臓癌に関係することが示される、前記方法。

## 【請求項 10】

生体試料におけるタンパク質の発現レベルがタンパク質及び抗体またはその抗原結合断片を含む免疫反応性複合体の有無を観察することにより評価される、請求項 8 または 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

遺伝子産物の発現レベルが、ノーザン解析、ポリメラーゼ連鎖反応解析、及び、免疫測定法からなる群より選択される方法により評価される、請求項 8 または 9 に記載の方法。

## 【請求項 12】

癌が転移癌であり、試験試料及び正常試料が血液、血清、便、尿、精液、及び生検組織からなる群より選択される、請求項 8、10 及び 11 のいずれかに記載の方法。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/574	A

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 セーフラーン ダグラス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンジェルス # 2 0 4 ベラジオ ロード 1 1 7 2 0

(72)発明者 ライタノ アーサー ビー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンジェルス クッシュドン アベニュー 1 0 8 0 7

(72)発明者 ヒューバート レーン エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンジェルス ノース オクシデンシャル ブルーバード  
1 6 4 4

(72)発明者 ジャコボビッツ アヤ

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

(72)発明者 ファリス マリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンジェルス アルマデン コート 2 5 3 8

(72)発明者 チャリッタ - エイド ピア エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 エンチノ モリソン ストリート 1 5 7 4 5

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA14 CA04 DA06 EA04 HA14

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ53 QR32 QR62 QS16 QS25 QS34 QX01

4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 CC03 DD61 EE01 GG01

专利名称(译)	肿瘤抗原可用于诊断和治疗膀胱癌，卵巢癌，肺癌和肾癌		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009148264A</a>	公开(公告)日	2009-07-09
申请号	JP2008329870	申请日	2008-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	艾更斯司股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Agensys公司		
[标]发明人	セーフラードグラス ライタノアーサービー ヒューバートレーンエス ジャコボビッツアヤ ファリスマリー チャリッタエイドピアエム		
发明人	セーフラードグラス ライタノアーサービー. ヒューバートレーンエス. ジャコボビッツアヤ ファリスマリー チャリッタ-エイドピアエム.		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 A61K39/395 A61K39/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P35/02 A61P9/10 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/14 A61P7/02 A61P27/02 A61P27/06 A61P15/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P29/00 A61P11/00 A61P17/02 A61P1/04 A61P19/08 A61P7/00 A61P15/08 A61P31/00 G01N33/53 G01N33 /574 A61K38/00 A61K48/00 A61P13/12 C12N9/64 C12Q1/02 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P1/04 A61P7/00 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/08 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P27 /02 A61P27/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 C12N9/6424 C12Q1/6886 C12Q2600/136 G01N33/57484		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A A61K39/395.N A61K39/395.D A61K39/00.H A61P35/00 A61P35/04 A61P35/02 A61P9/10 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/14 A61P9/10.103 A61P7/02 A61P27/02 A61P27/06 A61P15/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P29/00 A61P11/00 A61P17/02 A61P1/04 A61P19/08 A61P7/00 A61P15/08 A61P31/00 G01N33/53.D G01N33/574.A C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063 /QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/DD61 4C085 /EE01 4C085/GG01		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	09/615285 2000-07-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供用于诊断和治疗源自或基于前列腺特异性雄激素调节的细胞膜结合分泌性丝氨酸蛋白酶的膀胱癌，肺癌，卵巢癌和肾癌的组合物。解决方案：20P1F12 / TMPRSS2基因的全长cDNA。与20P1F12 / TMPRSS2蛋白结合的抗体，包括用检测标记或毒素标记的抗体及其多肽片段，或治疗组合物。生物样品的预测和诊断方法，将20P1F12 / TMPRSS2的状态与相应正常样

品的状态进行比较。生物样品中20P1F12 / Tmprss2状态的变化与细胞不受控制的增殖有关。还包括用于治疗膀胱癌，肺癌，卵巢癌和肾癌的各种治疗组合物和策略，特别是20P1F12 / Tmprss2抗体治疗和组合物，癌症疫苗和小分子治疗。 [选择图]无

一文字	三文字	完全な名前
F	Phe	フェニルアラニン
L	Leu	ロイシン
S	Ser	セリン
Y	Tyr	チロシン
C	Cys	システイン
W	Trp	トリプトファン
P	Pro	プロリン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
I	Ile	イソロイシン
M	Met	メチオニン
T	Thr	スレオニン
N	Asn	アスパラギン
K	Lys	リジン
V	Val	バリン
A	Ala	アラニン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
G	Gly	グリシン