

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-513332  
(P2004-513332A)

(43) 公表日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 4 B O 2 4
CO 7 K 14/47	CO 7 K 14/47	4 B O 6 4
CO 7 K 16/18	CO 7 K 16/18	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	GO 1 N 33/577	Z 4 H O 4 5
C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 15/00	A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 147 頁) 最終頁に続く

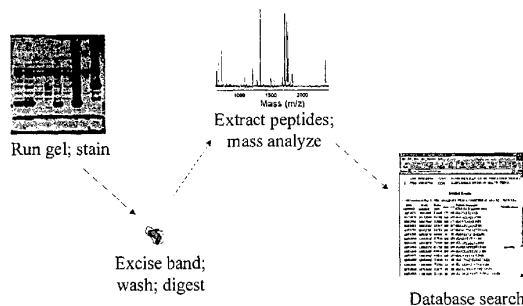
(21) 出願番号	特願2002-527798 (P2002-527798)	(71) 出願人	501475594 ジェンザイム、コーポレーション GENZYME CORPORATION アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケンブリッジ、ワン、ケンダル、スクエア (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成13年9月18日 (2001.9.18)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月18日 (2003.3.18)	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/029238	(72) 発明者	ニコレット チャールズ エイ. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 フレミングム ミル ストリート 4
(87) 国際公開番号	W02002/023202		
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002.3.21)		
(31) 優先権主張番号	60/233, 586		
(32) 優先日	平成12年9月18日 (2000.9.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/262, 835		
(32) 優先日	平成13年1月19日 (2001.1.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/303, 751		
(32) 優先日	平成13年7月6日 (2001.7.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 質量分析法 (MALDI-TOF) に基づいて抗体標的を同定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、新規な治療用のポリペプチド抗原およびエピトープを同定する方法に関する方法を提供する。これらの方法は、抗体を主体とする免疫療法のための特に有効な標的となるポリペプチドを選択することを目的として設計されている。本発明はさらに、対象における免疫応答を誘導するのに有用な、治療用のポリペプチド抗原およびエピトープポリペプチドも提供する。さらに本発明は、これらのポリペプチド抗原およびエピトープを標的とする抗体、ならびに対象における疾患の進行を抑制するためにこれらの抗体を用いるための方法も提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血清抗体を特異的に認識してそれと結合する、関心対象の表現型と相関するポリペプチドを同定するための方法であって、該当する 1 つまたは複数の細胞または組織で差異を伴って発現される特徴づけられた遺伝子のリストおよび特徴づけられたポリペプチドのリストに共通するポリペプチドを同定する段階を含み、それによって該関心対象の表現型と相関する該ポリペプチドを同定する方法。

## 【請求項 2】

ポリペプチドが膜会合型である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

遺伝子が細胞または組織の種類によって特徴づけられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

リストの遺伝子が遺伝子産物の性質によって特徴づけられ、該性質が、血清抗体との特異的反応性、該当する細胞株または組織における高発現、該当する細胞株または組織における検出可能な発現がほとんどまたは全くないこと、および該当する細胞株または組織における固有の発現からなる群より選択される、請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 5】

2 つまたはそれ以上の性質が遺伝子産物の性質を特徴づける、請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

分子量の性質をさらに含む、請求項 4 または 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

リストのタンパク質の特徴のリストが、質量、血清抗体との反応性、ペプチダーゼ消化パターン、酵素消化パターンおよび MALDI - TOF 選択基準からなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

2 つまたはそれ以上の性質が遺伝子産物の性質を特徴づける、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 9】

分子量の性質をさらに含む、請求項 7 または 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

MALDI - TOF 選択基準が、データベースの選択、種、消化物の種類、CNBr、誤切断 (miscleavage) の数、分子量の範囲、不純物混入の指標、および質量の精度からなる群より選択される、請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 11】

該当する細胞または組織を、抗ウイルス療法、抗生物質療法、化学療法および免疫療法からなる群より選択される治療法によって治療された患者から単離する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 12】

免疫療法が、癌ワクチン、抗体療法および養子免疫療法による治療から選択される、請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 13】

抗原を特異的に認識してそれと結合する抗体を単離することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 14】

請求項 1 記載の方法によって同定されたポリペプチド。

## 【請求項 15】

請求項 14 記載の方法によって単離された抗体。

## 【請求項 16】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 15 記載の抗体。

## 【請求項 17】

請求項 16 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。

10

20

30

40

50

## 【請求項 18】

請求項 14 記載の単離されたポリペプチドと担体とを含む組成物。

## 【請求項 19】

請求項 14 記載のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 20】

請求項 19 記載のポリヌクレオチドの相補物。

## 【請求項 21】

請求項 19 記載の単離されたポリヌクレオチドと担体とを含む組成物。

## 【請求項 22】

担体が薬学的に許容される担体である、請求項 18 または 21 記載の組成物。 10

## 【請求項 23】

請求項 19 記載のポリヌクレオチドを含む遺伝子送達媒体。

## 【請求項 24】

請求項 19 記載のポリヌクレオチドを含む、単離された宿主細胞。

## 【請求項 25】

請求項 14 記載のポリペプチドを含む、単離された宿主細胞。

## 【請求項 26】

細胞が抗原提示細胞 (APC) であり、ポリペプチドが細胞表面のクラス II MHC 分子によって提示される、請求項 25 記載の宿主細胞。

## 【請求項 27】

抗原提示細胞 (APC) が樹状細胞である、請求項 26 記載の宿主細胞。 20

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国成文法第 35 編 119 条 (e) 項 (35 U.S.C. § 119 (e)) に基づき、それぞれ 2000 年 9 月 18 日、2001 年 1 月 19 日および 2001 年 6 月 6 日に提出された米国特許仮出願第 60/233,586 号、第 60/262,835 号および第 60/303,751 号に対する優先権を主張するものである。これらの出願の内容は参照として本開示に組み入れられる。

## 【0002】

技術の分野

本発明は、免疫学および抗体技術の分野に関する。 30

## 【0003】

発明の背景

癌またはウイルス感染細胞で発現される正常型または変異型の細胞抗原を標的とする抗体分子および体液性免疫応答の操作は、治療薬および診断薬を開発するための有用なアプローチとなる。免疫応答の修飾はさらに、自己免疫疾患および他の病原性表現型に対処するための有用な戦略にもなると思われる。適した性質を備えた治療用の抗体標的を同定することができれば、別の疾患の診断および治療も容易になると考えられる。

## 【0004】

抗体を基盤とする技術は、さまざまに異なる方法で適用することができる。腫瘍特異抗原を標的とする抗体の産生を誘導するためのワクチン戦略は、抗体依存性細胞傷害反応、補体依存性細胞傷害反応およびアポトーシスを生じさせる免疫療法に用いることができる (Sinkovics および Horvath (2000) Int. J. Oncol. 16 (1): 81~96)。細胞表面腫瘍抗原を標的とするモノクローナル抗体は、さまざまな種類の癌の治療に直接的な効果を発揮することが示されている (Weiner (1999) Semin. Oncol. 26: 43~51)。また、腫瘍抗原特異的なモノクローナル抗体に由来する抗体免疫複合体は、細胞傷害物質および放射性核種の送達用物質として、または診断用の造影物質としても有用である (Rosell ら (1996) Anticancer Res. 16 (4B): 2187~2192; Trail および B 40 50

ianchi (1999) 11 (5) : 584 ~ 588)。加えて、抗腫瘍抗体は腫瘍抗原の特徴を模した抗イディオタイプ抗体を誘導することが示されている。これらの抗イディオタイプ抗体は、腫瘍に対する抗腫瘍免疫応答をさらに誘導することができる (Fagerbergら (1995) 92 (11) : 4773 ~ 4777)。

【0005】

癌に対する実験的ワクチン接種によっても、腫瘍抗原に対する体液性免疫応答の誘導だけでは、腫瘍に対する治療効果を得るには十分でないことが示されている (SinkovicsおよびHorvath (2000) Int. J. Oncol. 16 (1) : 81 ~ 96)。腫瘍由来のワクチンの投与を受けた個体は治療に反応することも反応しないこともあるが、反応例および非反応例はいずれも腫瘍抗原と反応するポリクローナル抗体を産生することはできる。投与を受けた反応例において有益な治療効果を誘導した抗原タンパク質を同定することは、有効な免疫療法を開発する上で特に有用と考えられる。

10

【0006】

ウイルス感染症は免疫療法の対象となる理想的な候補である。ウイルス病原体に対する免疫応答は、AIDSの原因となるHIVなどのレンチウイルスの場合のように、有効でないことが時にある。これらのウイルスは自然変異の頻度が高いため、免疫系から逃れやすい。しかし、感染細胞の表面に提示されるCTLエピトープの豊富なプロフィールから、変異に対する耐性がほとんどない必須遺伝子における種々の異なる血清型に共通の抗原が同定され、それによってさらに有効なワクチンの設計も可能になると考えられる。

【0007】

非感染性抗原に対する免疫応答は、病的状態、例えば自己免疫、移植片拒絶反応およびアレルギーなどを引き起こすことがある。このような疾患に共通するのは、免疫応答の正常な機構が用いられて症状が生じており、このため治療に大きな困難が伴うことである。例えば、自己抗原に対する免疫応答を阻止しうる、または非病原性経路に対する免疫応答を回避させうる、抗体および/または抗原性ペプチドは、全体的な免疫能に悪影響を及ぼさずにこのような疾患の治療をもたらすと考えられている。

20

【0008】

歴史的には、病的細胞に存在する抗原性ポリペプチドは、病的細胞において特異的に発現される個々の抗原を検出する目的で、病的細胞および正常細胞の試料に由来するタンパク質試料の発現レベルを比較することによって同定された。しかし、発現レベルは細胞の局在、接近性または機能的関連の指標ではないため、抗体を主体とする免疫療法の候補を同定する上でこのアプローチの有用性は限られている。さらに最近では、発現クローニング法および免疫検出法の組み合わせが、腫瘍由来のB細胞抗原の同定に応用されている。SEREX法 (組換え発現クローニングによる抗原の血清学的同定) を用いて、この種の抗原がさまざまな種類の腫瘍から得られている (国際公開公報第00/20460号; Turreciら (1999) Hybridoma 18 (1) : 23 ~ 28)。この方法は対象における体液性免疫応答を誘発する抗原の発見には有用であるが、同定された抗原の疾患との関連性または免疫療法の標的としてのその有用性に関する有用な情報がないため、この方法では「適した性質を備えた (well-qualified)」抗原標的は得られない。実際に、ヒト腫瘍抗原を標的とする抗体の多くは治療効果をもたらさない。

30

40

【0009】

適切な抗原性ポリペプチドの解明は技術的に難しかった。抗体技術に有効なポリペプチド標的を選択するには、抗体反応を適切な組織に集中させるために十分に限定的な組織発現パターンを備えた接近可能な (accessible) 抗原を同定することが必要である。抗体ターゲティング法の場合は抗原性ポリペプチドの存在量および接近可能性が重要であるが、治療用モノクローナル抗体技術のためには抗原の機能的活性が極めて重要である。したがって、多数の抗原性ポリペプチドおよびこれらの標的を標的とする抗体を同定するために、さまざまな標的となる病的細胞または組織の試料をスクリーニングする手段があれば有用と考えられる。

【0010】

50

本発明はこれらの需要を満たすとともに、それに関連した利益も提供する。

【0011】

発明の開示

本発明は、血清抗体を特異的に認識してそれと結合する、関心対象の表現型と相関するポリペプチドを同定するための方法であって、該当する1つまたは複数の細胞または組織で差異を伴って発現される特徴づけられた遺伝子の第1のリストおよび特徴づけられたポリペプチドの第2のリストに共通するポリペプチドを同定し、それによって前記関心対象の表現型と相関する前記ポリペプチドを同定することを含む方法を提供する。ポリペプチドは血清から単離することもでき、または膜会合型ポリペプチドであってもよい。

【0012】

1つの局面において、遺伝子は細胞または組織の種類によって特徴づけられる。例えば、遺伝子がすべて、関心対象の抗原を発現することが疑われる細胞もしくは組織、癌細胞、正常細胞、ウイルス感染細胞、または自己免疫疾患と関係のある細胞から単離されたものでよい。

【0013】

さらにもう1つの局面において、第1のリストの遺伝子は遺伝子産物の性質によって特徴づけられ、この際に前記性質は、血清抗体との特異的反応性、該当する細胞株または組織における高発現、該当する細胞株または組織における検出可能な発現がほとんどまたは全くないこと、および該当する細胞株または組織における固有の発現からなる群より選択される。さらにもう1つの局面において、リストは、これらの性質の2つまたはそれ以上を有する細胞または組織に対して作られる、またはそれらに共通したものである。さらにまたもう1つの態様において、すべての細胞および組織は、分子量がある特定の範囲内、すなわち血清抗体と結合する抗原またはポリペプチドの分子量と類似した範囲またはそれを包含する範囲内にある発現産物を理由に選択される。

【0014】

もう1つの態様において、第2のリストはタンパク質の共通の特徴によって定義され、この際にこのような特徴または性質は、質量、血清抗体との反応性、ペプチダーゼ消化パターン、酵素消化パターンおよびMALDI-TOF（マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析法）選択基準からなる群より選択される。さらにもう1つの局面において、リストは、これらの性質の2つまたはそれ以上を有する細胞または組織に対して作られる、またはそれらに共通したものである。さらにまたもう1つの態様において、すべての細胞および組織は、すべての細胞および組織は、分子量がある特定の範囲内、すなわち血清抗体と結合する抗原またはポリペプチドの分子量と類似した範囲またはそれを包含する範囲内にある発現産物を理由として選択される。

【0015】

MALDI-TOFは、質量分析データに基づいてタンパク質を同定するための方法である。MALDI-TOF選択基準の例には、データベースの選択、種、消化物の種類、CNBr、誤切断（miscleavage）の数、分子量の範囲、不純物混入の指標、および質量の精度が非制限的に含まれる。

【0016】

本発明は、例えば癌、自己免疫疾患、ウイルス病原体、および多発性嚢胞腎などの変性疾患を含む、関心対象の表現型と相関する血清タンパク質、ポリペプチドまたはエピトープを同定するための方法も提供する。

【0017】

1つの態様では、血清タンパク質を、1つまたは複数の「反応性対象（responsive subject）」、すなわち、臨床的または準臨床的（subclinical）反応の存在といった望ましい表現型を有する1つまたは複数の対象から単離する。対象は、癌の場合には腫瘍負荷の軽減、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患の場合には自己免疫抗原または抗体の数の減少、多発性嚢胞腎の場合には骨脱灰の減少といった介入行為に対して良好な反応を示すことがある。しかし、本発明は、治療的介入に対する反

10

20

30

40

50

応例には限定されない。反応性対象には、病原体に曝露された対象、または疾患に対する遺伝的素因のある対象も含まれる。いずれの場合にも、「反応性」対象には、相関する表現型に付随する臨床的または準臨床的な症状、例えば、対象におけるHIVへの曝露および/またはその存在の後のAIDS、または病原体への曝露後の感染症を示さない例が含まれる。血清を、1つまたは複数の「非反応性」対象、すなわち癌、感染症またはAIDSなどのHIV関連疾患といった病的表現型を呈している例から単離する。反応例の血清と非反応例の血清との間で存在の程度または有無に差がある血清抗体は、一群のポリペプチドに対する血清をアッセイすることにより同定する。

**【0018】**

さらに別の態様では、複数の非反応性対象から血清を単離する。一群のポリペプチドに対する血清をアッセイすることにより、対象の少なくとも2例またはそれ以上に共通する血清抗体が同定されると思われる。抗体を回収し、関心対象の表現型に関する遺伝子またはペプチドの発現データとの比較により、存在の程度または有無に差がある抗体をスクリーニングする。

10

**【0019】**

さらにもう1つの態様では、抗体を回収した時点で、存在の程度または有無に差があるものをスクリーニングして単離し、関心対象の表現型に関する発現遺伝子データとの比較によってさらに分析する。1つの好ましい態様では、発現遺伝子データを、被験対象といくつかの性質を共有するように選択する。最も好ましい態様において、発現遺伝子データは、できるだけ多くの性質を共有するように一致させた組織または細胞からのものである。特に好ましい態様は、反応例からの遺伝子プロファイルと非反応例との比較である。

20

**【0020】**

または、抗体を回収し、ポリペプチドおよびそのポリヌクレオチド配列を同定するためにクロマトグラフィーおよび遺伝子アッセイ法によってスクリーニングする。

**【0021】**

本発明はさらに、本方法によって単離されたポリペプチド、ならびに診断的および治療的な有用性を確認するための方法を提供する。さらに、ポリペプチドを特異的に認識してそれと結合する抗体(モノクローナルおよびポリクローナル)も提供する。またさらに、ポリペプチドおよび抗体をコードするポリヌクレオチドも提供する。

**【0022】**

さらにまた、本発明のポリペプチドまたは抗体と特異的に結合する単離された細胞および細胞表面リガンドも提供する。さらにまた、ポリペプチド、抗体、細胞および細胞表面リガンドのそれぞれの派生物(derivative)、例えば、診断キット中にまたは薬物分子担体として用いるための標識ポリペプチド、免疫療法用のヒト化抗体、または薬物分子担体として用いるための抗体断片、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む抗原提示細胞、および抗体または抗原のそのそれぞれの標的との結合を阻止するために用いる可溶性リガンドも提供する。これらの方法を行うための試薬およびキット、さらには治療的および/または診断的な有用性を有する抗体および抗原も提供する。

30

**【0023】**

本発明のもう1つの局面は、その有無が対象における表現型と相関づけられている、抗体と結合するリガンドを同定するための方法である。リガンドを含むことが疑われる細胞の試料を対象から単離し、検出可能な標識がなされた抗体またはその誘導体の有効量と接触させる。リガンドは抗体または誘導體との結合によって同定される。リガンドを含む細胞からリガンドを同定するための方法は当技術分野で知られている。リガンドの細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを除去することにより、可溶性リガンドを単離することもできる。さらに、リガンドおよびその可溶型をコードするポリヌクレオチド、さらには、単離されたリガンドの1つまたは複数を含む組成物、リガンドをコードするポリヌクレオチド、リガンドおよび/またはリガンドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞も本明細書に提供する。

40

**【0024】**

50

ポリペプチドとそのパートナーまたは抗体とそのパートナーとの結合を減少させる被験化合物、さらにはその同定のための方法も本明細書に提供する。これらの分子を同定するためのスクリーニングは、ポリペプチドまたは抗体の試料をその結合パートナーと被験化合物の存在下および非存在下で接触させることによって行われる。抗体とポリペプチドまたは抗体とリガンドとの結合を、被験化合物を含まない試料（対照試料）と比較して阻害する分子は、抗体のポリペプチドまたはリガンドとの結合を減少させる分子として同定される。

#### 【0025】

本発明のさらにもう1つの態様は、本明細書に特定する腫瘍または他の病態を治療するための薬剤候補を同定するための方法である。本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを発現する細胞を被験化合物と接触させる。1つまたは複数のポリヌクレオチドの発現を、細胞のmRNAと前記mRNAに対して相補的な核酸プローブとのハイブリダイゼーションによって判定する。被験化合物は、それが本発明の1つまたは複数のポリペプチドの発現を低下させるならば、腫瘍を治療するための薬剤候補として同定される。代替的または追加的に、細胞は1つまたは複数のポリペプチドをコードする発現構築物をトランスフェクトした組換え宿主細胞である。

10

#### 【0026】

##### 本発明の実施様式

本開示の全体を通じて、さまざまな刊行物、特許および公開特許明細書を識別用の出典によって参照している。これらの刊行物、特許および公開特許明細書の開示内容は、本発明が属する技術の現状をより詳細に記載する目的で本開示に参照として組み入れられる。

20

#### 【0027】

本発明の実施には、別に指示する場合を除いて、当技術分野の技能の範囲に含まれる、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技法を用いる。このような技法は文献中に詳細に説明されている。これらの方法は以下の刊行物に記載されている。例えば、サムブルック（Sambrook）ら、「分子クローニング：実験マニュアル（MOLECULAR CLONING：A LABORATORY MANUAL）」、第2版（1989）；「分子生物学における最新プロトコール（CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY）」（F. M. Ausubelら編（1987））；「酵素学の方法（METHODS IN ENZYMOLOGY）」シリーズ（Academic Press, Inc.）；「PCR：実践的アプローチ（PCR：A PRACTICAL APPROACH）」（M. MacPhersonら、IRL Press at Oxford University Press（1991））；「PCR 2：実践的アプローチ（PCR 2：A PRACTICAL APPROACH）」（M. J. MacPherson、B. D. HamerおよびG. R. Taylor編（1995））；「抗体、実験マニュアル（ANTIBODIES、A LABORATORY MANUAL）」（HarlowおよびLane編（1988））、「抗体の使用、実験マニュアル（USING ANTIBODIES、LABORATORY MANUAL）」（HarlowおよびLane編（1999））；および「動物細胞培養（ANIMAL CELL CULTURE）」（R. I. Freshney編（1987））を参照されたい。

30

40

#### 【0028】

##### 定義

本明細書で用いる場合、いくつかの用語は以下に定義する意味を有するものと考えられる。

#### 【0029】

明細書および特許請求の範囲に用いる場合、単数形の「1つの（a）」、「1つの（an）」および「その（the）」は、文脈で明らかに別の指示がない限り、複数形に対する言及も含む。例えば、「1つの細胞（a cell）」という用語は、複数の細胞を含み、これにはそれらの混合物も含まれる。

50

## 【0030】

本明細書で用いる「含む (comprising)」という用語は、組成物および方法に列挙される要素を含むが、他のものも除外されないことを意味する。「本質的に...からなる (consisting essentially of)」は、組成物および方法の定義に用いる場合、その組み合わせに対して何らかの本質的な意味をもつ他の要素は除外されることを意味する。このため、本質的に本明細書に定義する要素からなる組成物には、単離および精製の方法による微量不純物、ならびにリン酸緩衝食塩水、保存料などの薬学的に許容される担体は除外されないと考えられる。「...からなる (consisting of)」は、他の成分の微量元素および本発明の組成物を投与するための実質的な方法の段階の範囲を超えるものが除外されることを意味する。これらの連結語のそれぞれによって定義される態様は本発明の範囲に含まれる。

10

## 【0031】

「天然型 (native)」または「天然の (natural)」抗原とは、天然の生物源から単離され、対象において抗原受容体、例えば、T細胞抗原受容体 (TCR)、B細胞抗原受容体 (BCR) または表面免疫グロブリンと特異的に結合することができる、ポリペプチド、タンパク質またはエピトープを含むそれらの断片のことである。

## 【0032】

「抗原」という用語は、当技術分野で周知であり、これには対象における反応を誘導する物質が含まれる。反応は、対象におけるウイルス量の減少などのように準臨床的なものでもよく、癌の場合における腫瘍負荷の減少などのように臨床的なものでもよい。

20

## 【0033】

「改変抗原」とは、対応する野生型抗原のものとは異なる一次配列を有するものことである。改変抗原は合成法または組換え法によって作製することができ、これには翻訳時または翻訳後にリン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質の加水分解切断、抗体分子、膜分子または他のリガンドとの連結などによって差異を伴って修飾される抗原性ペプチドが非制限的に含まれる (Fergusonら (1988) Ann. Rev. Biochem. 57: 285 ~ 320)。本発明の合成抗原または改変抗原は、天然のエピトープと同じTCRと結合および/または架橋することを意図している。

## 【0034】

「自己抗原」とは、本明細書で天然型または野生型の抗原とも呼ばれるが、抗原に対する自己寛容のために対象において免疫応答をほとんどまたは全く誘発しない抗原性ペプチドのことである。自己抗原の一例は、黒色腫特異抗原 gp100 である。

30

## 【0035】

「腫瘍関連抗原」または「TAA」という用語は、腫瘍に付随する、またはそれに特異的な抗原を指す。既知のTAAの例には、gp100、MARTおよびMAGEが含まれる。

## 【0036】

「反応性対象血清 (抗血清)」とは、治療後に望ましい反応を示す対象から入手したポリクローナル血清試料のことを、同様の対象、例えば同じ治療を受けたが望ましい反応を示さない対象から単離または入手した反応性ポリクローナル血清試料、すなわち「非反応性対象血清」と対比して指すものである。1つの局面において、反応性対象からの血清は、臨床的または準臨床的な反応を示す対象から得られると考えられる。

40

## 【0037】

「抗原提示細胞 (APC)」という用語は、1つまたは複数の抗原を、免疫系の特定のエフェクター細胞によって認識されうる抗原-MHC複合体の形態として提示し、それによって提示された1つまたは複数の抗原に対する有効な細胞性免疫反応を誘導することができる一群の細胞を指す。多くの種類の細胞が細胞表面に抗原を提示してT細胞により認識されうるが、有効な量の抗原を提示し、さらにT細胞を活性化して細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 反応を生じさせる能力があるのは専門的なAPCのみである。APCとしては、マクロファージ、B細胞および樹状細胞 (DC) などの無傷の全細胞; または 2 - ミ

50

クログロブリンと複合体を形成した精製MHCクラスI分子などの天然型もしくは合成型の他の分子が可能である。

【0038】

「樹状細胞(DC)」という用語は、種々のリンパ系および非リンパ系組織に認められる形態学的に類似した複数の種類の細胞から構成される多様な集団を指す(Steinman(1991)Ann. Rev. Immunol. 9:271~296)。樹状細胞は、生物体において最も強力かつ優先的なAPCである。樹状細胞の仮にすべてではないにしてもそのサブセットは骨髄前駆細胞に由来し、末梢血中に少数が循環しており、未熟なランゲルハンス細胞または終末分化した成熟細胞として認められる。樹状細胞が単球から分化することもあるが、それらは異なる表現型を有する。例えば、分化マーカーの一種であるCD14抗原は、樹状細胞には認められないが単球には存在する。また、成熟樹状細胞は一般に貪食性ではないが、単球は貪食性の強い細胞である。DCはT細胞の活性化および増殖に必要なすべてのシグナルを提供することが示されている。

10

【0039】

「免疫エフェクター細胞」という用語は、抗原と結合しうる、免疫応答を媒介する細胞を指す。これらの細胞には、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、ならびに細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、例えばCTL細胞株、CTLクローン、および腫瘍、炎症性または他の浸潤からのCTLが非制限的に含まれる。ある種の罹患組織は特異的抗原を発現し、これらの抗原に特異的なCTLが同定されている。例えば、黒色腫の約80%はgp100として知られる抗原を発現する。

20

【0040】

本明細書で用いる「免疫エフェクター分子」という用語は、抗原特異的結合を行うことのできる分子を指し、これには抗体、T細胞抗原受容体、ならびにMHCクラスIおよびクラスII分子が含まれる。

【0041】

「ナイーブな」免疫エフェクター細胞とは、抗原に一度も曝露されていない免疫エフェクター細胞のことである。

【0042】

本明細書で用いる「教育された(educated)抗原特異的免疫エフェクター細胞」とは、抗原に遭遇したことがある、その抗原に対して特異的な、上に定義した免疫エフェクター細胞のことである。教育された抗原特異的免疫エフェクター細胞は、抗原との結合によって活性化されうる。「活性化された」とは、細胞がすでにG0期になく、細胞種に特徴的なサイトカインの産生を始めたことを意味する。例えば、活性化されたCD4<sup>+</sup>T細胞はIL-2を分泌するほか、静止期のCD4<sup>+</sup>T細胞に比べて細胞表面の高親和性IL2受容体の数が多い。

30

【0043】

本発明のペプチドまたはポリペプチドは、抗体または/ならびにB細胞およびT細胞などの抗原特異的免疫エフェクター細胞によって選好的に(preferentially)認識されうる。T細胞の文脈における「認識される」という用語は、ペプチドまたはポリペプチドがプロセッシングを受け、抗原特異的T細胞の表面にあるT細胞抗原受容体(TCR)がエピトープと結合し、このような結合によってT細胞の活性化が生じるような様式で、MHC分子とともに(すなわち、結合して)APCの表面に提示されることを意図している。B細胞の場合には、抗原がB細胞受容体(BCR)と結合すると抗原は内部に取り込まれ、MHCクラスII分子と結合したペプチドとして細胞表面に再び現れる。このペプチド:MHC複合体は抗原特異的T細胞によって「認識され」、続いてそれがB細胞を活性化して抗体を分泌させる。「選好的に認識される」という用語は、本発明のポリペプチドが、上に定義した通り、関係のない抗原に対して特異的なT細胞および/または抗原によっては実質的に認識されないことを意図する。エピトープが抗体または抗原特異的T細胞によって認識されるか否かを決定するためのアッセイ法は当技術分野で知られており、本明細書にも記載している。抗体:抗原結合の文脈における「特異的に認識されて結

40

50

合する」とは、その対の構成要素が他の結合パートナーによっては実質的に認識されないことを意味する。

【0044】

本明細書で用いる「固相支持体」または「固体支持体」という用語は、互換的に用いられ、支持体の具体的な種類によっては限定されない。さらに言えば、数多くのさまざまな支持体を用いることができ、それらは当業者に知られている。固相支持体には、シリカゲル、樹脂、誘導体化されたプラスチック薄膜、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲルが含まれる。本明細書で用いる「固体支持体」には、抗原提示用合成基質、細胞およびリボソームも含まれる。適した固相支持体は、望ましい最終用途および種々のプロトコールに対する適合性に基づいて選択しうる。例えば、ペプチド合成を目的とする場合、固相支持体は、ポリスチレン（例えば、Bachem Inc. (King of Prussia, PA)、Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos, CA) などから販売されているPAM樹脂）、POLYHIPE（登録商標）樹脂（Aminotech, Canadaから販売）、ポリアミド樹脂（Peninsula Laboratories Inc. から販売）、ポリエチレングリコールによるグラフト化を施したポリスチレン樹脂（TentaGel（登録商標）、Rapp Polymer, Tubingen, Germany）またはポリジメチルアクリルアミド樹脂（Milligen/Biosearch, Novato, CAから販売）などの樹脂を指すと思われる。

10

【0045】

「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」という用語は、任意の長さのヌクレオチド重合体を指して互換的に用いられる。ポリヌクレオチドには、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび/またはそれらの類似体が含まれうる。ヌクレオチドは任意の三次元構造をとってよく、既知または未知の任意の機能を果たすものでよい。「ポリヌクレオチド」という用語には、例えば、一本鎖、二本鎖および三重らせん分子、遺伝子または遺伝子断片、エクソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、およびプライマーが含まれる。核酸分子には修飾核酸分子も含まれうる。

20

【0046】

「ペプチド」という用語は、2つまたはそれ以上のサブユニットのアミノ酸を有する化合物、アミノ酸類似体またはペプチド模倣物を指して広義に用いられる。サブユニットはペプチド結合によって連結されたものでよい。もう1つの態様において、サブユニットは他の結合、例えばエステル結合、エーテル結合などによって連結されたものでもよい。本明細書で用いる「アミノ酸」という用語は、グリシンおよびD型またはL型光学異性体の両方、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣物を含む、天然型および/または非天然型もしくは合成型のアミノ酸を指す。3個またはそれ以上のアミノ酸を有するペプチドは、ペプチド鎖が短ければ一般にオリゴペプチドと呼ばれる。ペプチド鎖が長い場合には、ペプチドは一般にポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる。

30

【0047】

「遺伝的に改変された」という用語は、細胞またはその子孫の遺伝子型または表現型を変化させる外来性の遺伝子または核酸配列を含有および/または発現することを意味する。言い換えれば、これは細胞の内因性ヌクレオチドに対する何らかの付加、除去または破壊を指す。

40

【0048】

本明細書で用いる「発現」とは、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されてペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質へと翻訳される過程を指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、適切な真核生物宿主が選択されれば、発現にはmRNAのスプライシングが含まれうる。発現に必要な調節因子には、RNAポリメラーゼと結合するためのプロモーター配列およびリボソーム結合のための転写開始配列が含まれる。例えば細菌発現

50

ベクターは、lacプロモーターなどのプロモーター、ならびに転写開始のためのシャイン-ダルガルノ配列および開始コドンAUGを含む(Sambrookら(1989)前記)。同様に、真核生物発現ベクターは、RNAポリメラーゼIIのための異種または同種プロモーター、下流ポリアデニル化シグナル、開始コドンAUG、およびリボソーム解離のための終止コドンを含む。このようなベクターは市販のものを購入することもでき、または当技術分野で周知の方法、例えばベクターの一般的な構築のための下記の方法に記載された配列によって構成することもできる。

【0049】

「遺伝子またはポリヌクレオチドのライブラリー」とは、関心対象の抗原(ポリペプチド)をコードする遺伝子を含むことが疑われる細胞または組織から単離されたヌクレオチド配列のライブラリーのことである。

10

【0050】

「ペプチドライブラリー」とは、ランダムなアミノ酸(ペプチド)配列のコンビナトリアルライブラリーのことである。

【0051】

「配列モチーフ」という用語は、一群の分子(例えば、アミノ酸またはヌクレオチド)に存在するパターンを指す。例えば、1つの態様において、本発明は、抗原に存在するペプチド中の配列モチーフの同定を提供する。この態様において、典型的なパターンは、疎水性、親水性、塩基性、酸性などの特徴的なアミノ酸残基によって特定されうる。

【0052】

「転写制御下にある」は、当技術分野でよく知られた用語であり、ポリヌクレオチド配列、通常はDNA配列の転写が、転写の開始またはその促進に寄与する因子とそれが機能的に(operatively)結合することに依存することを意味する。「機能的に結合した(operably linked)」とは、複数の因子が機能しうるような配置で並列していることを指す。

20

【0053】

「ハイブリダイゼーション」とは、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化される複合体を形成する反応のことを指す。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対合、フーグスティーン結合または任意の他の配列特異的な様式で生じるものでよい。複合体には、二重鎖構造を形成する2本のストランド、多重鎖複合体を形成する3本またはそれ以上のストランド、またはこれらの任意の組み合わせが含まれうる。ハイブリダイゼーション反応が、PCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などのように、より大規模な工程の一段階である場合もある。

30

【0054】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には以下のものが含まれる：インキュベーション温度が約25 ~ 約37；ハイブリダイゼーション用緩衝液の濃度が約6×SSC ~ 約10×SSC；ホルムアミド濃度が約0% ~ 約25%；洗浄液が約6×SSC。中等度のハイブリダイゼーション条件には以下のものが含まれる：インキュベーション温度が約40 ~ 約50；緩衝液濃度が約9×SSC ~ 約2×SSC；ホルムアミド濃度が約30% ~ 約50%；洗浄液が約5×SSC ~ 約2×SSC。高ストリンジェンシー条件の例には以下のものが含まれる：インキュベーション温度が約55 ~ 約68；緩衝液濃度が約1×SSC ~ 約0.1×SSC；ホルムアミド濃度が約55% ~ 約75%；洗浄液が約1×SSC、0.1×SSCまたは脱イオン水。一般に、ハイブリダイゼーション用のインキュベーション時間は5分間 ~ 24時間であり、これに1回、2回またはそれ以上の洗浄の段階が伴い、洗浄用のインキュベーション時間は約1、2または15分間である。SSCとは0.15M NaClおよび15mMクエン酸緩衝液のことである。他の緩衝系を用いるSSCの同等物も用いることは認識されている。

40

【0055】

「主要組織適合遺伝子複合体」または「MHC」という用語は、T細胞に対する抗原提示

50

および急性移植片拒絶反応のために必要な細胞表面分子をコードする遺伝子の複合体を指す。ヒトでは、MHC複合体はHLA複合体としても知られている。MHC複合体によってコードされるタンパク質は「MHC分子」として知られており、クラスIおよびクラスII MHC分子に分類される。クラスI MHCは、 $\alpha$ 2-ミクログロブリンと非共有的に結合した、MHCにコードされた鎖から構成されるヘテロ二量体膜タンパク質を含む。クラスI MHC分子はほとんどすべての有核細胞によって発現され、CD8<sup>+</sup>T細胞に対する抗原提示に働くことが示されている。ヒトにおけるクラスI分子にはHLA-A、HLA-BおよびHLA-Cが含まれる。クラスII MHC分子も、非共有的に会合した鎖および鎖からなるヘテロ二量体膜タンパク質を含む。クラスII MHC分子はCD4<sup>+</sup>T細胞で働くことが知られており、ヒトではHLA-DP、HLA-DQおよびHLA-DRが含まれる。

10

## 【0056】

「自己の」または「自家の」という用語は、本明細書で用いる場合、細胞の由来を指す。この用語は、細胞試料が同じ対象、または対象と遺伝的に同一なドナーに由来することを示す。自己細胞は自己細胞の子孫であってもよい。この用語は、異なる細胞種の細胞が同じ対象または対象と遺伝的に同一なドナーに由来することも示す。

## 【0057】

同様に、「同種の」という用語も細胞の由来を指す。この用語は、細胞試料が対象と遺伝的に同一でないドナーに由来することを示す；特にこの用語は、発現されたMHC分子の非同源性に関する。同種細胞は同種細胞の子孫であってもよい。この用語は、異なる細胞種の細胞が対象と遺伝的に同一でないドナーに由来することも示す。

20

## 【0058】

「遺伝子送達媒体 (gene delivery vehicle)」は、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞内に運ぶことができる任意の分子と定義される。遺伝子送達媒体の例には、リポソーム、天然重合体および合成重合体を含む生体適合性ポリマー；リポタンパク質；ポリペプチド；多糖類；リポ多糖；人工ウイルスエンベロープ；金属粒子；ならびに細菌、バキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクター、ならびに種々の真核生物および原核生物宿主における発現を目的として記載されており、遺伝子治療ならびに単なるタンパク質の発現にも用いられる、当技術分野で一般に用いられる他の組換え媒体がある。

30

## 【0059】

本明細書で用いる「遺伝子送達」「遺伝子導入 (gene transfer)」などは、外因性ポリヌクレオチド (時に「導入遺伝子 (transgene)」と呼ばれる) の宿主細胞への導入を指す用語であり、これは導入のために用いる方法を問わない。このような方法には、ベクターを介した遺伝子導入 (例えば、ウイルス感染/トランスフェクション、または種々の他のタンパク質もしくは脂質を主体とする遺伝子送達複合体による) などの種々のよく知られた技法、さらには「裸の (naked)」ポリヌクレオチドの送達を促す技法 (電気穿孔、「遺伝子銃」による送達、およびポリヌクレオチドの導入に用いられる種々の他の技法など) が含まれる。導入されたポリヌクレオチドは宿主細胞内に安定的または一時的に維持される。安定的な維持には一般に、導入されたポリヌクレオチドが宿主細胞に適合した複製起点を含むこと、または導入されたポリヌクレオチドが染色体外レプリコンなどの宿主細胞のレプリコン (例えば、プラスミド) もしくは核もしくはミトコンドリアの染色体に組み込まれることが必要である。当技術分野で知られており、本明細書でも説明するように、多数のベクターが遺伝子の哺乳動物細胞への導入を媒介しうることが知られている。

40

## 【0060】

「ウイルスベクター」は、インビボ、エクスピボまたはインビトロで宿主細胞内に送達しようとするポリヌクレオチドを含む、組換えによって作製したウイルスまたはウイルス粒子と定義される。ウイルスベクターの例には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどが含まれる。遺伝子導入がレトロウイルスベ

50

クターによって媒介される状況において、ベクター構築物とは、レトロウイルスゲノムまたはその一部および治療用遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。本明細書で用いる「レトロウイルスを介した遺伝子導入」または「レトロウイルス形質導入」は同じ意味であり、細胞内に侵入してそのゲノムを宿主細胞ゲノムに組み込むウイルスによって遺伝子または核酸配列が宿主細胞内に安定的に導入される過程を指す。ウイルスはその通常の感染機構によって宿主細胞内に侵入させてもよく、または異なる宿主細胞表面受容体またはリガンドと結合して細胞内に侵入するようにウイルスを改変させることもできる。本明細書で用いるレトロウイルスベクターとは、ウイルス性またはウイルス様の侵入機構によって外因性核酸を細胞内に導入することができるウイルス粒子を指す。

【0061】

10

レトロウイルスはその遺伝情報をRNAの形態で有している；しかし、ひとたびウイルスが細胞に感染すると、RNAは逆転写されてDNA形態となり、それが感染細胞のゲノムDNAに組み込まれる。組み込まれたDNA形態はプロウイルスと呼ばれる。

【0062】

遺伝子導入がアデノウイルス(Ad)またはアデノ随伴ウイルス(AAV)などのDNAウイルスベクターによって媒介される状況において、ベクター構築物とは、ウイルスゲノムまたはその一部および導入遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。アデノウイルス(Ad)は特徴が比較的明らかになっている同種のウイルス群であり、これには50種を上回る血清型が含まれる。例えば、国際公開公報第95/27071号を参照。Adは増殖が容易であり、宿主細胞ゲノムへの組込みを必要としない。組換えAd由来のベクター、特に組換え能力および野生型ウイルスの発生能力を低下させたものも構築されている。国際公開公報第95/00655号および国際公開公報第95/11984号を参照。野生型AAVは、感染性および宿主細胞のゲノムに組み込まれる特異性が高い。ヘルモナート(Hermonat)およびムジチエカ(Muzyczka)(1984)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466~6470ならびにレブコウスキ(Lebkowski)ら(1988)、Mol. Cell. Biol. 8:3988~3996を参照。

20

【0063】

プロモーター、および内部にポリヌクレオチドを機能的に結合させることが可能なクロニング部位の両方を含むベクターが当技術分野では知られている。このようなベクターにはRNAをインビトロまたはインビボで転写する能力があり、これらはストラタジーン(Stratagene)社(La Jolla, CA)およびプロメガバイオテック(Promega Biotech)社(Madison, WI)などの供給元から市販されている。発現および/またはインビトロ転写を最適化するために、不適切な選択的翻訳開始コドンとなる可能性のある余分なもの、または転写もしくは翻訳のレベルで発現の障害もしくは低下を招く可能性のある他の配列を除去する目的で、クロンの5'および/または3'非翻訳部分を除去、付加または変更することが必要なこともある。または、発現を増強するために開始コドンのすぐ5'側にコンセンサス型リボソーム結合部位を挿入することもできる。

30

【0064】

40

遺伝子送達媒体には、DNA/リボソーム複合体および標的指向性ウイルスタンパク質-DNA複合体を含む、いくつかの非ウイルス性ベクターも含まれる。標的指向性抗体またはその断片をも含むリボソームを本発明の方法に用いることができる。細胞への送達を強化するために、本発明の核酸またはタンパク質を細胞表面抗原、例えば、TCR、CD3またはCD4と結合する抗体またはその結合性断片と結合させることが可能である。

【0065】

ポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの領域(またはポリペプチドもしくはポリペプチドの領域)が別の配列に対してある一定の比率(例えば、80%、85%、90%または95%)の「配列同一性または相同性」を有するとは、整列化して2つの配列を比較した場合にその比率の塩基(またはアミノ酸)が同一であることを意味する。この整列化

50

および相同性または配列同一性の比率は、当技術分野で知られたソフトウェアプログラム、例えば「分子生物学における最新プロトコル(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)」(F. M. Ausubelら編、1987)、補遺30、セクション7.7.18、表7.7.1に記載されたものを用いて決定することができる。整列化にはデフォルトのパラメーターを用いることが好ましい。好ましい整列化プログラムの1つは、BLASTをデフォルトのパラメーターで用いるものである。特に好ましい整列化プログラムは、BLASTNおよびBLASTPを以下のデフォルトのパラメータで用いるものである：遺伝子コード=標準；フィルター=なし；ストランド=両方；カットオフ値=60；期待値=10；マトリックス=BLOSUM62；記述=50配列；ソート順=HIGH SCORE；データベース=非重複性、ジェンバンク(GenBank)+EMBL+DDBJ+PDB+ジェンバンクCDS翻訳物(GenBank CDS translations)+SwissProtein+SPupdate+PIR。これらのプログラムの詳細は以下のインターネットアドレスで見ることができる：[www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)。

10

#### 【0066】

本明細書で用いる「インビボ」遺伝子送達、遺伝子導入、遺伝子治療などは、外因性ポリヌクレオチドを含むベクターをヒトまたは非ヒト哺乳動物などの生物体の体内に直接導入し、それによって外因性ポリヌクレオチドがこのような生物体の細胞にインビボで導入されることを指す用語である。

20

#### 【0067】

「単離された」という用語は、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはそれらの断片が自然下で通常付随している細胞性およびその他の成分から分離されたことを意味する。例えば、ポリヌクレオチドの場合、単離されたポリヌクレオチドとは、染色体内でそれに通常付随する5'および3'配列から分離されたものである。当業者には明らかと思われるが、天然のものでないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはそれらの断片を、それをその天然の相当物と区別するために「単離」する必要はない。加えて、「濃縮された」「分離された」または「希釈された」ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはそれらの断片は、濃度または容積当たりの分子数が、その天然の相当物が「濃縮された」ものよりも高い、または「分離された」ものよりも低いという点で、その天然の相当物と区別可能である。その一次配列または例えばそのグリコシル化パターンが天然の相当物と異なるポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはそれらの断片は、その一次配列またはグリコシル化パターンなどの別の特徴によってその天然の相当物と区別できるため、単離された形態で存在する必要はない。本明細書に開示する発明のそれぞれに対して明示的には述べないが、以下に開示する組成物および適切な条件下でのそれぞれに関する、上記の態様のすべてが本発明によって提供されることは理解される必要がある。したがって、天然のものでないポリヌクレオチドは、単離された天然のポリヌクレオチドとは別の態様として提供される。細菌細胞で産生されるタンパク質は、自然下でそれが産生される真核細胞から単離された天然のタンパク質とは異なる態様として提供される。

30

40

#### 【0068】

「対象」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、マウス、サル、ヒト、家畜、競技動物およびペットが非制限的に含まれる。

#### 【0069】

「対照」とは、比較を目的として実験に用いられる別の対象または試料のことである。対照は「陽性」でも「陰性」でもよい。例えば、実験の目的が遺伝子の発現レベルの変化と特定の種類の癌との相関を明らかにすることである場合には、陽性対照(このような変化を有し、その疾患に特徴的な症候群を呈している対象、または対象からの試料)および陰性対照(発現の変化およびその疾患の臨床的症候群がみられない対象、または対象からの試料)を用いることが一般に好ましい。

50

## 【0070】

「癌」「新生物」および「腫瘍」という用語は、互換的に単数形または複数形として用いられ、宿主生物に対して病的なものとなる悪性形質転換が起こった細胞を指す。原発性癌細胞（すなわち、悪性形質転換が起こった部位の付近から得られる細胞）は、十分に確立された技法、特に組織学的検査により、非悪性細胞と容易に区別することができる。本明細書で用いる癌細胞の定義には、原発性癌細胞だけでなく、癌細胞の祖先に由来するあらゆる細胞が含まれる。これには、転移した癌細胞、ならびに癌細胞に由来するインビトロ培養物および細胞株が含まれる。固形腫瘍として通常発現する種類の癌を言及する場合、「臨床的に検出可能な」腫瘍とは、C A T スキャン、磁気共鳴画像法（M R I）、X線、超音波または触診などの手法により、腫瘍塊に基づいて検出可能なものことである。生化学的または免疫学的所見のみではこの定義を満たすには不十分である。 10

## 【0071】

「免疫処置」または「ワクチン接種」とは、抗原に対する免疫応答を増強または活性化することを意味する。これは異常の除去または根絶を必要とはしておらず、抗原に対する免疫応答が臨床的に好ましい様式で増強されることを考えている。

## 【0072】

対象における腫瘍の増殖を「抑制すること」または「腫瘍負荷を軽減すること」とは、対照に比べて増殖状態が抑制されていることを意味する。腫瘍細胞の増殖は、腫瘍の大きさの測定、腫瘍細胞が増殖しているか否かの<sup>3</sup>H-チミジン取り込みアッセイ法を用いた判定、または腫瘍細胞数の算定を非制限的に含む、当技術分野で知られた任意の手段によって評価しうる。腫瘍細胞の増殖を「抑制する」とは、以下の状態のいずれかまたはすべてを意味する：腫瘍増殖の緩徐化、遅延および「抑制」とは、腫瘍の増殖が停止した場合に抑制される増殖状態、ならびに腫瘍の縮小を示す。 20

## 【0073】

「培養すること」という用語は、さまざまな種類の培地上または培地中における、細胞または生物体のインビトロ増殖を指す。培養下で増殖した細胞の子孫が親細胞と（形態的、遺伝的または表現型的に）完全に同一でない場合があることは知られている。「増殖した（expanded）」とは、細胞の何らかの増殖または分裂を意味する。

## 【0074】

「組成物」とは、活性物質と、不活性な（例えば、検出可能な物質または標識）もしくはアジュバントなどの活性のある別の化合物または組成物とを組み合わせたものを意味する。 30

## 【0075】

「薬学的組成物」には、活性物質と、インビトロ、インビボまたはエクスビボでの診断的使用または治療的使用に組成物を適合させる不活性または活性のある担体とを組み合わせたものが含まれる。

## 【0076】

本明細書で用いる「薬学的に許容される担体」という用語には、リン酸緩衝食塩液、水、および水中油型または油中水型乳剤などの乳剤、ならびにさまざまな種類の湿潤剤が含まれる。組成物は安定剤および保存料も含みうる。担体、安定剤およびアジュバントの例については、マーチン（Martin）、「レミントンの薬学（REMIINGTON'S PHARM. SCI.）」第15版（Mack Publ. Co., Easton（1975））を参照されたい。 40

## 【0077】

「有効量」とは、有益な、または望ましい結果をもたらすのに十分な量のことである。有効量は1回または複数回の投与、適用または用量として投与することができる。

## 【0078】

「血清」試料とは、流血中抗体および他の可溶性タンパク質を含む、血液の液相または血漿（対象から採取したもの）を指す。1つの好ましい局面において、血清試料は関心対象の表現型と相関する抗体またはタンパク質を含む。1つの局面において、「関心対象の表 50

現型」とは、特定の疾患状態のことである。もう1つの局面において、「関心対象の表現型」は、特定の治療に対する免疫応答と相関する抗体またはタンパク質の存在を特徴とする。

【0079】

「反応性」対象血清（抗血清）」とは、治療後に望ましい反応を示す対象から入手したポリクローナル血清試料を、同様の対象、例えば同じ治療を受けたが望ましい反応を示さない対象から単離または入手した反応性ポリクローナル血清試料、すなわち「非反応性対象血清」と対比させて指すものである。1つの局面において、反応性対象からの血清は、臨床的または準臨床的な反応を示す対象から得られる。

【0080】

抗原性ポリペプチド、およびポリペプチドを特異的に認識してそれと結合する抗体は、治療薬として有用な可能性がある。しかし、免疫療法または薬物療法の有効な標的となるのは、抗原を含むまたは抗原を含む可能性のある細胞によって発現される抗原性ポリペプチドのサブセットに過ぎない。抗原性ペプチドおよび関連した抗体を同定するための現在の方法は、その有用性の可能性に基づいて抗原を選択するものではない。本発明は、血清抗体を特異的に認識してそれと結合する、関心対象の表現型と相関するポリペプチドを同定するための方法であって、該当する1つまたは複数の細胞または組織において差異を伴って発現される特徴づけられた遺伝子のリストおよび特徴づけられたポリペプチドのリストに共通するポリペプチドを同定し、それによって前記関心対象の表現型と相関する前記ポリペプチドを同定することを含む方法を提供することにより、その有無が望ましい反応または表現型と関連する抗原性ポリペプチドを選択するための手段を提供する。血清抗体は2つまたはそれ以上の関心対象の表現型から選択される。1つの局面において、これは所定の表現型に従って比較する対象からの血清を選択することによって行われ、すなわち、それらは例えば癌ワクチンによる治療に対する異なる反応というように、互いに共通する表現型における差異を発現する。続いて、特徴づけられた遺伝子発現データを入力し、抗原またはポリペプチドおよびリストに共通する特徴の同定および適用によってリストを入力する。例えば、治療を受けた癌患者から血清抗体を選択する場合には、関心対象の抗原を発現することが疑われる種類の細胞または組織から選択され、遺伝子発現データが入手可能であって特徴づけられている抗原を、まず抗体との結合能によって特徴づける（例えば、ウエスタンブロットにより）。これによって抗原の分子量も得られると思われる。関心対象の抗原に共通する他の共通した特徴により、発現される遺伝子配列のデータベースをさらに選択または限定することが可能であり、このような特徴を決定するための方法は本明細書中に提供している。

【0081】

第2のリストは、異なっているものの、関連性のあるタンパク質データ、例えば分子量、酵素消化パターンおよび光などから作成する。これらの性質は抗原性ペプチドに共通しており、その性質は、適切な試料から別の抗原を単離することおよび本明細書に提供の方法を用いることによって決定することができる。

【0082】

これらのリストを比較し、関連するまたは共通する表現型情報と関連づけた別のリストに基づいて、各リストに共通する少なくとも1つのポリペプチドを同定する。選択基準に基づき、このポリペプチドは、あらかじめ選択した表現型を有する対象から単離した血清抗体と結合する。

【0083】

インビボまたはインビトロで作製したポリクローナル試料の選択

1つの局面において、望ましい反応は治療後に観察される。もう1つの局面において、望ましい反応は治療を行っていない対象で観察される。

【0084】

本明細書で用いる「治療」または「治療法」とは、宿主または対象における反応を増強する、または活性化する介入行為を意図している。いくつかの局面において、治療反応は臨

10

20

30

40

50

床的反応であるが、準臨床的反応も同じく本発明の範囲に含まれる。反応につながる可能性のある治療には、抗生物質療法、抗ウイルス療法、ワクチン接種、免疫処置、薬物療法（例えば、低分子）化学療法、放射線療法、一次手術の奏功による疾患の解消、抗体療法、受動的免疫療法、能動的免疫療法、養子免疫療法などが非制限的に含まれる。

【0085】

治療反応は、治療する対象および治療の目的によって異なると考えられる。その例には、体液性および細胞性免疫応答、抗抗原抗体の産生、抗原を提示する細胞を溶解すると考えられる抗原に対して特異的な細胞傷害性T細胞の生成、非特異的な先天性免疫応答、例えば、NK細胞、食細胞またはマクロファージの活性化が含まれる。免疫応答が誘導されたか否かを判定するための方法は当技術分野で周知である。例えば、抗原特異的抗体は、固定化された抗原（またはエピトープ）に対する抗体の結合を、検出可能な標識がなされた二次抗体（例えば、酵素標識したマウス抗ヒトIg抗体）で検出するELISAを非制限的に含む、当技術分野で知られたさまざまな免疫アッセイ法を用いて検出することができる。抗原に対して特異的な免疫エフェクター細胞は、FACS、<sup>5</sup><sup>1</sup>Cr放出アッセイ法または<sup>3</sup>H-チミジン取り込みアッセイ法を非制限的に含む、当業者に知られたいかなるさまざまなアッセイ法で検出することができる。

10

【0086】

本発明の1つの局面においては、ポリクローナル抗体を含む血清試料を2例またはそれ以上の反応性対象から単離する。1つの局面においては、後に治療しようとする2例またはそれ以上の対象から、抗体を含む試料を単離する。治療後の血清試料を2例またはそれ以上の対象から単離する。例えば、所定の治療に対して「反応性」であった対象および所定の治療に対して「非反応性」であった対象の両方から、対象のそれぞれの免疫応答を表現型的に区別しうる。この例では、反応性対象によって生じる望ましい反応が治療的免疫応答である。

20

【0087】

本発明のさらに別の局面では、治療用の抗原および抗体の分析および同定のための表現型的に異なる血清試料を、対象試料のインビボまたはインビトロでのスクリーニングによって得ることができる。その例は本明細書で提供する。

【0088】

本方法は、結合抗体のポリクローナル集団をインビトロで得るために腫瘍細胞、腫瘍細胞膜または腫瘍細胞からの遊離抗原（shed antibody）に対してパニングを行ったコンビナトリアル抗体ライブラリー（抗体ファージ）を用いて、インビトロで入手した試料により行うこともできる。広在性抗原を認識する汎反応性抗体を除去するために上記の方法を正常細胞に用いてポリクローナル抗体を吸収し、その後インビトロまたはインビボで、濃縮した（enriched）抗体の集団により標的細胞の挙動が修飾されることを調べる。

30

【0089】

標的ペプチドの選択および調製

血清抗体およびそのポリペプチド標的抗原を同定するために、抗原またはポリペプチドを含むことが疑われる標的試料/細胞からのタンパク質（ポリペプチド）調製物を全細胞または組織可溶化物から単離する。または、多くの関連性のある抗体標的は細胞表面に天然に存在することから、細胞表面タンパク質が豊富に存在する膜である原形質膜（例えば、膜タンパク質）を用いることもできる。さらにまた、頂側および側底部の細胞膜タンパク質のみの選択的調製物を用いることもできる。

40

【0090】

全細胞可溶化物、膜調製物または標的試料の濃縮調製物の内部のタンパク質を、例えば電気泳動による分子量に従って、SDSポリアクリルアミドゲルなどのタンパク質ゲル上に配置または分離する。アッセイしようとする血清試料のそれぞれに対して1つずつ、標的試料の同一なアレイを作製する。タンパク質を分離した後に、ニトロセルロース、ビーズなどの固体支持体または液体担体といった適したアッセイ用媒体に移す。タンパク質を操

50

作するための技法は当業者に周知である。このような技法の具体的な詳細は、「分子生物学における最新プロトコール (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)」(F. M. Ausubelら編(1987))および「酵素学の方法 (METHODS IN ENZYMOLOGY)」シリーズ (Academic Press, Inc.) に記載されている。

#### 【0091】

##### 血清ポリペプチドの単離

本発明の1つの局面では、抗体-抗原結合の検出および/または測定のための標準的な免疫学的アッセイ法を用いて、各々の血清試料を次に、後述の通りに調製した標的試料の別個のアレイに対して個別かつ独立にアッセイする。ウエスタンブロット分析はこのような方法のよく知られた一例である。

10

#### 【0092】

続いて、抗体の機能を損なわないようにニトロセルロースから血清抗体を回収または溶出させるため、マー (Maas, J. S.) ら (1990) J. Biol. Chem. 265: 1569~1577の方法の変法を用いる。しかし、機能を失うことなく抗体を採取する任意の方法が使用できる。

#### 【0093】

##### 血清ペプチドの濃縮

抗原の同定のために別の抗原性ペプチドの単離が必要なこともある。別の抗原は免疫化学的技法を用いて単離することができる。本発明の1つの局面では、抗体を用いて、発現している標的試料/細胞株から抗原を免疫沈降させる。当業者は関心対象のタンパク質を同定するために用いるさまざまな技法に精通している。例えば、免疫沈降のための方法は、ハーロウ (Harlow) およびレーン (Lane) 編 (1988) および (1999) (前記) に記載されている、または本明細書で後述する直接的および/もしくは間接的方法による。

20

#### 【0094】

##### 同定スクリーニング

抗原は以下のものからなる群より選択されるさまざまな技法を用いて同定しうる: 1) 直接シークエンシング、2) 直接シークエンシングおよび遺伝子またはポリヌクレオチドのデータベースとの比較、3) アミノ酸配列のコンビナトリアルペプチドライブラリー (オンピースおよびオフピース) との比較; 4) ペプチドライブラリー (オンピースおよびオフピース) による免疫沈降、シークエンシングおよび遺伝子またはポリヌクレオチドのデータベースとの比較、5) ペプチダーゼ消化、質量分析、ならびに既知および以前に特徴づけられたタンパク質のデータベースとの比較、ならびに6) 質量分析ならびに既知および以前に特徴づけられたタンパク質のデータベースとの比較。

30

#### 【0095】

##### ポリペプチドライブラリーのスクリーニング

いくつかの態様では同定の前に、単離した血清抗体を、関心対象の抗原を含むことが疑われる試料から選択したペプチドの第2のパネルまたはライブラリーに対して標準的な免疫化学的技法を用いてスクリーニングする。これらの方法は当技術分野で知られており (Sambrookら (1989) 前記、ならびにハーロウ (Harlow) およびレーン (Lane) (1988) および (1999) 前記)、または以下に述べる。これらのアッセイ法は本明細書に記載の阻止抗体を用いて直接行うことができる。

40

#### 【0096】

または、ランダムペプチドのコンビナトリアルライブラリーを用いることもできる。さらにもう1つの態様では、関心対象の抗原が存在する確率を高めるためにライブラリーをあらかじめ選択しておく。

#### 【0097】

##### 「遺伝子」に基づく同定

単離したペプチドのポリヌクレオチド配列は、従来のシークエンシング法または市販の材

50

料を用いて得ることができる。ペプチドはペプチドライブラリーに対する第2のスクリーニングの後に得ることができる。ほとんどの場合、ペプチドの配列はエピトープを含むタンパク質を同定するには不十分である。本発明は、配列を特徴づけられた発現ポリヌクレオチド配列のデータベースと比較することによる、タンパク質を同定するための手段を提供する。

**【0098】**

タンパク質を同定するために用いられる最も適したデータベースは、同じまたは類似の表現型を呈する標的試料、標的細胞株または細胞または組織から得られたものである。「標的試料」または「標的細胞株」という用語は、それと関連する遺伝子発現プロファイルデータを有する生物試料を意図している。例えば、標的試料は、関連する遺伝子発現プロファイルデータを有する正常組織試料、異常試料、腫瘍試料または細胞株でありうる。DNAおよびタンパク質のデータベースには有料のもの（Incyte Genomics, California USA）、公開されているもの（例えば、<http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; <http://blast.wustl.edu/>; <http://expasy.ch/>）があり、新規に作ることもできる。

10

**【0099】**

または、差異を伴って発現されるポリヌクレオチドを同定するために当技術分野で知られた任意の方法を用いることもでき、それぞれを本発明の方法に用いることができる。本明細書で用いる「ポリヌクレオチド断片」という用語には、SAGEタグ（米国特許第5,695,937号に記載）のほか、定量的/相対的な遺伝子発現データが得られる任意の方法によって入手した任意の他の核酸が含まれる。このような方法には、cDNAサブトラクション法、ディファレンシャルディスプレイ法および発現配列タグ法が非制限的に含まれる。cDNAサブトラクション法またはディファレンシャルディスプレイ法に基づく技法は、2種類の細胞間の遺伝子発現の差異を比較するのに特に有用なことがある（Hedrickら（1984）Nature 308:149; ならびにLianおよびPardee（1992）Science 257:967）。ノーザンブロット法、RNAアーゼ保護および逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）分析（Alwineら（1977）PNAS 74:P5350; Zinnら（1983）Cell 34:865; およびVeresら（1987）Science 237:415）のような発現配列タグ（EST）のアプローチは遺伝子発見に有意義なもう1つのツールである（Adamsら（1991）Science 252:1651）。さらにもう1つの方法は、ディファレンシャルディスプレイ法をリアルタイムPCRおよびリプレゼンテーションアルファレンス分析（representational difference analysis）と組み合わせたものである（LisitisynおよびWigler（1995）Meth. Enzymol. 254:291）。

20

30

**【0100】**

常に明示的に述べるとは限らないが、遺伝子またはポリヌクレオチドのデータベースの元となり、配列比較に用いるための標的試料/細胞の選択は、治療しようとする各々の適応症、例えば癌、自己免疫疾患、ウイルス症または寄生虫症によって異なると理解される必要がある。例えば、適応症がウイルス性である場合には、選択した標的試料/細胞を、非感染状態および関心対象ウイルスで感染させた状態の両方でアッセイする。感染した標的試料/細胞の別の試料をアッセイに含めてもよい。例えば、ウイルス感染のさまざまな段階（stage）を代表する時間経過を伴って感染させた標的試料は、最初期、遺伝子発現の定常的および後期といった、感染の時間的成分を観測および検出するのに有用である。

40

**【0101】**

データベースと比較するアミノ酸配列の長さが短い場合には、検索手順を容易にするために、クエリー配列の実体を検索するためのあらかじめ選択した配列決定済みのアミノ酸配列があれば便利である。あらかじめ選択するタンパク質のセットは、標的試料によって発

50

現される遺伝子の具体的なセットに関する情報、および血清試料中にのみ存在する抗体と一意的に反応するタンパク質の特徴を用いて作ることができる。

【0102】

対応する天然のエピトープの配列と同一であるのは選択した抗体反応性ペプチドの配列の一部に過ぎない可能性があるため、天然のエピトープに関するスクリーニングの際にはあらかじめ選択したポリペプチド配列の群を用いるのが有益である。これにより、同定される抗原性ペプチドと部分的な相同性がある無関係な配列が除去されるため、スクリーニング工程の効率が高まる。

【0103】

ペプチドデータベースによる血清ペプチドの同定

10

本発明の1つの態様では、血清ペプチドのアミノ酸配列を、既知および以前に特徴づけられたペプチドとの比較によって決定する。

【0104】

例えば、エピトープのペプチド配列は、「ファージ法」(ScottおよびSmith (1990) Science 249:386; Cwirllaら (1990) PNAS 87:6378; および Devlinら (1990) Science 249:404)、ジヤイセン (Geysen) の方法 (Geysenら (1986) Mol. Immunol. 23:709; および Geysenら (1987) J. Immunol. Meth. 102:259)、フォード (Fodor) ら ((1991) Science 251:767) の方法、フルカ (Furka) ら ((1988) 14th International Congress of Biochemistry Vol. 5 Abstract FR:013); フルカ ((1991) Int. J. Peptide Protein Res. 37:487); ホートン (Houghton) (米国特許第4,631,211号); および ラター (Rutter) ら (米国特許第5,101,175号) に記載されたアゴニストまたはアンタゴニストであるペプチドを検査するための方法、合成ライブラリーを利用する方法 (Needelsら (1993) PNAS 90:10700; および Lamら、米国特許第5,510,240号)、インデックス付きのコンビナトリアルペプチドディスプレイを利用する方法 (Ohlmeyerら (1993) PNAS 90:10922) および ペプスキャン (pepscan) 法 (Van der Zee (1989) Eur. J. Immunol. 19:43) を非制限的に含む方法によって決定することができる。

20

30

【0105】

ペプチドライブラリーのスクリーニングを利用する態様では、本発明のペプチドを適切な固相合成手順によって合成することが最も好ましい; スチュワード (Steward) および ヤング (Young)、「固相ペプチド合成 (SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS)」、Freemantle、San Francisco、Calif. (1968)。1つの好ましい方法はメリフィールド工程である。メリフィールド (Merrifield) (1967) Recent Progress in Hormone Res. 23:451を参照。続いて、抗原性エピトープのアミノ酸配列を決定し、標的組織で発現されるあらかじめ選択した配列セット中の複数の遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と比較する。抗体結合ペプチドのアミノ酸配列と配列相同性のある、あらかじめ選択した群の中の遺伝子によりコードされるポリペプチド配列は、血清由来の抗体によって認識されてその抗体と結合する天然のエピトープを規定するものと考えられる。

40

【0106】

対象の血清中の抗体と一意的に反応するポリペプチド中に存在する抗原性エピトープが本明細書に記載の方法を用いて同定される場合には、選択した抗体とそれぞれが反応する複数の抗原性ペプチドをさらに同定することが有益である。抗体のポリペプチド基質との結合は基質の三次元構造に依存し、エピトープ中のすべての残基が抗体分子と直接接触するとは限らないことがしばしばであるため、複数の特異的ペプチド配列が選択した抗体と反

50

応することが判明することもある。同定した複数の抗体結合ペプチドの整列化によってエピトープのコンセンサス配列（または配列モチーフ）の同定が可能となり、それによってタンパク質データベース中の天然のエピトープの同定が容易になる（図3参照）。

【0107】

MALDI-TOF MS

この態様では、反応性を有することが示された抗体によって認識されるペプチド標的を同定するために、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（「MALDI-TOF MS」）を用いる（図5参照）。この局面では、抗体を単離した後、または抗体が中に存在する血清を同定した後に（図5参照）、別のタンパク質ゲルを泳動してペプチドを単離する。バンドを切り出してペプチドを単離し、1つまたは複数の既知および以前に特徴づけられたペプチダーゼで消化することにより、質量分析による分析用に調製する。本明細書で用いる「既知および以前に特徴づけられたペプチダーゼ」という用語は、既知のペプチダーゼ消化による断片が同定され、特徴づけられてカタログ化されている、タンパク質またはペプチドを意図している。

10

【0108】

例えば、シェフチェンコ（Shevchenko, A）ら（2000）Anal. Chem. 72: 2132~2141に記載されたよく知られた手順を用いて、例えば、試料または未知のペプチドをマトリックスと混合し、試料プレート上で乾燥させる。この試料を質量分析計の高真空内に導入する。試料スポットをレーザーで照射し、イオンを気相中に脱離させるとともに、飛行時間を測定する計時装置を開始させる。イオンは電場によって同じ運動エネルギーで加速され、電場内の自由飛行管を浮遊（または飛行）するうちに空中で分離する。イオンはイオンの質量電荷比に依存した異なる時間に検出器に到達する。データシステムが装置のすべてのパラメーターを制御して時間毎のシグナルを獲得することにより、データ処理が可能となる。スペクトル計によって試料のプロファイルが生成され、続いてこれを以前に特徴づけられたタンパク質およびペプチドと比較する。ペプチド質量分析データベースはウェブ上で<http://ntwade/htmlucsf/msfit.htm>などから入手可能であり、または内部で作成することもできる。その一致により、反応性を有することが示された抗体によって認識される標的が同定される。

20

【0109】

生物活性の確認

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、および関心対象のエピトープを含むペプチドを、本発明の方法を用いて調製および単離することができる。

30

【0110】

単離した抗原またはペプチドの機能的活性または妥当性は、よく知られたインビトロまたはインビボの方法を用いて確認することができる。治療的および診断的な有用性は、治療を必要とする対象にペプチドまたは抗原を投与することによって確認される。例えば、ヒト対象からの標的試料/細胞株（遺伝子発現プロファイルが知られているもの）をマウスの免疫処置に用いて、標的試料/細胞によって発現されるポリペプチド抗原に対して特異的な体液性免疫応答を誘発させる。哺乳動物により強い体液性応答を生じさせるための手段は当技術分野で知られている。例えば、免疫処置を受けさせることを選択したマウスが生得的にT細胞欠損であること、またはT細胞反応を抑制する抗CD8抗体の投与によってT細胞欠損性にすることができる。

40

【0111】

免疫処置によって誘発される体液性免疫応答が防御免疫も付与することを示すための方法は当技術分野で知られており、例えば、ナイーブマウスの一群に対し、免疫処置した（防御された）マウスから入手した抗体を養子移入する。続いて、これらの抗体の投与を受けたナイーブマウスを、標的試料/細胞株および/または他の抗原的に関連のある細胞によって刺激し、それに対する免疫応答をモニタリングする。免疫処置マウスから標準的な技法を用いてモノクローナルおよびポリクローナル抗体を入手してもよい。

50

## 【0112】

これらの抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）を、ヒト腫瘍細胞の増殖を抑制する能力を判定するためにインビトロでアッセイすることもできる。ヒト腫瘍細胞の増殖をインビトロで抑制することが示された抗体の特異性は、本明細書の上に述べた一群の標的試料／細胞株の細胞可溶化物または膜調製物を用いるウエスタンブロット分析によって評価しうる。

## 【0113】

本発明によって同定されたポリヌクレオチド

ポリヌクレオチドを、検出可能なマーカー、例えば、細胞内の核酸および／または遺伝子の発現の検出のための酵素標識または放射性同位体と結合させることができる。当技術分野では、検出可能なシグナルを生じうる蛍光性、放射性、酵素的またはアビジン／ビオチンなどの他のリガンドを含む、多岐にわたる適した検出マーカーが知られている。好ましい態様においては、放射性試薬または他の環境的に望ましくない試薬ではなく、蛍光性標識またはウレアーゼ、アルカリホスファターゼもしくはペルオキシダーゼなどの酵素タグを用いることが望ましいと考えられる。酵素タグの場合には、相補的核酸を含む試料との特異的ハイブリダイゼーションを同定することを目的としてヒトの肉眼または分光法によって観察できる手段を得るのに使用できるとして、比色分析用指標基質が知られている。

## 【0114】

本発明はさらに、一本鎖ポリヌクレオチドまたはその相補物を検出するための方法であって、相補的な一本鎖ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション（好ましくは中等度またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）を許容する条件下またはより好ましくは高度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、標的の一本鎖ポリヌクレオチドを標識した一本鎖ポリヌクレオチド（プローブ）と接触させることによる方法を提供する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対をハイブリダイズしていない一本鎖ポリヌクレオチドから分離する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対は、当業者に周知であって、例えばサムブルック（Sambrook）ら（1989）前記に記載された方法を用いて検出される。

## 【0115】

本発明のポリヌクレオチドを、PCRを用いて増幅することが可能である。PCR技術は、米国特許第4,683,195号、第4,800,159号、第4,754,065号および第4,683,202号の主題であり、「PCR：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR：THE POLYMERASE CHAIN REACTION）」（Mullisら編、Birkhauser Press、Boston（1994））およびそこに引用された参考文献に記載されている。

## 【0116】

または、当業者が本明細書に提供する配列および市販のDNA合成装置を用いてDNAを複製することもできる。したがって、本発明は、ポリヌクレオチドの直鎖配列、適切なプライマー分子、酵素などの化学物質、ならびにその複製のため、およびヌクレオチドの化学的な複製または正しい配向での連結によりポリヌクレオチドを入手するための指示を提供することによって、本発明のポリヌクレオチドを入手するための工程も提供する。もう一つの別の態様では、これらのポリヌクレオチドをさらに単離する。またさらに、当業者がポリヌクレオチドを適した複製ベクターに挿入し、このベクターを複製および増幅のために適した宿主細胞（原核または真核）に挿入することもできる。そのようにして増幅したDNAは当業者に周知の方法によって細胞から単離しうる。この方法によってポリヌクレオチドを入手するための工程、ならびにそのようにして入手したポリヌクレオチドも本明細書で提供する。

## 【0117】

RNAは、まずDNAポリヌクレオチドを適した宿主細胞に挿入することによって入手しうる。DNAは任意の適切な方法により、例えば、適切な遺伝子送達媒体（例えば、リポソーム、プラスミドまたはベクター）の使用または電気穿孔法によって挿入しうる。細胞

10

20

30

40

50

が複製してDNAがRNAへと転写される場合には、そのRNAを当業者に周知の方法、例えば、サムブルック(Sambrook)ら(1989)前記に記載された方法によって単離することができる。例えば、サムブルック(Sambrook)ら(1989)前記に記載された手順に従ってmRNAをさまざまな溶解酵素もしくは化学溶液を用いて単離するか、または製造者によって提供された添付の指示書に従って核酸結合樹脂により抽出することができる。

#### 【0118】

特異的ハイブリダイゼーションのために「完全に一致する」プローブが必要なわけではないことが当技術分野では知られている。少数の塩基の置換、欠失または挿入によって生じるプローブ配列のわずかな変化は、ハイブリダイゼーションの特異性に影響を及ぼさない。一般に、20%程度の塩基対ミスマッチ(最適に整列化した場合)は許容されうる。好ましくは、前記のmRNAを検出するのに有用なプローブは、同等のサイズの相同領域と少なくとも約80%同一である。より好ましくは、相同領域の整列化の後に、プローブは対応する遺伝子配列と85%同一であり;さらにより好ましくは、90%の同一性を示す。

10

#### 【0119】

これらのプローブは、これらの細胞を含むさまざまな細胞または組織の検出およびモニタリングのためのラジオアッセイ法(例えば、サザンおよびノーザンブロット分析)に用いることができる。本プローブを、1つまたは複数の本発明のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現の検出を目的とするハイスクリーンングアッセイ法に用いるためのチップなどの固体支持体またはアレイに結合させることもできる。

20

#### 【0120】

本発明はさらに、RNA転写のプロモーター、ならびにDNAまたはRNAの複製および/または一時的もしくは安定的な発現のための他の調節配列と機能的に結合した、単離されたポリヌクレオチドも提供する。本明細書で用いる「機能的に結合した」という用語は、プロモーターがDNA分子からのRNAの転写を指令すると考えられるような様式で配置していることを意味する。このようなプロモーターの例には、SP6、T4およびT7がある。いくつかの態様では、挿入したポリヌクレオチドの組織特異的発現のために細胞特異的プロモーターを用いる。プロモーターまたはプロモーター/エンハンサー、終止コドンおよび選択マーカ配列、さらには挿入されたDNA断片がその内部で機能的に結合することが可能なクローニング部位を含むベクターは当技術分野で周知であり、市販されている。一般的な方法およびクローニング戦略については、「遺伝子発現技術(Gene Expression Technology)」(Goeddel編、Academic Press, Inc.(1991))およびそこに引用された参考文献、ならびに種々の適したベクターに関するマップ、機能的性質、販売元およびGenEMBLアクセッション番号に対する言及が含まれた「ベクター:エッセンシャルデータシリーズ(Vectors:Essential Data Series)」(GacesaおよびRamji編、John Wiley & Sons, N.Y.(1994))を参照されたい。これらのベクターはRNAをインビトロまたはインビボで転写できることが好ましい。

30

#### 【0121】

本発明のポリヌクレオチドを含む送達媒体

本発明は、本発明のポリヌクレオチドの細胞内への送達のために適した送達媒体も提供する(インビボ、エクスピボ、またはインビトロで)。本発明のポリヌクレオチドをクローニングベクターまたは発現ベクターの内部に含めることができる。これらのベクター(特に発現ベクター)を、続いて、想定される任意のさまざまな形態、例えば、細胞への送達および/または細胞内への進入を促進すると思われるものへと操作することができる。

40

#### 【0122】

これらの核酸を含む発現ベクターは、タンパク質およびポリペプチドを産生するための宿主ベクター系を得るために有用である。これらの発現ベクターは、エピソームまたは染色体DNAに組み込まれた部分として宿主生物内で複製可能でなければならないと考えられ

50

る。適した発現ベクターには、プラスミド、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスを含むウイルスベクター、コスミドなどが含まれる。アデノウイルスベクターは、インビトロおよびインビボともに発現レベルが高く、細胞の形質転換が効率的に行われるため、インビボで遺伝子を組織中に導入するのに特に有用である。核酸を原核または真核細胞などの適した宿主細胞に挿入し、宿主細胞が複製する場合には、タンパク質の組換え産生が可能である。適した宿主細胞はベクターに依存すると考えられるが、これにはよく知られた方法を用いて構築された哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞および細菌細胞が含まれる。Sambrookら(1989)前記を参照。外因性核酸の細胞への挿入のためには、ウイルスベクターの使用に加えて、細菌細胞に対する形質転換；哺乳動物細胞に対するリン酸カルシウム沈降を用いたトランスフェクション；またはDEAEデキストラン法；電気穿孔法；マイクロインジェクションなどの当技術分野で周知の方法によって宿主細胞に核酸を挿入することもできる。この方法については、Sambrookら(1989)前記を参照のこと。したがって、本発明は、タンパク質またはポリペプチドまたは抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞、例えば哺乳動物細胞、動物細胞(ラットまたはマウス)、ヒト細胞または細菌細胞などの原核細胞も提供する。

#### 【0123】

ベクターをインビボまたはエクスピボでの遺伝子治療のために用いる場合には、複製能の欠損したレトロウイルスまたはアデノウイルスベクターなどの薬学的に許容されるベクターが好ましい。本発明の核酸を含む薬学的に許容されるベクターを、挿入したポリヌクレオチドの一時的または安定的発現のためにさらに改変することができる。

#### 【0124】

本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、ポリヌクレオチドの組換え複製のため、および本発明のペプチドの組換え産生のために有用である。または、本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、本明細書に記載の方法において、対象における免疫応答を誘導するために用いてもよい。

#### 【0125】

本発明のポリヌクレオチドの組換え複製のため、および本発明のペプチドの組換え産生のために適した宿主細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよい。宿主系は当技術分野で知られており、本明細書で詳細に説明する必要はない。原核宿主には細菌細胞、例えば大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*B. subtilis*)およびマイコバクテリアが含まれる。真核宿主は酵母、昆虫、両生類、植物、*C. elegans*(またはセンチュウ)および哺乳動物の細胞である。これらの細胞を、プロモーターの誘導のため、形質転換体の選択のため、または望ましい配列をコードする遺伝子を増幅するために適するように改変した従来の栄養培地中で培養する。

#### 【0126】

宿主細胞が抗原提示細胞である場合には、それらを用いて腫瘍浸潤性リンパ球などの免疫エフェクター細胞の集団を増殖させることができ、続いてこれを養子免疫療法に用いることができる。抗原提示細胞については以下により詳細に説明する。

#### 【0127】

本発明の抗原を提示する宿主細胞

本発明はさらに、本発明の方法によって同定された抗原を提示する、単離された宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、これらの宿主細胞は、2つまたはそれ以上の本発明のペプチドを、ペプチドが免疫エフェクター細胞によって認識されるようにMHC分子と関連して細胞表面に提示する。本発明のポリペプチドをMHC分子と関連して提示する単離された宿主細胞はその上、教育された抗原特異的免疫エフェクター細胞の集団の増殖および単離のためにも有用である。免疫エフェクター細胞、例えば細胞傷害性Tリンパ球は、ナイーブ免疫エフェクター細胞を、APCの表面にMHC分子と関連してポリペプチ

ドを提示する抗原提示細胞とともに培養することによって生じる。この集団は、FACS分析またはFICOLL（商標）勾配などの当技術分野で知られた方法を用いて精製することができる。免疫エフェクター細胞の作製および培養のための方法、ならびにそれによって生じる集団も本発明者らによる寄与であり、発明である。細胞および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物は養子免疫療法に有用である。インビボでの投与の前に、免疫エフェクター細胞を細胞のターゲティング能力に関してインビトロでスクリーニングする。

【0128】

これらの態様のいくつかにおいて、単離された宿主細胞はAPCである。APCには、樹状細胞（DC）、単球/マクロファージ、Bリンパ球、または必要なMHC/補助刺激分子を発現する他の細胞種が非制限的に含まれる。

10

【0129】

いくつかの態様では、免疫エフェクター細胞および/またはAPCを遺伝的に改変する。免疫エフェクター細胞を増殖させる前、最中またはその後に、標準的な遺伝子導入を用いて、補助刺激分子および/または刺激性サイトカインをコードする遺伝子を挿入することができる。

【0130】

APCは、末梢血単核細胞（PBMC）、全血、または混合集団を含むその画分、脾細胞、骨髄細胞、腫瘍浸潤性リンパ球、白血球分離によって得た細胞、リンパ節、例えば腫瘍の所属リンパ節を非制限的に含む、さまざまな源から入手可能である。適したドナーには、免疫処置ドナー、非免疫処置（ナイーブ）ドナー、処置を受けたまたは受けていないドナーが含まれる。「処置を受けた（treated）」ドナーとは、1つまたは複数の生物学的修飾物質に曝露されたドナーのことである。「処置を受けていない」ドナーとは、1つまたは複数の生物学的修飾物質に曝露されていないドナーのことである。APCにインビトロで1つまたは複数の生物学的修飾物質による処置を行うこともできる。

20

【0131】

APCは一般に生細胞であるが、照射したAPC、マイトマイシンCで処理したAPC、弱毒化したAPC、または化学固定したAPCでもよい。さらに、APCが全細胞である必要もない。実際に、APCの小胞調製物を用いることができる。

【0132】

APCは遺伝的に改変することができる、すなわち、通常は発現されないか、または通常はより低いレベルで発現されると考えられるポリペプチドまたはRNA分子を発現するように、組換えポリヌクレオチド構築物をトランスフェクトすることができる。ポリヌクレオチドの例には、MHC分子をコードするもの；B7などの補助刺激分子；および本発明のペプチドまたはポリペプチドが非制限的に含まれる。

30

【0133】

哺乳動物の体内でインビボで通常はAPCのように働かない細胞を、それらがAPCとして働くように改変することができる。非常にさまざまな細胞が、適切に改変されればAPCとして働くことができる。このような細胞の例には、昆虫細胞、例えばショウジョウバエ（*Drosophila*）またはハスモンヨトウ（*Spodoptera*）；およびヒト細胞株T2などの養育細胞が含まれる。例えば、MHC分子などの1つまたは複数の抗原提示性ポリペプチドの合成を、選択的にはB7などの補助分子との合成とともに指令する発現ベクターをこれらの細胞に導入して、これらの細胞の表面に抗原提示分子、および選択的には補助分子またはその機能的部分を発現させることができる。または、自ら細胞膜に挿入しうる抗原提示ポリペプチドおよび補助分子を用いることもできる。例えば、グリコシル-ホスファチジルイノシトール（GPI）修飾したポリペプチドは自らを細胞膜に挿入可能である。ヒロセ（Hirose）ら（1995）*Methods Enzymol.* 250:582~614；およびファン（Huang）ら（1994）*Immunity* 1:607~613。補助分子には、CD28、CD80またはCD86に対して特異的な抗体などの補助刺激抗体；B7.1およびB7.2を非制限的に含む補助

40

50

刺激分子；ICAM-1およびLFA-3などの接着分子；ならびにFasリガンドおよびCD70などの生存に関係する分子が非制限的に含まれる。例えば、PCT出願の国際公開公報第97/46256号を参照のこと。

【0134】

養育(foster)抗原提示細胞はAPCとして特に有用である。養育APCは、内因性ペプチドの細胞表面MHCクラスI分子との会合を制限する抗原プロセッシング経路に1つの変異を含む、T2と呼ばれるヒト細胞株174xCEM.T2から派生する。ツヴェリンク(Zweerink)ら(1993)J. Immunol. 150:1763~1771。これは、MHCクラスI拘束性CD8<sup>+</sup>CTLに対する抗原提示のために必要な遺伝子TAP1、TAP2、LMP1およびLMP2を含むMHCクラスII領域に大きなホモ接合性欠失があるためである。事実上、これらの細胞の表面には「空の(empty)」MHCクラスI分子のみが提示される。培地に添加した外因性ペプチドは、ペプチドがアレル特異的な結合モチーフを含むならば、これらのMHC分子と結合する。これらのT2細胞を本明細書では「養育(foster)」APCと称する。それらは、抗原を提示させるために本発明と組み合わせて用いることができる。

10

【0135】

特定の組換えMHCアレルを用いたT2細胞の形質導入により、MHC拘束プロファイルのリダイレクション(redirection)が可能となる。係留残基が内因性アレルとの効率的な結合を妨げられると思われるため、それらによって、組換えアレルに適合したライブラリーが優先的に提示されると考えられる。

20

【0136】

MHC分子の高レベル発現により、CTLがAPCをさらに認識しやすくなる。強力な転写プロモーター(例えば、CMVプロモーター)を用いてT2細胞で関心対象のMHCアレルを発現させることにより、より反応性の高いAPCが生じる(これは細胞表面の反応性MHC-ペプチド複合体の濃度が高くなるためである可能性が高い)。

【0137】

APCの単離のための2つの基本的なアプローチを以下に簡単に説明する。これらのアプローチには(1)骨髄前駆物質細胞(CD34<sup>+</sup>)を血液から単離し、それらを刺激してAPCに分化させること；または(2)あらかじめ分化能が決定された(precommited)APCを末梢血から収集すること、が含まれる。第1のアプローチでは、末梢血中の循環CD34<sup>+</sup>幹細胞の数を増やすためにGM-CSFなどのサイトカインを患者に投与する必要がある。

30

【0138】

APCを単離するための第2のアプローチは、すでに血中を循環している、比較的多数のあらかじめ分化能が決定されたAPCを収集するためのものである。分化能が決定されたAPCをヒト末梢血から単離するための以前の方法は、メトリザミド勾配および付着性/非付着性の段階(Freudenthalら(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7698~7702)；パーコール勾配による分離(Mehra-Damaniら(1994)J. Immunol. 153:996~1003)；および蛍光励起細胞選別法(Thomasら(1993)J. Immunol. 151:6840~52)などの物理的手順の組み合わせを含んでいた。

40

【0139】

多数の細胞を互いに分離するための技法の1つは対向流遠心エルトリエーション(CCE)として知られる。この技法では、細胞を遠心にかけると同時に緩衝液の洗い出し流を加え、その流速を一定割合で速める。緩衝液の対向流が一定割合で増加することにより、主として細胞サイズに基づいて細胞の分取分離がもたらされる。

【0140】

本発明の1つの局面において、APCはあらかじめ分化能が決定された、または成熟した樹状細胞であり、これはマウス、サルまたはヒトなどの哺乳動物の白血球画分から単離することができる(例えば、国際公開公報第96/23060号を参照)。白血球画分は哺乳

50

乳動物の末梢血からのものでありうる。この方法は以下の段階を含む：(a)白血球分離などの当技術分野で知られた方法によって哺乳動物源から入手した白血球画分を提供する段階、(b)対向流遠心エルトリエーションにより、段階(a)の白血球画分を4つまたはそれ以上の垂画分に分離する段階、(c)段階(b)による1つまたは複数の画分中の単球の樹状細胞への分化を、細胞をカルシウムイオノフォア、GM-CSFおよびIL-13またはGM-CSFおよびIL-4に接触させることによって刺激する段階、(d)段階(c)からの濃縮した樹状細胞画分を同定する段階、ならびに(e)段階(d)の濃縮画分を好ましくは約4で収集する段階。樹状細胞が濃縮した画分を同定するための1つの方法は、蛍光励起細胞分取によるものである。白血球画分を、組換え(rh)rhIL-12、rhGM-CSFまたはrhIL-4などの他のサイトカインの存在下でカルシウムイオノフォアにより処理することができる。分離の段階の前に、白血球画分の細胞を緩衝液で洗浄し、Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>非含有培地中に再懸濁することができる。白血球画分は白血球分離によって入手しうる。樹状細胞は以下のマーカー：HLA-DR、HLA-DQまたはB7.2の少なくとも1つが存在し、同時に以下のマーカー：CD3、CD14、CD16、56、57およびCD19、20が存在しないことによって同定可能である。これらの細胞表面マーカーに対して特異的なモノクローナル抗体は市販されている。

10

## 【0141】

より詳細には、本方法は、白血球分離による白血球および血小板の濃縮収集物を収集し、続いてこれを対向流遠心エルトリエーション(CCE)によって分画することが必要である。アブラハムセン(Abrahamsen)ら(1991)J. Clin. Apheresis 6:48~53。細胞試料を特殊なエルトリエーション用ローターの中に入れる。続いてローターを定速、例えば3000rpmで遠心する。ローターが望ましい速度に達した時点で、加圧空気を用いて細胞の流速を調節する。エルトリエーター(elutriator)内の細胞を遠心かけると同時に緩衝液の洗い出し流を加え、その流速を一定割合で速める。これにより、細胞サイズに限らないが、主に細胞サイズの違いに基づいた細胞画分分取が行われる。

20

## 【0142】

APCの品質管理、より詳細にはDCの収集およびそれが培養下で首尾よく活性化されることの確認は、単球および樹状細胞の垂集団ならびに混入の可能性があるTリンパ球の両方を観測する同時多色FACS分析法に依存する。これはDCが以下のマーカーを発現しないという事実に基づく：CD3(T細胞)；CD14(単球)；CD16、56、57(NK/LAK細胞)；CD19、20(B細胞)。同時にDCは血中を循環している時点で大量のHLA-DR、かなりのHLA-DQおよびB7.2を発現する(しかし、B7.1はわずかであるかまたは皆無である)(加えて、それらは単球および好中球によっても発現される骨髓性マーカーであるLeuM7およびM9を発現する)。

30

## 【0143】

ひとたび収集すれば、DCリッチ/単球APC画分(通常150~190)をプールして、将来用いるために凍結保存すること、または直ちに短期培養物に加えることが可能である。

40

## 【0144】

または、樹状細胞を上方制御(活性化)し、単球を活性化された樹状細胞表現型に変換するための方法を報告している者もある。この方法は、カルシウムイオノフォアを培地に添加し、単球を活性化された樹状細胞に変換することを含む。カルシウムイオノフォアA23187を例えば培養期間の最初の24~48時間にわたり添加することにより、プールした「単球+DC」画分の均一な活性化および樹状細胞表現型への変換が起こる：特徴的なことに、活性化された集団は一様にCD14(LeuM3)陰性であり、HLA-DR、HLA-DQ、ICAM-1、B7.1およびB7.2は上方制御されている。

## 【0145】

サイトカインの特定の組み合わせを用いることにより、カルシウムイオノフォアによって

50

得られる活性化/変換を増幅する(または部分的に代替する)ことが成功している:これらのサイトカインには、精製または組換えヒト(「rh」)rhGM-CSF、rhIL-2およびrhIL-4が非制限的に含まれる。それぞれのサイトカインを単独で与えても最適な上方制御には不十分である。

【0146】

抗原提示マトリックスによるポリペプチドの提示

本発明の免疫調節法および診断法に用いるための抗原提示マトリックスは、MHC分子と結合した本発明の収束的な抗原性ペプチドリガンドを提示する。任意の既知の方法を、抗原提示マトリックスによる提示を実現するために用いることができる。以下のものは、用いることができる非制限的な例である。

10

【0147】

ポリペプチドは、ポリペプチドもしくはペプチド、またはタンパク質/ペプチドををコードするcDNAの形態として抗原提示細胞に送達することができる。

【0148】

本発明の合成抗原性ペプチドエピトープをAPCに送達するためのもう1つの方法は、パルス刺激(pulsing)によるものである。パルス刺激は、APCをインビトロ/エクスピボで本発明の抗原性ポリペプチドまたはペプチドに対して曝露させることによって行うことができる。ポリペプチドまたはペプチドを1~10 $\mu$ mの濃度で約3時間、APCに対して添加する。パルス刺激を受けたAPCはその後、静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内または腹腔内の送達経路を介して宿主に投与することができる。

20

【0149】

ポリペプチドを、例えばポリペプチドの一部としてまたは別の高分子との複合体として、アジュバントの存在下または非存在下で、静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内または腹腔内の送達経路を介してインビボにて送達することもできる。

【0150】

以下のものを含むさまざまな他の技法を用いることもできる。パグリア(Paglia)ら(1996)J. Exp. Med. 183:317~322は、インビトロで総タンパク質とともにインキュベートしたAPCがMHCクラスI拘束性CTLによって認識されること、およびこれらのAPCによる免疫処置を動物に行うと抗原特異的CTLのインビボでの発生を招くことを示している。加えて、DCなどのAPCのサイトゾル中での抗原の発現をもたらすいくつかの異なる技法も記載されている。これらには(1)腫瘍細胞から単離したRNAのAPCへの導入、(2)抗原の内因性発現を誘導するための組換えベクターによるAPCの感染、および(3)リポソームを用いたDCサイトゾルへの腫瘍抗原の導入(Boczowskiら(1996)J. Exp. Med. 184:465~472; Rouseら(1994)J. Virol. 68:5685~5689; およびNairら(1992)J. Exp. Med. 175:609~612)を参照。

30

【0151】

用いるもう1つの方法は「ペインティング(painting)」と呼ばれている。グリコシル-ホスファチジルイノシトール(GPI)修飾したタンパク質には精製後に自らを細胞膜に再び組み入れる能力があることが示されている。ヒロセ(Hirose)ら(1995)Methods Enzymol. 250:582~614;メドフ(Medof)ら、(1984)J. Exp. Med. 160:1558~1578;メドフ(Medof)(1996)FASEB J. 10:574~586;およびファン(Huang)ら(1994)Immunity 1:607~613は、CTLに対する抗原提示のための特殊な組成のAPCを作り出すためにこの性質を利用した。彼らは2-ミクログロブリンおよびHLA-A2.1アレルに関する発現ベクターを考案した。これらのタンパク質はシュナイダー(Schneider)S2キイロシヨウジヨウバエ(Drosophila melanogaster)細胞で発現され、GPI修飾を補助することが知られている。精製の後にこれらのタンパク質を精製した抗原性ペプチドとともに

40

50

にインキュベートしたところ、自らを自己細胞の膜に効率的に挿入することができる三分子複合体が生じた。本質的には、これらのタンパク質混合物を用いてA P C表面を「ペイント」したところ、抗原性ペプチドに対して特異的なC T Lクローンを刺激する能力が付与された。細胞のコーティングは迅速に起こり、タンパク質濃度依存性であることが示された。このA P C作製法はA P Cへの遺伝子導入の必要性を免れており、細胞表面での抗原性ペプチド密度の調節が可能である。

#### 【0152】

##### 免疫エフェクター細胞

本発明は、抗原特異的免疫エフェクター細胞が濃縮された集団の生成を刺激するために、A P Cを含む上記の組成物を利用する。したがって、本発明は、本発明の抗原性ペプチドに対して特異的な、教育された抗原特異的免疫エフェクター細胞が濃縮された細胞の集団を提供する。これらの細胞は、天然（内因性）抗原上の抗原決定基（エピトープ）と交差反応（特異的に結合）することができる。いくつかの態様において、天然抗原は腫瘍細胞の表面にあり、本発明の教育された抗原特異的免疫エフェクター細胞は腫瘍細胞の増殖を抑制する。A P Cを用いる場合には、培養下で死滅するA P Cを犠牲にして、抗原特異的免疫エフェクター細胞を増殖させる。ナイーブな免疫エフェクター細胞が他の細胞によって教育される過程は、本質的にはクーリー（C o u l i e）（1997）M o l e c . M e d . T o d a y 3 : 2 6 1 ~ 2 6 8に記載されている。

10

#### 【0153】

上記の通りに調製したA P Cをナイーブな免疫エフェクター細胞と混合する。細胞をI L - 2などのサイトカインの存在下で培養することが好ましい。樹状細胞はI L - 1 2などの強力な免疫刺激性サイトカインを分泌するため、1回目および以後の増殖時に補充用のサイトカインを添加する必要はない。いずれにしても、培養条件は、抗原特異的免疫エフェクター細胞がA P Cよりもはるかに早い速度で増える（すなわち、増殖する）ような条件である。抗原特異的細胞の集団をさらに増やすためにA P Cおよび選択的にはサイトカインの多回注入を行うことができる。

20

#### 【0154】

1つの態様において、免疫エフェクター細胞はT細胞である。また別の態様では、免疫エフェクター細胞を、例えば、I L - 2、I L - 1 1またはI L - 1 3をコードする導入遺伝子による形質導入によって遺伝的に改変することができる。導入遺伝子をインビトロ、エキスビボおよびインビボで導入するための方法は当技術分野で周知である。サムブルック（S a m b r o o k）ら（1989）前記を参照のこと。

30

#### 【0155】

本発明の方法における使用に適したエフェクター細胞集団は自家でも同種でもよいが、好ましくは自家のものである。エフェクター細胞が同種性である場合には、用いる前に細胞から同種反応性細胞を除去しておくことが好ましい。これは、例えば、同種エフェクター細胞およびレシピエント細胞集団を混合し、それらを適した期間にわたってインキュベートした後に、C D 6 9 <sup>+</sup>細胞もしくは同種反応性細胞を除去すること、または同種反応性細胞集団におけるアネルギーを誘導することによるものを含む、既知の任意の方法によって行うことができる。

40

#### 【0156】

ハイブリッド免疫エフェクター細胞を用いることもできる。免疫エフェクター細胞のハイブリッドは当技術分野で知られており、さまざまな刊行物に記載されている。例えば、国際特許出願の国際公開公報第98/46785号および国際公開公報第95/16775号を参照のこと。

#### 【0157】

エフェクター細胞集団は分離されていない細胞、すなわち混合集団、例えばP B M C集団、全血などを含みうる。エフェクター細胞集団の操作は、細胞表面マーカーの発現に基づく陽性選択、細胞表面マーカーの発現に基づく陰性選択、1つもしくは複数の抗原によるインビトロもしくはインビボでの刺激、1つもしくは複数の生物学的修飾物質によるイン

50

ビトロもしくはインビボでの処置、1つもしくは複数の抗原もしくは生物学的修飾物質によるサブトラクティブ刺激、またはこれらのいずれかもしくはすべての組み合わせによって行いうる。

【0158】

エフェクター細胞は、P B M C、全血または混合集団を含むその画分、脾細胞、骨髄細胞、腫瘍浸潤性リンパ球、白血球分離によって得た細胞、生検組織、リンパ節、例えば腫瘍の所属リンパ節を非制限的に含む、さまざまな源から入手可能である。適したドナーには、免疫処置ドナー、非免疫処置(ナイーブ)ドナー、処置を受けたまたは受けていないドナーが含まれる。「処置を受けた(treated)」ドナーとは、1つまたは複数の生物学的修飾物質に曝露されたドナーのことである。「処置を受けていない」ドナーとは、1つまたは複数の生物学的修飾物質に曝露されていないドナーのことである。

10

【0159】

エフェクター細胞の抽出および培養の方法はよく知られている。例えば、エフェクター細胞は、白血球分離、連続流細胞分離装置を用いる機械的アフェレーシスによって入手可能である。例えば、リンパ球および単球は、F i c o l l - H y p a q u e (商標) 勾配による分離、パーコール勾配による分離、またはエルトリエーションを非制限的に含む、既知の任意の方法によってパフィーコートから単離することができる。F i c o l l - H y p a q u e (商標) の濃度は、望ましい集団、例えば、T細胞を豊富に含む集団が得られるように調整する。親和性に基づく他の方法も知られており、用いることができる。これらには例えば、蛍光励起細胞分取(FACS)、細胞接着、磁気ビーズ分離などが含まれる。親和性に基づく方法には、細胞表面マーカーに対して特異的であってアメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection)(Manassas, MD)を含む多くの販売元から入手可能な抗体またはその部分を用いてよい。または、親和性に基づく方法に、細胞表面受容体のリガンドまたはリガンド類似体を利用することもできる。

20

【0160】

エフェクター細胞集団に対して、細胞表面マーカーの発現に基づいて1つまたは複数の分離プロトコルを行うことができる。例えば、細胞を、C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、T C R、C D 4 5、C D 4 5 R O、C D 4 5 R A、C D 1 1 b、C D 2 6、C D 2 7、C D 2 8、C D 2 9、C D 3 0、C D 3 1、C D 4 0 Lなどの「分化クラスター」細胞表面マーカー；リンパ球活性化と関連する他のマーカー、例えばリンパ球活性化遺伝子3の産物(LAG3)、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAM)、T1/ST2など；C C R 3、C C R 4、C X C R 3、C C R 5などのケモカイン受容体；C D 6 2 L、C D 4 4、C L A、C D 1 4 6、a 4 b 7、a E b 7などのホーミング受容体；C D 2 5、C D 6 9およびO X 4 0などの活性化マーカー；ならびにC D 1によって提示されるリポグリカンに非制限的に含む、1つまたは複数の細胞表面ポリペプチドの発現に基づく陽性選択にかけることができる。エフェクター細胞集団を、非T細胞および/または特定のT細胞サブセットの欠乏に関する陰性選択にかけることもできる。陰性選択は、C D 1 9およびC D 2 0などのB細胞マーカー；単球マーカーC D 1 4；NK細胞マーカーC D 5 6を非制限的に含む、種々の分子の細胞表面発現に基づいて行いうる。

30

40

【0161】

エフェクター細胞集団は、インビボまたはインビトロでの1つまたは複数の生物学的修飾物質に対する曝露によって操作することができる。適した生物学的修飾物質には、I L - 2、I L - 4、I L - 1 0、T N F - 、I L - 1 2、I F N - などのサイトカイン；フィトヘマグルチニン(PHA)、ホルボールミリステートアセテート(PMA)などのホルボールエステル、コンカナバリン-Aおよびイオノマイシンなどの非特異的修飾物質；細胞表面マーカーに対して特異的な抗体、例えば抗C D 2、抗C D 3、抗I L 2受容体、抗C D 2 8など；リンホタクチンなどを含むケモカインが非制限的に含まれる。生物学的修飾物質は、天然の源から得られた天然因子、組換えDNA技術によって産生された因子、化学合成されたポリペプチドもしくは他の分子、または天然因子の機能的活性を有す

50

る任意の誘導体でありうる。複数の生物学的修飾物質を用いる場合には、曝露は同時でも逐次的でもよい。

#### 【0162】

本発明は免疫エフェクター細胞を含む組成物を提供するが、これは抗原特異的細胞が濃縮されたT細胞でもよい。「濃縮された」とは、細胞集団が、元のナイーブな細胞集団から少なくとも約50倍、より好ましくは少なくとも約500倍、さらにより好ましくは少なくとも約5000倍、またはそれ以上に濃縮されていることを意味する。抗原特異的細胞を含む濃縮された細胞集団は、10%から最大100%が抗原特異的細胞であるというようになりさまざまでありうる。細胞集団が本発明のペプチドに対して特異的な抗原特異的免疫エフェクター細胞を少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%含む場合には、集団は「実質的に純粋である」という。抗原特異的である比率は、例えば、エフェクター細胞集団（例えば、T細胞集団）に対して本発明の抗原提示マトリックス提示および抗原性ペプチドによる刺激を行う<sup>3</sup>Hチミジン取り込みアッセイにより、容易に決定することができる。

10

#### 【0163】

単離された抗体および誘導型抗体

血清抗体、モノクローナル抗体および抗体誘導体は本発明の範囲に含まれる。これらの抗体組成物は本発明の方法を実施することによって同定されたポリペプチドを認識する。このような抗体にはポリクローナルおよびモノクローナル抗体が含まれる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製のため、ならびに対応する核酸配列を導き出すための実験方法は当技術分野で知られている。ハーロウ(Harlow)およびレーン(Lane)(1988)および(1999)前記、ならびにサムブルック(Sambrook)ら(1989)前記を参照。本発明のモノクローナル抗体は、タンパク質またはその断片を動物、例えばマウスまたはウサギに導入することによって生物的に産生することができる。動物体内の抗体産生細胞を単離し、ミエローマ細胞またはヘテロミエローマ細胞と誘導させてハイブリッド細胞またはハイブリドーマを作製する。したがって、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞も提供する。

20

#### 【0164】

すなわち、タンパク質またはその断片およびよく知られた方法を用いて、当業者はハイブリドーマ細胞および本発明の抗体を作製し、タンパク質またはポリペプチドとの結合能のある抗体に関してスクリーニングすることができる。

30

#### 【0165】

試験するモノクローナル抗体がタンパク質またはポリペプチドと結合するならば、検査した抗体および本発明のハイブリドーマによって得られる抗体は等価である。また、本発明のモノクローナル抗体が通常反応するタンパク質またはポリペプチドと結合するのを被験抗体が阻害するか否かを判定することにより、必要以上の実験を行わずに、ある抗体が本発明のモノクローナル抗体と同じ特異性を有するか否かを判定することもできる。本発明のモノクローナル抗体による結合の低下によって示されるように、被験抗体が本発明のモノクローナル抗体と競合するならば、この2つの抗体は同じまたはよく似たエピトープと結合する可能性が高い。または、本発明のモノクローナル抗体をそれが通常反応するタンパク質とプレインキュベートし、被験モノクローナル抗体の抗原との結合能が阻害されるか否かを判定することもできる。被験モノクローナル抗体が阻害されるならば、おそらくそれは本発明のモノクローナル抗体と同じまたはよく似たエピトープ特異性を有すると思われる。

40

#### 【0166】

「抗体」という用語は、抗体のすべてのアイソタイプを含む。モノクローナル抗体の特定のアイソタイプは、初期融合物から選択することにより直接的に調製することもでき、またはステプレフスキー(Stephenski)ら(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8653もしくはスピラ(Spira)ら(198

50

4) J. Immunol. Meth. 74:307に記載された手順を用いて、クラススイッチバリエーションを単離するための同胞選択法を用いることにより、異なるモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製することもできる。

【0167】

本発明は、上記のポリクローナルおよびモノクローナル抗体の生物活性断片も提供する。これらの「抗体断片」は、その抗原または免疫原と選択的に結合する能力をある程度保持している。このような抗体断片には以下のものが非制限的に含まれる：1) Fab、2) Fab'、3) F(ab')<sub>2</sub>、4) Fv、および5) 一本鎖抗体（「SCA」）。

【0168】

「生物活性のある抗体断片」の具体例は、抗体の相補性決定領域（CDR）である。これらの断片の作製方法は当技術分野で知られており、例えば、ハーロウ（Harlow）およびレーン（Lane）（1988）および（1999）前記を参照されたい。

【0169】

本発明の抗体を、キメラ抗体およびヒト化抗体を作り出すために改変することもできる（Oira（1986）BioTechniques 4（3）：214）。キメラ抗体とは、抗体の重鎖および軽鎖の種々のドメインが複数の種からのDNAによってコードされているものである。

【0170】

当業者は、本発明のモノクローナル抗体の特異性を備えたモノクローナル抗体を分泌する他のハイブリドーマを、抗イデオタイプ抗体を作製することによって単離することができる（Herlynら（1986）Science 232：100）。抗イデオタイプ抗体とは、関心対象のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体に存在する固有の決定基を認識する抗体のことである。

【0171】

2つのハイブリドーマのモノクローナル抗体間のイデオタイプの同一性により、2つのモノクローナル抗体が同じエピトープ決定基を認識するという点で同一であることが示される。このため、モノクローナル抗体のエピトープ決定基に対する抗体を用いることにより、同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を発現する他のハイブリドーマを同定することが可能である。

【0172】

また、抗イデオタイプ技術を用いて、エピトープを模したモノクローナル抗体を作製することも可能である。例えば、第1のモノクローナル抗体に対して作製した抗イデオタイプモノクローナル抗体は、結合ドメイン内に、第1のモノクローナル抗体が結合するエピトープの鏡像である超可変領域を有すると考えられる。このため、この場合には、抗イデオタイプモノクローナル抗体を、これらの抗体の産生のための免疫処置に用いると考えられる。

【0173】

本発明において用いる場合、「エピトープ」という用語は、本発明のモノクローナル抗体に対する結合親和性を有する任意の決定基を含む。エピトープ決定基は通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的活性表面基からなり、通常は特異な三次元構造特性ならびに特異な電荷特性を有している。

【0174】

本発明の抗体および/または抗原（ポリペプチド）は、検出可能な物質または標識と結合させることができる。標識および標識法は当業者に知られており、これには多くの異なるものがある。

【0175】

抗体と低分子量ハプテンとの結合により、アッセイ法の感度を高めることができる。続いてハプテンを第2の反応によって特異的に検出することができる。例えば、特異的な抗ハプテン抗体と反応する、ピオチン（アビジンと反応する）、またはジニトロフェノール、ピリドキサルおよびフルオレセインなどのハプテンを用いることが一般的である。ハー

10

20

30

40

50

ロウ (Harlow) およびレーン (Lane) (1988) および (1999) 前記を参照。

【0176】

本発明の抗体をさまざまな担体と結合させることもできる。このため、本発明は、抗体および他の活性または不活性な物質を含む組成物も提供する。よく知られた担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱が含まれる。本発明の目的には、担体の性質は可溶性であっても不溶性であってもよい。当業者は、結合抗体または抗原に適した多くの他の担体を知っているか、またはルーチンの実験を用いることによってそれを確認しうると考えられる。

10

【0177】

抗体、その断片、または抗体を産生する細胞株を含む組成物は本発明に含まれる。これらの組成物を薬学的に用いる場合には、それらを薬学的に許容される担体と組み合わせる。

【0178】

本発明の抗体または抗原を含む組成物は、特異的抗原性ポリペプチド、抗体反応性ペプチドエピトープおよび治療用抗体分子を検出および単離するために有用である。これらの組成物には、病的細胞の診断および阻害に関してさまざまな用途がある。例えば、当技術分野で周知の方法を用いて、動物に抗原性ポリペプチドによる免疫処置を行うことにより、抗原反応性抗体を作製することができる。また、対象への投与用のモノクローナル抗体を調製することも望ましい。ヒト対象に対する使用の場合、抗体分子の種特異的部分がヒト抗体に特徴的な配列へと変換された「ヒト化抗体」を作製するための方法が今では確立している。このような分子は、ヒト対象に投与するとより有効な働きをする。

20

【0179】

診断用抗体は病的細胞を検出するために有用であり、これらの抗体の標識および検出のためのさまざまな代替的な方法が確立されている。例えば、抗体を、抗体の投与後に対象内に局在しうる放射性同位体と結合させることができる。抗原性ペプチド、および診断薬として用いるためのこれらのペプチドを認識する抗体を入手するための改善された手段を提供することは本発明の明確な目的である。

【0180】

治療用抗体を、疾患の進行を抑制するために対象に投与することもできる。ヒト対象では、この目的にヒト化モノクローナル抗体を投与することが望ましい。抗体に受動免疫を付与することができ、これは標的の病的組織中の抗原と結合し、補体媒介性細胞傷害、抗体性細胞傷害または受容体-リガンド相互作用の妨害を誘導することによって疾患を抑制する。または、対象への抗体の投与は、抗イディオタイプ免疫応答を誘導することによって疾患に対する予防接種ともなりうる。ヒト対象に用いる場合、この目的にはマウスモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体が有効である。

30

【0181】

本発明の方法を実施することによって同定された抗原性ポリペプチドは、対象に投与した際には治療薬としても有用であり、またはナイーブな免疫エフェクター細胞を根絶するためにも有用である。このようなポリペプチドはアジュバントとともに製剤化し、病的標的組織に対する免疫応答を誘導するためのワクチンとして投与しうる。このような抗原性ポリペプチドをエキスビボで、例えば、対象から単離した樹状細胞に投与することもできる。続いて、抗原パルス刺激を行った樹状細胞を培養下で増殖させ、養子免疫療法を行うために対象に戻すことができる。

40

【0182】

同様の方法を、本発明の方法によって同定された抗原性エピトープを含む合成ペプチドおよび天然ペプチドを用いて行うことができる。このようなペプチドはインビボでもエキスビボでも投与することができる。また、抗原およびエピトープの適切なアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子送達媒体を用いてそれらを送達することもできる。対象に組換えワクチンによる予防接種を行うためのさまざまな方式および処方が当

50

業者に周知である。

【0183】

本発明の組成物

本発明は、上記のペプチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗原提示マトリックス、ベクター、細胞、抗体およびその断片、ならびに許容される固体または液体担体の任意のものを含む組成物も提供する。組成物を薬学的に用いる場合には、それらを診断的および治療的使用のための「薬学的に許容される担体」と組み合わせる。これらの組成物を、本発明の診断法および免疫調節法のための医薬品の調製のために用いることもできる。

【0184】

診断法

本発明は、本発明のポリペプチドおよび抗体を用いる診断法を提供する。本方法は、本発明のポリペプチドと結合する抗原特異的CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>T細胞の存在を検出するために用いることができる。

【0185】

本発明の診断法は以下を含む：(1)本発明のポリペプチドの有効性を予測するためのアッセイ法；(2)ポリペプチドおよび/またはその天然の相当物に対して特異的な免疫エフェクター細胞の前駆細胞の頻度(すなわち存在および数)を決定するためのアッセイ法；ならびに(3)本発明の免疫調節法におけるポリペプチドまたは抗体の有効性を決定するためのアッセイ法。抗体を、その抗体が産生された対象である細胞表面リガンドを同定するために用いることもできる。

【0186】

本発明の診断法は一般に、ポリペプチドと、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>T細胞などの免疫エフェクター細胞の表面上のTCRまたは抗体などの免疫エフェクター分子との間で特異的な結合が起こるのを可能にする適した条件下で十分な時間にわたって行う。「適切な条件」および「十分な時間」とは一般に、特異的な結合に適した条件および時間である。適切な条件は、約4 から約40 の間、好ましくは約4 から約37 の間、緩衝溶液中であり、pHの範囲は5から9の間である。さまざまな緩衝液が当技術分野で知られており、本発明の診断法に用いることができ、これにはリン酸緩衝食塩水が非制限的に含まれる。結合および反応のための十分な時間は一般に、収束性抗原性ペプチドリガンドに対する試料の曝露後、約1秒間から約24時間であると考えられる。

【0187】

いくつかの態様において、本発明は、本発明のポリペプチドの有効性を予測するための診断アッセイ法を提供する。これらの態様のいくつかにおいては、インビボワクチン試験の予測される有効性をあらかじめ決定するために、規定されたT細胞エピトープを用いて、腫瘍およびウイルス病原体の臨床的な特徴を決定する。これは、規定されたT細胞エピトープを刺激因子として用いる患者末梢血単核細胞の単純な増殖アッセイ法によって行うことができる。反応を誘発するペプチドは、その患者に対して有効なワクチンの候補である。

【0188】

他の態様においては、本発明のポリペプチドに対して特異的であり、そのため活性化される可能性のある休止(ナイーブ)免疫エフェクター細胞の前駆細胞の頻度(すなわち、存在および数)を決定するためのアッセイ法を提供する。これらの態様では、表面に本発明のポリペプチドを有する抗原提示細胞を用いて、生物試料における免疫エフェクター細胞の存在を検出する。抗原特異的免疫エフェクター細胞の決定(および定量化)には機能アッセイ法を用いる。その一例としては、腫瘍のある対象からPBMCを単離する。これらのPBMCの試料を、同じ対象からの標的細胞とともに適した時間にわたって培養する。機能的アッセイ法には、免疫エフェクター細胞の増殖、サイトカイン産生、APCの特異的溶解が非制限的に含まれる。

【0189】

他の態様において、本発明の免疫調節法を含む免疫調節法が、本発明のポリペプチドに対

10

20

30

40

50

する免疫応答を調節する有効性を、本発明の診断アッセイ法を用いて試験することができる。また、これらの診断アッセイ法は、ポリペプチドの生物活性を確認するため、または免疫療法薬の有効性をモニタリングするためにも有用である。これらの態様のいくつかにおいては、本方法によって免疫エフェクター細胞の検出があり、これは抗原性ペプチドエピトープに対する曝露の結果として活性化またはアネルギー化された活性化CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>T細胞であってもよい。本発明の所定のポリペプチドに対する結合の結果として活性化またはアネルギー化されたCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>T細胞の存在に関して、対象由来の細胞を含む試料を試験することができる。

#### 【0190】

##### 免疫調節法

本発明は、本発明のポリペプチドによって個体における免疫応答を調節する方法を提供する。本発明の免疫調節法は、対象における免疫応答の誘導または増加を生じる方法とともに、抑制または減少を生じる方法も含み、本発明のペプチド（または任意の免疫調節薬）の有効量を、ペプチドに対する免疫応答（またはその欠失）に対して望ましい影響をもたらす処方中および/または条件下で、対象に送達することを含む。本発明の免疫調節法には、ワクチン法、養子免疫療法、およびT細胞アネルギーを誘導する方法が含まれる。

#### 【0191】

本発明の方法に用いるための「免疫調節剤」は、免疫応答を調節する分子、高分子複合体または細胞であり、以下のものが含まれる：単独か、または本明細書に記載する種々の処方のいずれかの中に存在する本発明のポリペプチド；本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；MHCクラスIと結合し、続いて（補助刺激分子の存在下または非存在下での）APCを含む抗原提示マトリックスと結合するポリペプチド；別の分子または高分子構造と共有的または非共有的に複合体化したペプチドまたは抗体またはそれらの誘導體；および本発明のポリペプチドに対して特異的な、教育された抗原特異的免疫エフェクター細胞。

#### 【0192】

T細胞活性化を評価するさまざまな方法が知られている。CTL活性化は、トリチウム化チミジン取り込み（DNA合成の指標）、および例えばコロニーの同定による、成長または増殖に関する集団の検査を非制限的に含む、任意の既知の方法によって検出することができる。または、テトラゾリウム塩MTT（3-（4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド）を添加してもよい。モスマン（Mossman）（1983）J. Immunol. Methods 65:55~63；ニックス（Niks）およびオットー（Otto）（1990）J. Immunol. Methods 130:140~151。生細胞のミトコンドリア中に認められるコハク酸デヒドロゲナーゼは、MTTをホルマザン・ブルーに変換する。このため、濃い青色は代謝活性のある細胞を示すと考えられる。さらに別の態様において、放射標識、例えばトリチウム化チミジンの取り込みをアッセイし、細胞の増殖を示してもよい。同様に、タンパク質合成を<sup>35</sup>S-メチオニンの取り込みによって示すことも可能である。さらに別の態様において、細胞傷害性および細胞死滅アッセイ法、例えば典型的なクロム放出アッセイ法を用いて、エピトープ特異的CTL活性化を評価してもよい。CD4<sup>+</sup>T細胞の活性化を検出するためには、サイトカイン産生；および例えばトリチウム化チミジン取り込みによる増殖の測定を非制限的に含む、さまざまな方法の任意のものを用いてよい。

#### 【0193】

標識標的細胞からの<sup>51</sup>Crの放出は、生物試料におけるペプチド特異的CTLの数を評価するのに用いることが可能な標準的なアッセイ法である。腫瘍細胞または本発明のAPCを標的として約200μCiのNa<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>により37°Cで60分間放射標識し、その後洗浄する。続いて、T細胞および標的細胞（~1×10<sup>4</sup>/ウェル）を、96穴U底プレート中で、さまざまなエフェクター対標的比で混合する。プレートを100×gで5分間遠心して細胞接触を開始し、5%CO<sub>2</sub>とともに37°Cで4~16時間インキュベートする。上清中の<sup>51</sup>Crの放出を測定し、T細胞の非存在下で（陰性対照）、ま

10

20

30

40

50

たは0.1% TRITON (商標) X-100とともに(陽性対照)インキュベートした標的と比較する。例えば、ミッシェル(Mishell)およびシーギ(Shiggi)編、「細胞免疫学における主な方法(SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY)」(1980)W. H. Freeman and Co. を参照されたい。

【0194】

本発明のポリペプチドの処方は、望ましい結果に応じて異なると考えられる。一般に、適切な補助刺激分子とともに、クラスII MHC分子によって抗原提示マトリックス上に提示されるペプチドは、そのポリペプチドに対する免疫応答の誘導をもたらすと考えられる。Tリンパ球におけるアネルギー(または無応答性)状態は、表面上に適切なMHC分子を含むが、適切な補助刺激分子を欠く抗原提示マトリックス(APCであってもよい)による抗原の提示によって誘導することが可能である。本明細書に記載するさまざまな処方のいずれを用いてもよい。

10

【0195】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子送達媒体中にて投与することもでき、またはコードされるポリペプチドを組換え的に転写し、翻訳してプロセッシングする宿主細胞に挿入することによって投与することもできる。薬学的に許容される担体中にある本発明のポリヌクレオチドを含む単離された宿主細胞は、有効なワクチン接種を行うために、適切かつ有効な量のアジュバント、サイトカインまたは補助刺激分子と組み合わせることができる。いくつかの態様において、宿主細胞は樹状細胞などのAPCである。サイトカイン、補助刺激分子のいずれかまたは両方の有効量をコードするポリヌクレオチドを挿入することにより、宿主細胞をさらに改変することもできる。

20

【0196】

本発明の方法を、対象にサイトカインまたは補助刺激分子の有効量を共投与することにより、さらに改変することができる。

【0197】

意図した目的に有効であるとして本明細書に提供する作用物質(agent)を、本発明の免疫調節法で治療しようとする疾患を有する対象、またはこのような疾患に対する感受性もしくは発症のリスクがある個体に投与することができる。作用物質をマウス、ラットまたはヒト患者などの対象に投与する場合には、作用物質を薬学的に許容される担体に添加し、対象に全身的または局所的に投与することができる。治療量は経験的に決定可能であり、治療しようとする病変または異常、治療しようとする対象、ならびに治療法の有効性および毒性によって異なると考えられる。

30

【0198】

本発明のポリペプチド、抗体、抗体誘導體、宿主細胞または免疫エフェクター細胞の量は、一部にはその意図する効果によって異なると考えられ、最終的には医師または獣医師の判断による。考慮すべき要因には、治療しようとする状態、投与経路、および処方の性質、哺乳動物の体重、表面積、年齢および全身状態、ならびに投与しようとする特定のペプチドが含まれる。本発明の免疫エフェクター細胞の適切な有効量は一般に、1回の投与当たり約 $10^2$ ~約 $10^9$ 個の範囲にある。細胞を1回投与し、その後に疾患症状または腫瘍塊の減少などの臨床反応をモニタリングすることができる。投与は、例えば月単位で反復してもよく、または適宜反復してもよい。当業者は、適切な投与レジメンが医師または獣医師の判断によるであろうことを理解すると考えられる。

40

【0199】

インピボ投与は単回でもよく、治療経過にわたる連続的または間欠的な投与であってもよい。最も有効な手段および投与量を決定する方法は当業者に周知であり、治療法に用いられる組成物、治療法の目的、治療しようとする標的細胞、および治療しようとする対象によって異なると考えられる。治療する医師により選択される用量レベルおよびパターンで単回または多回の投与を行ってもよい。適切な投薬処方および作用物質の投与方法は以下に見出すことができる。

50

## 【0200】

本発明の作用物質および組成物は、医薬品の製造に用いることができ、従来の手順に従った投与、例えば薬学的組成物中の有効成分により、ヒトおよび他の動物の治療のために用いることもできる。

## 【0201】

より詳細には、本明細書において有効成分とも称する本発明の作用物質は、鼻腔、局所（経皮、エアロゾル、頬側および舌下を含む）、非経口（皮下、筋内、静脈内および皮内を含む）および肺を含む、任意の適切な経路により、治療法のために投与してよい。好ましい経路は、レシピエントの状態および年齢、ならびに治療しようとする疾患または異常によって異なるであろうことも理解されると考えられる。

10

## 【0202】

癌の治療および予防のためのワクチン

1つの態様において、本発明の免疫調節法は癌治療のためのワクチンを含む。癌細胞は免疫系によって認識される可能性のある数多くの新たな抗原を含んでいる。エピトープを特定しうる速度が与えられれば、固形腫瘍の患者からTILを単離し、そのMHC拘束性を決定し、反応性エピトープに関してこれらのCTLを適切なライブラリーに対してアッセイすることにより、罹患個体に対して個別用の抗癌ワクチンを作製することができる。これらのワクチンは、罹患個体に対する治療法となるほか、再発（または疾患に対する家族性遺伝的素因をもつ患者における疾患の確立）に対する予防的治療にもなると考えられる。癌を経験したことが全くない個体の接種は、腫瘍抗原特異的CTL応答がまだ誘発されていなくても予防的治療として非常によく奏功すると予想されるが、これはほとんどの場合に親和性ペプチドが免疫原性であるように思われ、このことから機能性T細胞レパートリーの欠陥は仮にあって比較的に稀である可能性が示唆されるためである。セッテ（Sette）ら（1994）*J. Immunol.* 153: 5586~5592。マウスでは、適切なエピトープを用いたワクチン接種は、成立した腫瘍を除くだけでなく、それを行っていないならば致死的である用量の腫瘍細胞を接種した後の腫瘍再成立も防御する。ビストリン（Bistryn）ら（1993）前記。

20

## 【0203】

ワクチンアジュバントにおける最近の進歩により、ペプチドが免疫系に最大の影響を与えるようにペプチドを投与する有効な手段がもたらされた。デル・ジュディス（Del Giudice）（1994）*Experientia* 50: 1061~1066。これらのペプチドワクチンは、従来の治療法に一般に反応しない転移性腫瘍を治療するのに非常に有意義と考えられる。劣性癌遺伝子のホモ接合型欠失に起因する腫瘍は、体液性（抗体）応答による除去に対する感受性が低いため、細胞性CTL応答を誘発することによってより効果的に治療されると考えられる。

30

## 【0204】

病原生物によって引き起こされる疾患に対するワクチン

本発明のポリペプチドは、病原生物に対する免疫応答を誘導（または増加もしくは増強）させるための方法にも有用である。これらには病原性ウイルス、細菌および原生生物が含まれる。

40

## 【0205】

ウイルス感染症は免疫療法の対象となる理想的な候補である。ウイルス病原体に対する免疫応答は、AIDSの原因となるHIVなどのレンチウイルスの場合のように有効でないことが時にある。これらのウイルスは自然変異の頻度が高いため、免疫系から逃れやすい。しかし、感染細胞の表面に提示されるCTLエピトープの豊富なプロフィールから、変異に対する耐性がほとんどない必須遺伝子における種々の異なる血清型に共通の抗原が同定され、それによってさらに有効なワクチンの設計も可能になると考えられる。

## 【0206】

養子免疫療法

本発明の抗原特異的免疫エフェクター細胞およびAPCの増殖集団は、養子免疫療法措置

50

において、およびワクチンとして有用である。

【0207】

養子免疫療法は、1つの局面において、上記のようにナイーブな免疫エフェクター細胞をAPCとともに培養することによって生じた、教育された抗原特異的免疫エフェクター細胞の実質的に純粋な集団を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、APCは樹状細胞である。

【0208】

1つの態様において、本明細書に記載される養子免疫療法は自己性である。この場合には、APCは単一の対象から単離された親細胞を用いて作製される。増殖集団にもその対象から単離したT細胞を用いる。その上で、抗原特異的細胞の増殖集団を同じ患者に投与する。

10

【0209】

さらにもう1つの態様では、APCまたは免疫エフェクター細胞を、有効量の刺激性サイトカイン、例えばIL-2または補助刺激分子とともに投与する。

【0210】

T細胞アネルギーの誘導法

本発明の方法によって単離された抗原性ポリペプチドは、T細胞アネルギーを誘導するための方法に有用である。これらの方法を用いて治療しうる疾患には、自己免疫疾患、アレルギーおよび同種移植片拒絶反応が含まれる。

【0211】

自己免疫疾患は、身体の免疫系が自己組織に対して反応する疾患である。これには関節炎、潰瘍性大腸炎および多発性硬化症の大半の病型が含まれる。異物として認識される内因性因子に対応する収束性抗原性ペプチドリガンドは、遺伝子治療または他のアプローチを用いる治療の開発に用いられる。例えば、自己免疫を媒介するCTLに対する「自殺基質」として作用しうる合成CLEPITOOPを、上記のように設計することができる。すなわち、MHCアレルに対して高親和性であるがTCRを活性化することはできないペプチドは、当該の抗原を提示している細胞に対する細胞性免疫応答を効果的に遮蔽しうると考えられる。このアプローチを裏づけるものとして、HIVウイルスの潜伏期の長さは抗ウイルス性免疫応答に起因し、ウイルスが最終的に免疫系を回避する機序は、MHC分子を占有するもののTCR溶解反応は刺激しないエプITOOPを作り出して特異なT細胞アネルギーを誘導するためと考えられている。クレナーマン(Klenerman)ら(1995) Eur. J. Immunol. 25: 1927~1931。

20

30

【0212】

T細胞抗原受容体とCD3単独との複合体による、他のシグナルの非存在下でのT細胞のインビトロ刺激により、T細胞アネルギーまたは無反応性が誘導される。インビトロでのインターロイキン-2産生および増殖によって評価されるT細胞活性化には、抗原特異的T細胞および抗原提示細胞の間の細胞間相互作用によって生じる抗原シグナルおよび補助刺激シグナルが必要である。T細胞表面上のこれらのCD2タンパク質とCD58(LFA-3)タンパク質および抗原提示細胞との相互作用、CD11a/CD18(LFA-1)タンパク質とCD54(ICAM-1)タンパク質との相互作用、ならびにCD5タンパク質とCD72タンパク質との相互作用はこのような補助刺激シグナルをインビトロで伝える。抗原提示細胞に由来するサイトカイン(例えば、インターロイキン-1およびインターロイキン-6)も、インビトロでのT細胞活性化をもたらす補助刺激シグナルを提供する。抗原シグナルおよび補助刺激シグナルの両方の送達は、インターロイキン-2遺伝子および他の主要なT細胞活性化遺伝子の安定的な転写につながる。前記の補助刺激シグナルはプロテインキナーゼCおよびカルシウムに依存する。強力な抗原提示細胞はCD80(B7およびBB1)および他の関連した表面タンパク質を発現し、多くのT細胞はB7結合タンパク質、すなわちCD28およびCTLA-4タンパク質を発現する。CD80にCD28およびCDL4-4が結合することにより、プロテインキナーゼCおよびカルシウムに非依存的にT細胞補助刺激経路が刺激され、激しいT細胞増殖を招く。B

40

50

細胞の刺激も、特異的抗原と細胞表面免疫グロブリンとの相互作用に依存する。T細胞由来のサイトカイン（例えば、インターロイキン1および4）、受容体および補助受容体の特定の対によるT細胞とB細胞との物理的接触、またはその両方により、B細胞刺激に必要な1つまたは複数のシグナルが提供される。

#### 【0213】

従来 of 投与経路を用いる。本発明による免疫治療用抗原 - スーパー抗原ポリマーのT細胞刺激量およびアネルギー発生量（または上記の治療的有効量）を標的細胞と接触させる。「T細胞アネルギー有効量」とは、TCRを介した細胞活性の統計学的に有意な障害をもたらすのに有効な量を意図している。これはT細胞活性化試験を用いてインビトロで評価しうる。T細胞アネルギーまたは活性化は、特異的抗原に反応したトリチウムチミジン取り込みによってアッセイされることが典型的である。

10

#### 【0214】

T細胞アネルギーを誘導しうる1つの手法は、MHCクラスI分子中に本発明のポリペプチドを提示するが、T細胞を活性化するのに必要な補助刺激分子は存在しない抗原提示マトリックスをT細胞に対して提示することである。例えば、選択したT細胞クローンが拘束されているMHC抗原を正常な抗原提示細胞（APC）以外の細胞にトランスフェクトしたものをを用いることができる。休止T細胞は、APC以外の細胞宿主にトランスフェクトされたMHCに関連づけられる、休止T細胞によって認識される適切なペプチドとともに提供される。MHCクラスI分子をインバリアント鎖とともに構成性に発現している抗原提示細胞以外の哺乳動物細胞への遺伝子の導入の結果として、MHCが発現される。重要なことにこれらの細胞は、抗原提示細胞と関連し、MHCおよびペプチドとともに補助刺激シグナルを生じる他のタンパク質を、細胞表面タンパク質としても分泌タンパク質としても提供しない。

20

#### 【0215】

アネルギーが誘導されたか否かを決定するためには、被験T細胞を、本発明の抗原をMHCクラスI分子中に、T細胞を活性化するのに必要な補助刺激分子とともに提示するものとともに培養する。培養物を約48時間インキュベートした後にトリチウムチミジン取り込みのパルス添加を行い、約18時間後に取り込みを測定する。T細胞が拘束されていないMHCを用いることまたはT細胞が感受性を持たないペプチドを用いることにより、T細胞を刺激しない抗原提示細胞をT細胞に提示した場合の対照レベルを上回る取り込みがなければ、活性化が存在しないことの指標となる。活性化の程度を評価するために、IL-2、IL-3もしくはIL-4、活性化と関連のある細胞表面タンパク質、例えばCD71に関するアッセイ法、または他の従来 of 技法などの、他の従来 of アッセイ法を用いてもよい。もう1つの方法は、静止T細胞上では発現されるがアネルギー性T細胞上では発現されないタンパク質の発現を評価することである。米国特許第5,747,299号。

30

#### 【0216】

以下の例は、本発明を例示することを意図しており、それを制限するものではない。

#### 【0217】

##### 実験方法

##### 頂側および側底細胞膜タンパク質を単離するための方法

40

図4は、頂側および側底細胞膜の単離に関する概略図を示している。チャーニー（Chaney）およびヤコブセン（Jacobson）（1983）J. Biol. Chem. 258:10062~10072に開示された方法のこの変法により、全細胞可溶化物の調製物の収量に比べて、頂側および側底膜タンパク質が濃縮される。第1に、標的細胞の単層に、原形質膜と結合する「活性化された」陽イオン性コロイドシリカ粒子のスラリーをコーティングする。「活性化された」とは、シリカ粒子をアルミニウムクロロヒドロキシドでコーティングすることにより、スラリーが正電荷を獲得した（すなわち、陽イオン性となった）ことを意図している。次に、ポリアクリル酸ナトリウムなどの陰イオン性ポリマーを添加して陽イオン性シリカ粒子と架橋させ、構造的に安定な薄膜を原形質膜の外側に形成させる。続いて細胞をイミダゾールを主体とする低浸透圧緩衝液と接触させ、

50

細胞を徐々に膨張させて破裂させる。この結果得られる可溶化物は、核、内膜およびシリカでコーティングされた頂側膜を含む；一方、側底膜は細胞培養プレートに付着したままである。水性可溶化物を900gで10分間遠心し、コーティングされた膜および核を沈殿させる。この結果得られる内膜を含む上清は廃棄する。ペレット化した核および膜を再懸濁し、28,000gで30分間遠心して70%ナイコデンツ(Nycodenz)(Sigma, St. Louis, MO)中をさらに沈殿させ、この結果得られる核を含む上清を廃棄する。残るペレットはシリカでコーティングされた頂側膜を含む。単離した頂側膜調製物を単独で用いてもよく、側底膜調製物(これは標準的な細胞培養法を用いて培養プレートから容易に採取しうる)と組み合わせてもよい。

#### 【0218】

イムノプロットからの抗体溶出

固体支持体上の関心対象の抗原と結合する血清抗体に関してさらに分析を行うためには、抗体をその機能が保たれるような様式で取り出す必要がある。機能性抗体を単離するためには、抗体が結合した固体支持体(例えば、ニトロセルロース)の部分を取り出し、マー(Maa, J. S.)、ロドリゲス(Rodriguez)ら(1990)J. Biol. Chem. 265:1569~1577を改変した方法を用いて、抗体を固体支持体から溶出させる。

#### 【0219】

関心対象のバンドを記載のウエスタンブロット法によって同定した後に、できるだけ多くの標的抗原を含む調製用規模(prepscale)のゲルを調製し、ニトロセルロースに移す。標準的なウエスタンブロット法のプロトコールに従って、ブロットを適切な血清または抗体とともにインキュベートして洗浄する。ブロット上に存在する抗体反応(すなわち、バンド)を標準的な技法(すなわち、放射性標識、ECLなど)によってフィルム上に可視化する。

#### 【0220】

フィルムをニトロセルロース膜と並置させた後に、関心対象のバンドを含むニトロセルロースを鋏で切り出して、100mMグリシンpH 2.5緩衝液を含むチューブに入れ、室温で5分間インキュベートする。続いてニトロセルロースの断片をチューブから取り出し、緩衝液(溶出した抗体を含む)を1/10倍容量の1M Tris pH 8.0で中和する。中和後にBSAを緩衝液(溶出液)に添加し、最終濃度を1%とする。

#### 【0221】

図1は、上記のプロトコールによって溶出した抗体が特異的な抗原結合特性を保っていることを示している。右側のプロットは、左側のプロットから溶出した抗Her2抗体(Neomarkers、カタログ番号:MS-327-P:クローンL87およびe2-4001(Ab-10))(Lab Vision Corp., Fremont, CA)を用いて作製した。

#### 【0222】

この後には、単離した機能性抗体を用いてペプチドのライブラリーをスクリーニングし、抗体エピトープの候補を同定することができる。

#### 【0223】

単離した抗体をライブラリーと接触させ、陽性ピーズのシーケンシングを行ってエピトープを同定する。陽性ピーズは、標準的な標識法、すなわちピオチン、酵素、蛍光色素および類似の試薬を用いることによって可視化しうる。エピトープ配列が決定されれば、ペプチドライブラリーのクリーニングで同定されたエピトープ配列を含む遺伝子発現産物の配列を同定する目的で、このペプチドの配列を、適切なサイズの発現産物を有する候補遺伝子の特定のリストと比較することができる。

#### 【0224】

ポリペプチド抗原の免疫沈降のための方法

直接法

関心対象の抗体が豊富にある場合は、標準的な免疫沈降法を用いることができる。例えば

10

20

30

40

50

、関心対象の抗体を上記のよく知られたウエスタンブロット法に用いて、ポリペプチド抗原の高レベル発現を示す標的試料/細胞株をまず同定する。続いて、標準的な技法または本明細書に記載の方法を用いて、標的試料/細胞株を例えば<sup>35</sup>S-メチオニンで代謝的に標識する。標的細胞を丁寧に破壊して溶液中に露出する。続いて、血清抗体を放射性細胞可溶化液に添加してインキュベートし(一般的には、回転させながら4で1~2時間)、例えばプロテインAセファロースビーズにて収集する。抗体および抗原を固体支持体に結合させ、試料の洗浄および濃縮ができるようにする。洗浄用緩衝液(例えば、PBS/Tween-20)を除去した後に、ビーズをSDS-PAGE試料用緩衝液とともにインキュベートし、95に3分間加熱して標準的タンパク質用ゲルにローディングする。ゲル泳動が終わった時点で、ガラスプレートの一方を分離してゲルを露出する(もう一方のプレートには付着したまま)。ゲルが乾燥するのを防ぐためにゲルをラップのシートで覆ってもよい。続いて、標識抗原の位置を検出するために、ゲルを適した時間にわたってX線フィルム上に置く。抗原の位置が検出されたらラップをゲルから外し、ゲルを露光したX線フィルムと正確に並置させて、標識抗原の位置に対応するゲルの部分を鋏を用いて切り出してゲルから回収する。回収した抗原を標準的な方法、例えばMALDI-TOFMSによって分析する。

10

#### 【0225】

##### トレーサー法または間接法

本方法は、用いる抗体の量が限られている場合に利用しうる。この方法は直接法とほぼ同じであるが、関心対象の抗体をイムノブロットから溶出させた後に、<sup>35</sup>S-メチオニン標識した細胞可溶化物からそれに対応する抗原を免疫沈降させる点が異なる。回収した免疫沈降抗原の量がシーケンシングを行うには不十分な場合には、標識した免疫沈降抗原が、追加的な量の抗原を同定して回収するための「トレーサー」として役立つと考えられる。したがって、標識した「トレーサー」抗原を、以前の免疫沈降に用いたものと同じ標的試料/細胞株のより多量のコールド(非標識)細胞可溶化物と混合した上で、上記の通りにタンパク質をゲルで分離する。標識した「トレーサー」抗原の検出により、それ自体のゲル上の位置が同定されるだけでなく、それとともにゲル上を移動したはるかに大量の対応する非標識タンパク質抗原の位置も同定される。上記の通り、続いて、標識した「トレーサー」抗原および対応する共移動性非標識タンパク質抗原の位置を検出するために、ゲルを適切な時間にわたってフィルムに対して露出する。本明細書に記載の方法を用いてゲルから一度切り出す。抗原は標準的な方法によるシーケンシング、または抗原もしくは抗体のさらなる単離に用いることができる。

20

30

#### 【0226】

##### ペプチドライブラリーのスクリーニング

19種の一般的なアミノ酸(システインを除く)を用いて、それぞれのカルボキシ末端の位置のアミノ酸が固定され、そこでリンカーを介して固相支持体と結合しているランダムなペプチドから構成されるコンビナトリアルライブラリーを作製する。ペプチドのカルボキシ末端位置を固定することにより、固体支持体からペプチドが等しく放出される。このライブラリーの複雑度は $19^6$ である、または約4700万種のペプチドを有する。1つの態様において、ライブラリーはランダムな6量体から構成される。代替的な態様において、ライブラリーは、1つまたは複数の固定したまたは不変の位置を有する部分的に重複したペプチド、すなわち7量体~10量体から構成されてもよい。

40

#### 【0227】

1つの典型的な抗体捕捉アッセイでは、標識していない抗原/エピトープを固体支持体上に固定化し、固定化した抗原/エピトープに抗体を結合させるが、抗体は直接標識することもでき、または抗体を特異的に認識すると思われる標識した二次試薬を用いることによって検出することもできる。

#### 【0228】

ほとんどの免疫化学的技法にはある種のバックグラウンドがあるため、特定の抗原の存在量が他のタンパク質と比べて減少するのに伴って、抗体がバックグラウンドから正しい抗

50

原を識別する能力は低下するおそれがある。これはポリクローナル抗体の場合に特にそうである。抗原がバックグラウンドノイズの中から特異的に同定されうる任意の技法を、二次的な技法として用いることができる。

【0229】

「オフビーズ(off-bead)」スクリーニング技術を利用する場合には、阻止抗体の使用による抗体の濃縮が好ましい。本発明の方法の1つの態様においては(図2参照)、利用する抗体を以下の通りに命名する:(a)一次抗体はウエスタンブロットから溶出した抗体のことである;(b)ヒトIgG定常領域に対して特異的な「第1の」二次抗体は「阻止抗体」であり、間接的検出アッセイ法に用いるための酵素標識も行う;(c)「第2の」二次抗体は「真または実際の二次抗体」であり、標識の点を除いて「第1の」二次抗体または阻止抗体とすべての点で同一である。例えば、1匹の動物に単一の免疫原(すなわち、ヒトIgG C R)による免疫処置を行い、その血清を採取して2つのアリコートに分けた上で、一方のアリコートを西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識を有する「第1の」二次(阻止)抗体へと誘導体化し、第2のアリコートをアルカリホスファターゼ(AP)標識を有する「第2の」二次(真または実際の)抗体へと誘導体化した。

10

【0230】

本発明の1つの態様においては、ペプチドライブラリーを以下の通りにスクリーニングする。ライブラリーをまず「第1の」二次(阻止)抗体で飽和させる。阻止抗体を除去するために数回洗浄した後に一次抗体をペプチドライブラリーと接触させる。数回の洗浄段階によって一次抗体をライブラリーから除去する。次に「第2の」二次(真または実際の)抗体をビーズライブラリーと接触させる。「第2の」二次(真または実際の)抗体を洗い流した後に、AP標識した「第2の」二次(真または実際の)抗体の基質である3',3'-ジアミノベンチジン四塩酸(DAB)をライブラリーに添加する。これにより、ペプチドが特異的に結合したビーズは紫色に染色される(図2には黒で示した)。DABを除去するために数回洗浄した後に、ライブラリーを、HRP標識した「第1の」二次(阻止)抗体の基質である5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-リン酸/4-ニトロブルー塩化テトラゾリウム(BCIP/NBT)と接触させた。これにより、ペプチドが特異的に結合したビーズは褐色に染色される(図2には灰色で示した)。「第2の」二次抗体は一次抗体上のヒト定常領域のみと結合するはずであるため、一次抗体が結合したペプチドを有するビーズは紫色に染色されると考えられる。「紫色」のビーズは、褐色および透明なビーズの混合物であるライブラリーの残りのビーズから容易に検出して区別することができる。次に、陽性ビーズを単離してペプチドのシーケンシングを行う。

20

30

【0231】

本発明のもう1つの態様においては、ライブラリーのスクリーニングを、ペプチドを含むビーズを96穴テフロンフィルター底プレート内に例えば10,000ビーズ/ウェルで配置することにより、「オフビーズ(off-bead)」的に行う。各ウェル内の全ビーズからペプチドの一部が化学的に放出され(ペプチドプールとして)、それをレプリカプレート(標準的な96穴プレート)に集める。続いて、ニトロセルロースなどの膜に対して、放出されたペプチドプールのアリコートをスポットティングするか、または96穴真空マニホールドを用いて固定量の放出ペプチドを付着させる。続いて、溶出した関心対象の抗体を用いて、放出ペプチドを含む膜上でウエスタンブロットを行うことができる。陽性抗体:ペプチド複合体がウエスタンブロット上に同定されたところで、「陽性」ペプチドプールが放出されたウェルに含まれるビーズを、新たな96穴フィルタープレート(ビーズ約100個/ウェル)に再び配置することができる。前と同じく、各ウェル内の全ビーズからペプチドの一部がペプチドプールとして放出されるため、そのプールを固体膜支持体に移して抗体との反応性を調べる。この時点で、~100個のビーズのプールから放出されたペプチドに対応する単一の陽性ウェルがあるはずである。これらの~100個のビーズを新たな96穴プレートに再び配置し(今度はビーズ~1個/ウェル)、固相ペプチドの一部を放出させて膜支持体に移す。膜をもう一度関心対象の抗体をプローブとして検索することにより、反応性ペプチドを含む単一のビーズを含むウェルが同定されると思

40

50

われる。エドマン分解または当技術分野で知られた他の適した方法により、陽性ピーズ上の残存ペプチドの直接シーケンシングを行うことができる。

#### 【0232】

SAGEを用いた遺伝子発現データベースの作成

SAGE（遺伝子発現の連続分析）は、米国特許第5,695,937号に記載されている。SAGEとは、何千もの遺伝子転写物を迅速に同定および分析するための技法である。SAGEを用いると、発現された遺伝子に対応する配列タグの同定および分析を行うことができる。「タグ」または「SAGEタグ」とは、メッセンジャーRNAの特定の位置に生じる一般に約20ヌクレオチドまたはそれ未満の短いポリヌクレオチド配列のことである。タグは対応する転写物を同定し、それが転写された遺伝子を同定するために用いられる。SAGEデータベースのアプリケーションは関心対象のポリペプチドを同定するために用いられる。第1に、抗体が結合するタンパク質を発現する標的試料/細胞株（すなわち「陽性」標的試料/細胞）に関する発現データを検討し、前記標的試料/細胞株で過剰発現されるすべての遺伝子を同定する。そのようにして同定された遺伝子は「候補遺伝子の予備的リスト」（すなわち、陽性標的試料/細胞において過剰発現される）を構成する。第2に、対象の血清中に存在する抗体が一意的に結合するタンパク質（抗原）を含まない標的試料/細胞株（すなわち「陰性」標的試料/細胞）における「予備的リスト」中の各遺伝子の発現データを検討する。陰性標的試料/細胞における遺伝子発現レベルを決定した後、選別基準（上記）を満たさない遺伝子を除去し、精緻化された「候補遺伝子のサブセット」、例えば「陽性」標的試料/細胞で過剰発現される遺伝子、および「陰性」標的試料/細胞で発現低下しているものなどを定める。第3に、精緻化された「サブセット」中の候補遺伝子をさらに選別し、対象の血清のウエスタンブロット分析にて抗体が結合したタンパク質（抗原）の観測分子量とほぼ等しい分子量を有するタンパク質を発現する遺伝子を同定および選択する。当業者は、例えばウエスタンブロット分析によって決定されたタンパク質の見かけの分子量はしばしば実際の分子量よりも幾分大きく示されることを理解している。このため、あらかじめ選択した分子量を有するタンパク質を発現を発見しない精緻化された「サブセット」中の遺伝子を除去し、例えば、陽性標的試料/細胞で過剰発現される、陰性標的試料/細胞で発現低下している、あらかじめ選択した特定の分子量のタンパク質産物を有するといった「選抜候補リスト（short list）」に関する基準を満たす遺伝子の数を絞る。

10

20

30

#### 【0233】

SAGEは、単一の候補遺伝子のみが「選抜候補リスト」のすべての基準を満たす場合などには、上記の発現データおよびタンパク質サイズ分析から抗原をコードする遺伝子を同定することができる。しかし、「選抜候補リスト」が基準を満たす複数の候補遺伝子からなる場合もある。このような場合には、本発明はさらに、標的タンパク質を正確に同定するための方法を提供する。このような追加的な分析を行うために、抗体（ウエスタン分析でポリペプチド-抗原と複合体化したもの）をさらに利用する。用いる抗体の量が限られている状況、例えば、抗体をヒト患者の血清試料から入手する場合などには、本発明の方法にて、抗体の機能的活性が保たれるような様式で固体支持体から血清抗体を取り出す。本発明の1つの態様においては、単離した抗体をポリペプチド抗原の免疫沈降に用いる。もう1つの態様においては、単離した抗体を抗体エピトープ候補を同定するためのペプチドライブラリーのスクリーニングに用いる。陽性エピトープ候補は標準的な標識法を用いることによって可視化する（すなわち、放射性同位体、酵素、ビオチン、蛍光色素など）。次にエピトープ候補（ペプチド）のアミノ酸配列を決定し、あらかじめ選択した「選抜候補リスト」中の遺伝子によってコードされる遺伝子発現産物のアミノ酸配列と比較する。エピトープ候補（ペプチド）のアミノ酸配列を含む、あらかじめ選択した「選抜候補リスト」中の遺伝子によってコードされるポリペプチド配列は、抗体が認識および結合する天然のエピトープを規定すると考えられる。

40

#### 【0234】

SAGEデータの選別により、抗腫瘍反応性を有することが示された抗体によって認識さ

50

れる細胞表面標的をコードする、差異を伴って発現される遺伝子を同定することができる。抗原が同定されれば、標的タンパク質抗原が天然の状態で免疫原性であるか否かを判定する目的で、標的タンパク質抗原をヒト癌対象から入手した血清試料に対してさらにアッセイすることができる。

#### 【0235】

##### MALDI-TOFによる抗原同定

関心対象の抗原のヌクレオチドまたは遺伝子候補リストおよび見かけの分子量がわかっても、正しい抗原をまだ明確には同定できない場合も考えられる。固相ライブラリースクリーニングで有用な情報が得られない場合には、第2の技法であるMALDI-TOF(図5に示す)を、ライブラリースクリーニングの代わりにヌクレオチド配列相同性分析と組み合わせてもよい。この方法により、遺伝子分析とは独立した方法によって抗原候補のリストを作成することが可能となる。

10

#### 【0236】

ヌクレオチド配列またはデータベースのリストには「正しい」抗原が1つしかない可能性があり、同じ抗原がMALDI-TOFリストにも存在しなければならないため、この2つの比較によって関心対象の抗原を迅速に同定することができる。さらに、標準的な一次元タンパク質ゲルから入手した抗原を用いて分析を首尾よく行うことができる。両方のリストの「偽陽性物」の間に重複がほとんどまたは全くないという理由は、偽陽性物の各セットが得られる元となった基準が極めて異なることによる。すなわち、正しい抗原に類似した発現パターンを有する擬陽性物(SAGE)と、正しい抗原とたまたま共移動した、またはデータベース検索によって誤って同定された偽陽性物(MALDI-TOF)との間には何ら一貫した因果関係はないと思われる。

20

#### 【0237】

##### MALDI-TOFによるエピトープマッピング

必要な試薬は、精製または半精製した抗原調製物および関心対象の抗体である。第1に、予測可能な分子量のペプチドを生じさせるために、完全な抗原を酵素(例えば、トリプシン、キモトリプシン)または化学物質(例えば、CNBr)による方法で消化する。次に、抗体をペプチド混合物に添加し、その線状認識配列を含むペプチドを「捕捉」する。抗体-ペプチド複合体は、例えば、非結合ペプチドを容易に洗い流せるようにプロテインAをコーティングした磁気ビーズで収集することができる。洗浄後に、溶液のpHを調整することによって抗体複合体を変性させ、関心対象のエピトープを含む結合ペプチドを遊離させる。溶出ペプチドに対してMALDI-TOF質量分析を行うことにより、ペプチド断片の分子量を決定できる。この「実際の」分子量を理論的に「計算した」分子量のリストと比較し、エピトープを含むペプチド断片の配列を同定することができる。

30

#### 【0238】

以下の状況では、あいまいな結果(上記の方法を用いる)が得られる可能性がある:(1)「混入」ペプチドが正しいエピトープを含むペプチドとともに精製された場合、このような場合には複数の分子質量がMS分析で検出されると思われる;および(2)抗原の消化中に最小必須エピトープが破壊された場合(すなわち、それが切断されるコンセンサス配列を有する場合)、このような場合にはMS分析によって質量が同定されないか、混入した質量のみが同定される。

40

#### 【0239】

いずれの(上記の)状況であっても、以下のようにしてあいまいさをしばしば解消することが可能である。同一な試料を異なる抗原消化法(好ましくは、コンセンサス配列が互いに排他的な方法)を用いて処理してもよい。これにより、両方の消化物とともに最小エピトープが破壊される確率を大きく下げられる。両方の消化物から得た質量を比較し、正しいエピトープを含むペプチドを同定する。消化物を比較したところ、エピトープが各消化物から同定したペプチドの間の重複領域に存在することが示されることもあり、最小必須エピトープの位置がさらに精緻化される。消化法の一方がエピトープを破壊しない場合には、他の消化物中の正しいエピトープを含むペプチドは第1の消化物に特異的な切断コン

50

センサ配列を必ず含むものと推定される。

【0240】

実施例1: Her-2抗体反応性ペプチドに関するコンビナトリアルペプチドライブラリーのスクリーニング

HER-2抗原

(EYLGLDVPV, 配列番号:3)

と互いに関連する2つの新規なエピトープ

(EYLGLDYQI; 配列番号:1)

および

(EYLGLEMDV, 配列番号:2)

、ならびにそれらをコードするポリヌクレオチドを、図2および3に示した方法を用いて同定した。ペプチドライブラリーのスクリーニングを「オフビーズ(off-bead)」的に行ったため、前記の間接法またはトレーサー法を用いて抗原またはポリペプチドの濃縮試料を得ることが必要であった。

【0241】

用いた抗体は、抗Her2/neu: Neomarkers カタログ番号MS-599-P1: クローン3B5 (Ab-15) (Lab Vision Corp., Fremont, CA)、ヤギ抗マウスIgG+HRP: Sigmaカタログ番号A9917 (ヤギ2匹からの貯留ポリクローナル血清) およびヤギ抗マウスIgG+AP: Sigmaカタログ番号A1293 (1ヤギ匹からのポリクローナル血清: この同じヤギからの血清は直前に記載した貯留ポリクローナル血清の一部でもある)。

【0242】

10<sup>7</sup>個のビーズ(オレンジ色キャップの50mlチューブに入れた乾燥重量=20.43g {ビーズ=7.2g})を5% BLOTTOで30分以上ブロックした。ビーズをヤギ抗マウスIgG+HRP(1:2500)とともに室温(「RT」)で回転させながら1.5時間インキュベートした。ビーズをPBS+0.1% Tween 20で数回洗い、抗Her2/neu抗体Ab-15(以前にイムノプロットから溶出したもの)とともに20ml中にて2時間、RTでインキュベートした。ビーズをPBS+0.1% Tween 20で数回洗った。このビーズをヤギ抗マウスIgG+AP(1:2500)とともにRTで回転させながら1.5時間インキュベートした。

【0243】

ビーズを回転させながらO/N、4で洗浄した。AP(アルカリホスファターゼ)の基質であるBCIP/NBT(5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸/4-ニトロブルー塩化テトラゾリウム)(Zymedカタログ番号00-2210; So. San Francisco, CA)を添加し、ビーズとともにRTで30時間インキュベートした。このビーズをPBSで数回洗った。HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)の基質であるDAB(3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸)(Vector labsカタログ番号SK-4100; Burlingame, CA)を添加し、10時間インキュベートした。このビーズをPBSで数回洗った。ビーズを解剖顕微鏡で観察した。紫色に染色されたビーズを選択し、フィルター底96穴マイクロタイタープレート中に配置した。配置したビーズの2つからペプチドをトリフルオロ酢酸(TFA)による化学的切断によって放出させ、続いてシーケンシングを行った。

【0244】

図3は、Her-2抗体が溶出したウエスタンプロット(左上)およびシーケンシングを行った「陽性」ビーズの1つ(左下)を示している。図の右下には、Her-2タンパク質のある領域を有する2つのライブラリー配列のアライメントを示している。これらの配列を候補遺伝子データベースのリストと比較した。この領域は Her2抗体の作製に

10

20

30

40

50

最初に用いた15アミノ酸のペプチドの内部に位置する。

【0245】

実施例2：MALDI-TOFを用いた抗原同定

この実施例では、アデノウイルスベクターにて送達されるMART-1ワクチンによる治療を受けた黒色腫患者および完全な臨床反応がみられた例からの分画していない縦断的な血清試料を分析した。

【0246】

転移の多部位縮退と関連したIgM抗体活性が同定された。血清のプロットを行った可溶化物の調製に用いた細胞株はすべて、SAGEデータが入手可能な腫瘍細胞株であった。

図6参照。

【0247】

関心対象のバンドを同定した上で、上に示した分析に用いるための同一なタンパク質ゲルを第3の縦断的な血清試料を用いて調製した。このバンドをゲルから切り出してトリプシンで消化した。MALDI-TOF MSをトリプシン処理ペプチドに対して行ったところ、99種の分子質量が明らかになった。これらの質量を、UCSFのピーター・ベーカー(Peter Baker)およびカール・クローザー(Karl Clauser)により開発されたMS-FITプログラム(<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtm13.4/msfit.htm>を参照)を用いて、SwissProtデータベース中の全タンパク質のトリプシン消化物の計算値と比較した。

【0248】

検索パラメーターは以下のようにまとめられる：

データベース 統計量	{	データベース：SwissProt. 111000
		分子量の範囲：1,000~50,000Da (66,218項目を選択)
		PIの範囲：全体(90,195項目)
		種検索：ヒト(6,187項目)
試料統計量	{	[MW, PI, 種の組み合わせで3,801項目を選択]
		一致するペプチドの最小数：4
		消化：トリプシン
		誤切断の最大数：1
結果	{	入力質量数：99
		MS-Fit検索により187項目を選択(上位100件を収集)

【0249】

MALDI-TOF抗原候補リストを上に示したスコアの高かったタンパク質を用いて作成した上で、データベースライブラリー、この場合には黒色腫細胞株から作成したSAGEライブラリーを用いて、このリストの上位100件を細胞株における発現パターンに関して調べた。おおよそ正しい分子量のタンパク質のみ、ウエスタンブロットの結果と概ね一致した。

【0250】

抗体を確認するために、市販のモノクローナル抗体を用いて、このタンパク質を発現することが知られた腫瘍細胞株の全細胞可溶化物からのタンパク質の免疫沈降を行った。全細胞可溶化物、免疫沈降したタンパク質、および免疫沈降した試料の上清を、第3の縦断的な患者血清試料を用いるウエスタンブロット法によって分析した。このプロットを図7に示す。

10

20

30

40

50

## 【0251】

実施例3 動物モデルを用いた抗原の同定または確認

フラデット (Fradet) ら (1984) P. N. A. S. U S A 81 : 224 の方法を用いて、免疫能のあるマウスに対して、全腫瘍細胞、腫瘍細胞膜または培養腫瘍細胞からの無血清馴化培地による免疫処置を行う。屠殺したマウスから全血清を採取し、ライリー (Reilly) ら (2001) Cancer Research 61 : 880 の方法を用いて全抗体を収集する。広在性抗原を認識する汎反応性マウス抗体を除去するために、マウス抗体を正常細胞 (線維芽細胞、リンパ球) に吸着させる。インビトロまたはインビボでのアッセイ法を行って濃縮した抗体調製物の機能的性質を評価する。例えば、抗体が抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) を媒介しうるか否かを判定するために、スコット (Scott) ら (2000) Cancer Research 60 : 3254 の方法を用いて、インビトロで補体および末梢血単核細胞 (PBMC) の存在下でヒト腫瘍細胞に濃縮抗体を加える。または、ライリー (Reilly) ら (2001) 前記の方法により、抗体の産生に用いた免疫能マウスと同様の遺伝的背景を持つ免疫不全マウスに濃縮抗体の養子移入を行い、ヒト腫瘍細胞の注入刺激に対する防御性が付与されるか否かを判定する。抗体調製物がヒト腫瘍細胞をインビトロで死滅させること、またはヒト腫瘍細胞のインビボでの増殖を遅らせることが知られている場合には、生物活性のある抗ヒト癌細胞抗体が存在するはずである。生物活性抗体を用いたウエスタンブロット分析を行い、治療用抗体に対する同族 (cognate) 抗原が直ちに同定するために、抗体による影響を受けるヒト癌細胞に対する反応性を、影響を受けない他のヒト細胞 (癌および正常) と対比して検討する。自己または同種のヒト癌細胞またはマウス癌細胞またはそれぞれの膜画分または脱離抗原は、免疫能マウスに生物活性のあるポリクローナル抗体を産生させるのに有用である。しかし、生物活性のある抗体が生じる確率は、免疫能マウスにおける抗体産生に用いるヒト腫瘍細胞が、免疫不全マウスに対する刺激に用いるものと同じである方が高いと考えられる。

10

20

## 【0252】

実施例4 自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスと関連づけられる抗原を同定するための方法の使用

さまざまな異なるサイトカインが、全身性エリテマトーデス (「SLE」) の発症と関連づけられている。例えば、インターロイキン10はSLE患者で高値であるように思われ、このことから、それがこの自己免疫疾患の発症または進行に役割を果たす可能性が示唆されている。ロレンテ (Llorente) ら (1955) Journal of Experimental Medicine 181 : 839 は、SLE患者由来の末梢血単核をあらかじめ注射した免疫不全マウスに抗IL-10抗体を投与し、この処置によって処置マウスの血清中のヒト自己抗体の濃度が低下したことを観察している。しかし、他の分泌因子 (インターロイキン1) および細胞表面マーカー (CD40L) もSLE患者で高値であることが報告されており、これらの分子のSLEの発症に対する相対的寄与は不明であるため、そのうち1つの標的 (IL-10) を中和用に恣意的に選択すると臨床的に失敗する可能性がある。

30

## 【0253】

単一の定められた標的に対する抗体を産生させることに代わる選択肢として、免疫能低下マウスに対して、SLE患者の末梢血単核細胞 (「PBMC」) またはSLE患者から単離した細胞 (例えば、樹状細胞、T細胞またはB細胞)、またはこのような細胞に由来する細胞膜もしくは無血清馴化培地による免疫処置を行う。屠殺したマウスから全血清を採取し、全抗体を収集する。広在性抗原を認識する汎反応性マウス抗体を除去するために、マウス抗体を正常細胞 (線維芽細胞、リンパ球) に吸着させる。インビトロまたはインビボでのアッセイ法を行って濃縮した抗体調製物の機能的性質を評価する。例えば、濃縮抗体をSLE患者の細胞に添加する。抗体がADCCを媒介しうるか否かを判定するために、インビトロで補体およびPBMCの存在下でSLE患者の細胞に濃縮抗体を加える。または、免疫不全マウス (抗体の産生に用いた免疫能マウスと同様の遺伝的背景を持つもの

40

50

)に濃縮抗体の養子移入を行い、免疫不全マウスに注入したSLE患者のPBMCの挙動が修飾されるか否かを判定する。抗体調製物がSLE患者のPBMCをインビトロまたはインビボで修飾することが示されれば、SLE標的を認識する生物活性のある抗体が存在するはずである。続いて、生物活性抗体を用いたウエスタンブロット分析を行い、治療用抗体に対する同族抗原を直ちに同定するために、抗体による影響を受ける患者SLE細胞に対する反応性を、影響を受けない他のヒト細胞(健康ドナー由来の正常相当物)と対比して検討する。

#### 【0254】

実施例5 タンパク質の不適切な発現が疾病状態と関連する疾患である多発性嚢胞腎における抗原の同定

10

免疫能のあるマウスに対して、多発性嚢胞腎細胞、またはこの種の細胞に由来する細胞膜もしくは無血清馴化培地による免疫処置を行う。屠殺したマウスから全血清を採取し、全抗体を収集する。広在性抗原を認識する汎反応性マウス抗体を除去するために、マウス抗体を正常細胞(線維芽細胞、リンパ球)に吸着させる。インビトロまたはインビボでのアッセイ法を行って濃縮した抗体調製物の機能的性質を評価する。例えば、濃縮抗体をSLE患者の細胞に添加する。抗体がADCCを媒介しうるか否かを判定するために、インビトロで補体およびPBMCの存在下で多発性嚢胞腎細胞に濃縮抗体を加える。または、多発性嚢胞腎を自然発生するマウス(抗体の産生に用いた免疫能マウスと同様の遺伝的背景を持つもの)に濃縮抗体の養子移入を行い、それがインビボでの嚢胞発生を抑制するか否かを判定する。抗体調製物が嚢胞に対して細胞分裂阻止作用または細胞傷害作用をもつことが示されれば、治療的有用性があると推定される抗体が存在するはずである。続いて、生物活性抗体を用いたウエスタンブロット分析を行い、治療用抗体に対する同族抗原を直ちに同定するために、抗体による影響を受ける嚢胞細胞に対する反応性を、影響を受けない他の細胞と対比して検討する。ポリクローナル抗体の産生、ならびにウエスタンブロット分析およびその後の抗原同定のための可溶化物の調製にはヒトまたは非ヒトのいずれかの多発性嚢胞腎細胞を用いる。

20

#### 【0255】

本発明を上述の態様とともに説明してきたが、前記の説明および実施例は本発明を例示することを意図したものであり、本発明の範囲を制限するものではないことが理解される必要がある。本発明の範囲に含まれる他の局面、利点および修正は、本発明が属する当業者には明らかであると考えられる。

30

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本明細書に提供するプロトコールによって溶出した抗体がその特異的抗原結合性を保っていることを示している。右側のプロットは、左側のプロットから溶出した抗Her2抗体を用いて作製した。

【図2】ヒト抗Her2抗体を用いるトレーサー法または間接法の概略図である。

【図3】Her-2抗体が溶出したウエスタンブロット(上)、および本明細書に記載の方法を用いてシーケンシングを行った「陽性」ピーズの1つ(中)を示している。図の下には、Her-2タンパク質のある領域を有する2つのライブラリー配列のアライメントを示している。

40

【図4】頂側細胞膜および側底細胞膜の単離に関する概略図である。

【図5】関心対象の抗原の同定にMALDI-TOF分析を用いる、本発明の代替的な態様の概略図である。

【図6】MART-1ワクチンによる免疫処置を受けた反応性黒色腫患者から単離した抗体のバンドを示している。ワクチン接種の前および後の血清を示している。

【図7】本発明の方法によって単離した免疫沈降ポリペプチド(タンパク質)のウエスタンブロット法による確認分析である。従来のELISAを用いることにより、ポリペプチドが、反応性患者の血清から単離したIgM抗体を特異的に認識してそれと結合することが示されている。中央のレーン(IP上清)ではバンドが著しく減弱している。

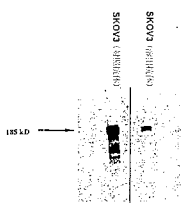
【図8】図7で同定した単離ペプチド(タンパク質)と結合した市販のモノクローナル抗

50

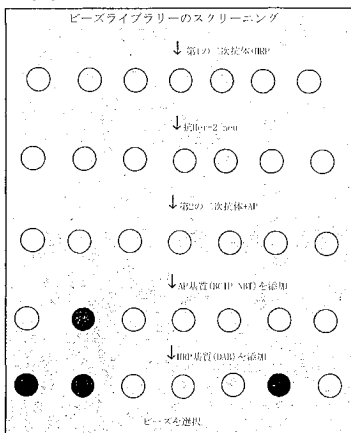
体のウエスタンブロットである。

【図1】

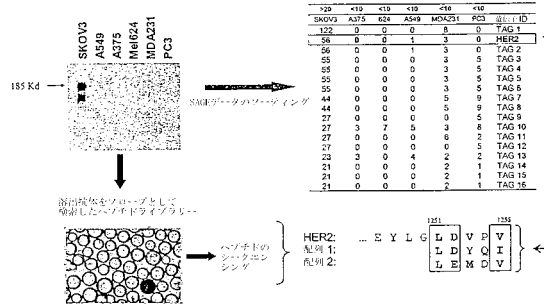
溶出した抗Her2抗体は活性を保つ



【図2】

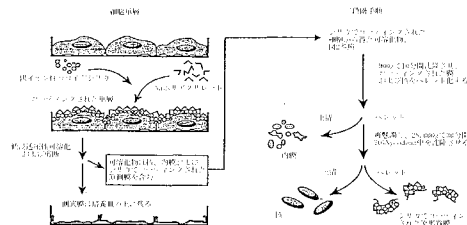


【図3】

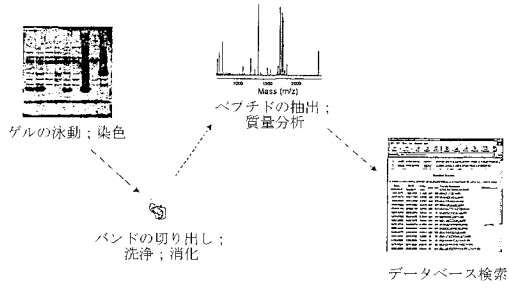


【図4】

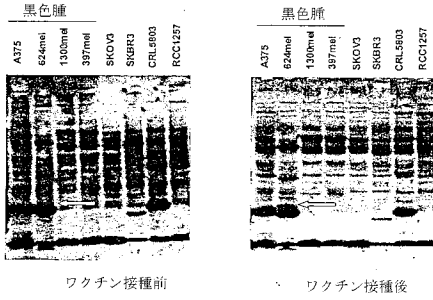
頂側膜および側底膜のタンパク質を精製するための戦略



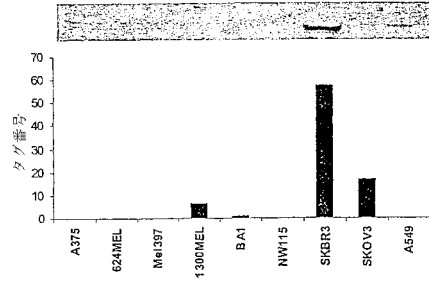
【 図 5 】



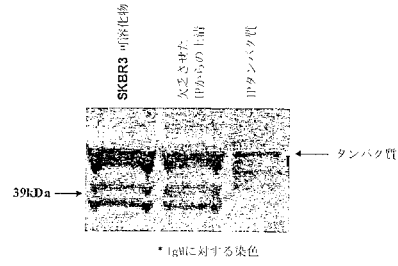
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/23202 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/68, C07K 1/14, 14/47, 16/06, C12N 5/20, 5/10, A61K 38/00

Charles, A. [US/US]; 4 Mill Street, Framingham, MA 01701 (US). ROBERTS, Bruce, L. [US/US]; 108 Pinehill Road, Southborough, MA 01772 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/29238

(74) Agent: KONSKI, Antoinette, F.; McCutchen, Doyle, Brown & Emerson LLP, Suite 1800, Three Embarcadero Center, San Francisco, CA 94111 (US).

(22) International Filing Date: 18 September 2001 (18.09.2001)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/233,586 18 September 2000 (18.09.2000) US  
60/262,835 19 January 2001 (19.01.2001) US  
60/303,751 6 July 2001 (06.07.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENZYME CORPORATION [US/US]; One Kendall Square, Cambridge, MA 01701-9322 (US).

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

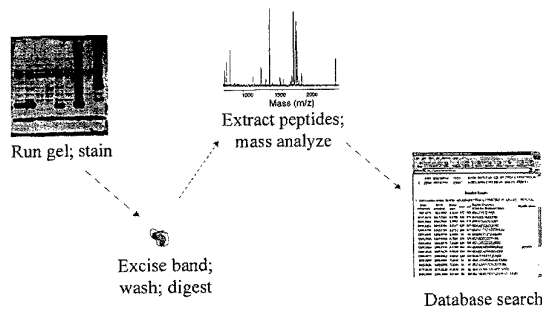
(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): NICOLETTE,

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD TO IDENTIFY THERAPEUTIC ANTIBODY TARGETS ASSOCIATED WITH A THERAPEUTIC RESPONSE



WO 02/23202 A2



(57) Abstract: The present invention provides methods for methods of identifying novel therapeutic polypeptide antigens and epitopes. These methods are designed to select polypeptides that are particularly effective targets for antibody based immunotherapies. The invention further provides therapeutic polypeptide antigens and epitopes polypeptides that are useful for inducing an immune response in a subject. In addition, the invention provides antibodies directed against these polypeptide antigens and epitopes and methods for using these antibodies to inhibit the progression of disease in a subject.

**WO 02/23202 A2**



**Published:**

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

**METHOD TO IDENTIFY THERAPEUTIC ANTIBODY TARGETS  
ASSOCIATED WITH A THERAPEUTIC RESPONSE**

**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

[001] This application claims priority under 35 U.S.C. § 119 (e) to U.S. Provisional Application Serial Nos. 60/233,586; 60/262,835; and 60/303,751, filed September 18, 2000; January 19, 2001; and July 6, 2001, respectively. The contents of these applications are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

**TECHNICAL FIELD**

[002] This invention relates to the fields of immunology and antibody technology.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

[003] The manipulation of antibody molecules and humoral immune responses directed against normal or mutated cellular antigens expressed in cancers or virally infected cells provides a useful approach for the development of therapeutic and diagnostic agents. Modulation of immune responses may further provide useful strategies for addressing autoimmune diseases and other pathogenic phenotypes. The ability to identify well qualified therapeutic antibody targets will facilitate the diagnosis and treatment of additional diseases.

[004] Antibody-based technologies can be applied in a variety of alternative ways. Vaccine strategies to induce production of antibodies directed against tumor specific antigens can be employed for immunotherapy to produce antibody-dependent cellular cytotoxicity, complement-dependent cytotoxicity, and apoptosis (Sinkovics and Horvath (2000) Int. J. Oncol. 16(1):81-96). Monoclonal antibodies directed against cell surface tumor antigens have been shown to be directly effective at treating a number of kinds of cancer (Weiner (1999) Semin. Oncol. 26:43-51). Alternatively, antibody immuno-conjugates derived from tumor antigen specific monoclonals are also useful

as delivery agents for cytotoxic agents and radionuclides or as imaging agents for diagnostic applications (Roselli et al. (1996) *Anticancer Res.* 16(4B):2187-2192; Trail and Bianchi (1999) 11(5):584-588). In addition, anti-tumor antibodies have been shown to induce anti-idiotypic antibodies that mimic the characteristics of tumor antigens. These anti-idiotypic antibodies are capable of further inducing anti-tumor immune responses against the tumor (Fagerberg et al. (1995) 92(11):4773-4777).

[005] Experimental vaccination against cancer also demonstrates that induction of a humoral immune response to tumor antigens is not sufficient to provide a therapeutic effect against the tumor (Sinkovics and Horvath (2000) *Int. J. Oncol.* 16(1):81-96). Individuals treated with tumor-derived vaccines may or may not respond to the therapy even though both responsive and non-responsive subjects can produce polyclonal antibodies that react with tumor antigens. Identification of the antigenic proteins that induce a positive therapeutic effect in responsive subjects treated would be particularly useful in developing effective immunotherapies.

[006] Viral infections are ideal candidates for immunotherapy. Immunological responses to viral pathogens are sometimes ineffective as in the case of the lentiviruses such as HIV which causes AIDS. The high rates of spontaneous mutation make these viruses elusive to the immune system. However, a saturating profile of CTL epitopes presented on infected cells will identify shared antigens among different serotypes in essential genes that are largely intolerant to mutation which would allow the design of more effective vaccines.

[007] Immune responses to non-infectious antigens can result in pathological states such as, for example, autoimmunity, graft rejection and allergy. Common among such disorders is that the normal mechanisms of the immune response are employed to produce symptoms and pathology and, therefore, significant challenges to treatment are presented. Antibodies and/or antigenic peptides, capable of blocking immune response to self-antigen or diverting the immune response to non-pathogenic pathways, for example, are believed to provide a treatment of such disorders without adversely affecting general immune competence.

[008] Historically, antigenic polypeptides present in pathological cells have been identified by comparing the levels of expression of protein samples derived from

WO 02/23202

3

PCT/US01/29238

pathological and normal cell samples to detect individual antigens that are specifically expressed in the pathological cells. This approach has limited utility in identifying candidates for antibody-based immunotherapy, however, since expression levels are not an indication of cellular localization, accessibility or functional relevance. More recently, the combination of expression cloning and immuno-detection methods has been applied to the identification of tumor derived B-cell antigens. Using the SEREX method (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) such antigens have been obtained from a variety of tumor types (WO 00/20460; Tureci et al. (1999) Hybridoma 18(1):23-28). While this method has been useful in finding antigens that elicit a humoral immune response in subjects, this method does not provide "well qualified" antigen targets, because any useful information about the relevance of the identified antigen to disease or its potential utility as a target for immunotherapy is lacking. In fact, many of the antibodies directed against human tumor antigens do not produce a therapeutic effect.

[009] Elucidation of appropriate antigenic polypeptides has been technically difficult. Selection of effective polypeptide targets for antibody technologies requires the identification of accessible antigens with sufficiently restrictive tissue expression patterns to focus the antibody response on the appropriate tissue. For antibody targeting procedures, the abundance and accessibility of the antigenic polypeptide is important, while for therapeutic monoclonal antibody technology, the functional activity of the antigen is critical. Thus, it would be useful to have a means of screening a variety of target pathological cell or tissue samples to identify multiple antigenic polypeptides and antibodies directed against these targets.

[010] This invention satisfies these needs and provides related advantages as well.

#### DISCLOSURE OF THE INVENTION

[011] This invention provides a method to identify a polypeptide correlating with a phenotype of interest, wherein the polypeptide specifically recognizes and binds a serum antibody, said method comprising identifying a polypeptide common to a first list of characterized genes, wherein said genes are differentially expressed in one or more relevant cells or tissues and a second list of characterized polypeptides, thereby identify said polypeptide correlating with said phenotype of interest. The polypeptide

can be isolated from the serum or can be a membrane-associated polypeptide.

[012] In one aspect, the genes are characterized by cell or tissue type. For example, the genes may all be isolated from cells or tissue suspected of expressing the antigen of interest, a cancer cell, a normal cell, a virally infected cell or a cell associated with an autoimmune disorder.

[013] In a further aspect, the genes of the first list are characterized by properties of the gene product, wherein said properties are selected from the group consisting of specific reactivity with the serum antibody, highly expressed in the relevant cell line or tissue, little or no detectable expression in the relevant cell line or tissue, and uniquely expressed in the relevant cell line or tissue. In a yet further aspect, the list is generated or common to cells or tissues having two or more of these properties. In a still a further embodiment, all cells and tissues are selected due to an expression product having a molecular weight within a certain range, i.e., a range similar to or which encompasses the molecular weight of the antigen or polypeptide which binds to the serum antibody.

[014] In another embodiment, the second list is defined by common characteristics of the proteins, wherein such characteristics or properties are selected from the group consisting of mass, reactivity with the serum antibody, peptidase digestion pattern, enzymatic digestion pattern and MOLDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) selection criteria. In a yet further aspect, the list is generated or common to cells or tissues having two or more of these properties. In a still a further embodiment, all cells and tissues are selected due to an expression product having a molecular weight within a certain range, i.e., a range similar to or which encompasses the molecular weight of the antigen or polypeptide which binds to the serum antibody.

[015] MOLDI-TOF is a method to identify proteins based on mass spectrometry data. Examples of MOLDI-TOF selection criteria include but are not limited to database selection, species, type of digest, CNBr, number of miscleavages, molecular weight range, contamination indication, and mass accuracy.

[016] The present invention provides also provides methods to identify a serum protein, polypeptide or epitope correlating with a phenotype of interest, for example

cancer, autoimmune disease, viral pathogens, and including degenerative disorders such as polycystic kidney disease.

[017] In one embodiment, serum protein is isolated from one or more "responsive subjects" i.e., one or more which possesses a desired phenotype, e.g., the presence of a clinical or subclinical response. A subject can exhibit a positive response to an intervention such as reduction of tumor burden in the case of cancer, a reduction in the number of autoimmune antigens or antibodies in the case of autoimmune disease such as systemic lupus erythematosus and a reduction in bone de-mineralization in the case of polycystic kidney disease. However, the invention is not limited to cases of response to therapeutic intervention. Responsive subjects also include those who have been exposed to pathogens or alternatively, having genetic predisposition to disease. In each case, "responsive" subjects include those who do not exhibit clinical or subclinical symptoms associated with the correlative phenotype, e.g., AIDS after exposure to and/or the presence of HIV in the subject or infection after exposure to pathogen. Serum is isolated from one or more "non-responsive" subjects, i.e., those exhibiting the pathogenic phenotype such as cancer, infection or HIV-associated disease such as AIDS. A serum antibody which is differentially present or absent between the responsive serum and the non-responsive serum is identified by assay of the serum against a panel of polypeptides.

[018] In yet a different embodiment, serum is isolated from more than one non-responsive subjects. Serum antibodies which are shared by at least two or more of the subjects may be identified by assay of the serum against a panel of polypeptides. The antibodies are recovered and screened for those that are differentially present or absent by comparison to expressed genetic or peptide data for the phenotype of interest.

[019] In a further embodiment, once antibodies are recovered, they are screened for those that are differentially present or absent are isolated and further analyzed by comparison to expressed genetic data for the phenotype of interest. In a preferred embodiment, the expressed genetic data will be selected to share some properties with the test subjects. In a most preferred embodiment, the expressed genetic data will be from tissues or cells matched to share as many properties as possible. A particularly preferred embodiment is the comparison of the genetic profile of from a responder

WO 02/23202

PCT/US01/29238

6

with a non-responder.

[020] Alternatively, the antibodies are recovered and screened by chromatographic and genetic assays to identify the polypeptide and its polynucleotide sequence.

[021] The invention further provides the polypeptide isolated by the method and methods to confirm diagnostic and therapeutic utility. Yet further provided are antibodies (monoclonal and polyclonal) that specifically recognize and bind the polypeptide(s). Also provided are polynucleotides encoding the polypeptides and antibodies.

[022] Still further provided are isolated cells and cell-surface ligands that specifically bind a polypeptide or antibody of this invention. Still further provided are derivatives of each of the polypeptide, antibody, cell, and cell-surface ligand, e.g., a labeled polypeptide for use in a diagnostic kit or as a drug molecule carrier, a humanized antibody for immunotherapy or antibody fragment for use as a drug molecule carrier, an antigen-presenting cell containing a polynucleotide encoding a polypeptide of this invention and soluble ligand for use to block binding of an antibody or antigen to its target, respectively. Reagents and kits to perform these methods are further provided as well as use of the antibodies and antigens possessing therapeutic and/or diagnostic utility.

[023] Another aspect of the invention is a method for identification of a ligand which binds an antibody, the presence or absence of which has been correlated with a phenotype in a subject. A sample of cells suspected of containing ligand is isolated from a subject and contacted with an effective amount of an antibody or its derivative which has been detectably labeled. The ligand is identified by its binding to the antibody or derivative. Methods to isolate the ligand from the cells containing the ligand are known in the art. Soluble ligand also can be isolated by removal of the cytoplasmic and transmembrane domain of the ligand. Polynucleotides encoding the ligand and its soluble form are further provided herein as well as compositions containing one or more of an isolated ligand, a polynucleotide encoding the ligand, host cells containing and/or the ligand or polynucleotide encoding the ligand are further provided herein.

[024] A test compound which diminishes the binding of the polypeptide or antibody

WO 02/23202

7

PCT/US01/29238

to its partner is further provided herein as well as methods for its identification. A screen to identify these molecules is performed by contacting a sample of polypeptide or antibody with its binding partner in the presence and absence of the test compound. A molecule that inhibits the binding between antibody and polypeptide or ligand as compared to the sample which does not include the test compound (the control sample) is identified as a molecule which diminish the binding of antibody to polypeptide or ligand.

[025] A still further embodiment of the invention is a method to identify candidate drugs for treating tumors or other pathologies identified herein. Cells which express one or more polynucleotides of the invention are contacted with a test compound. Expression of the one or more polynucleotides is determined by hybridization of mRNA of the cells to a nucleic acid probe which is complementary to said mRNA. A test compound is identified as a candidate drug for treating tumors if it decreases expression of the one or more polypeptides of this invention. Alternatively or additionally, the cells are recombinant host cells which are transfected with an expression construct which encodes one or more polypeptides.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[026] Figure 1 shows that antibody eluted by the protocol provided herein retains its specific antigen binding property. The blot on the right was generated with anti-Her2 antibody eluted from the blot on the left.

[027] Figure 2 is a schematic of the Tracer or Indirect Method using human anti-Her2 antibodies.

[028] Figure 3 shows a Western blot from which the Her-2 antibody was eluted (top) and one of the "positive" beads that was sequenced (middle) using the method described herein. The bottom of the Figure shows an alignment of the two library sequences with a region of the Her-2 protein.

[029] Figure 4 shows a schematic for isolation of apical and basolateral cell membranes.

[030] Figure 5 is a schematic of an alternate embodiment of the invention that

utilizes MALDI-TOF analysis to identify the antigen of interest.

[031] Figure 6 shows the band of antibodies isolated from a responsive melanoma patient immunized with a MART-1 vaccine. Pre- and post- vaccination serum are shown.

[032] Figure 7 is a Western blot confirmatory analysis of immunoprecipitated polypeptide (protein) isolated by the method of this invention. Using conventional ELISA, the polypeptide is shown to specifically recognize and bind IgM antibodies isolated from the responsive patient serum. The band is noticeably diminished in the center lane (IP supernatant).

[033] Figure 8 is a Western blot of a commercially available monoclonal antibody bound to isolated peptide (protein) identified in Figure 7.

#### MODES OF CARRYING OUT THE INVENTION

[034] Throughout this disclosure, various publications, patents and published patent specifications are referenced by an identifying citation. The disclosures of these publications, patents and published patent specifications are hereby incorporated by reference into the present disclosure to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

[035] The practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. These methods are described in the following publications. See, *e.g.*, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2<sup>nd</sup> edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al. eds. (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR: A PRACTICAL APPROACH (M. MacPherson et al. IRL Press at Oxford University Press (1991)); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)); ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow and Lane eds. (1988)) USING ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow and Lane eds. (1999)); and ANIMAL CELL CULTURE (R.I.

Freshney ed. (1987)).

#### Definitions

[036] As used herein, certain terms may have the following defined meanings.

[037] As used in the specification and claims, the singular form "a," "an" and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. For example, the term "a cell" includes a plurality of cells, including mixtures thereof.

[038] As used herein, the term "comprising" is intended to mean that the compositions and methods include the recited elements, but not excluding others. "Consisting essentially of" when used to define compositions and methods, shall mean excluding other elements of any essential significance to the combination. Thus, a composition consisting essentially of the elements as defined herein would not exclude trace contaminants from the isolation and purification method and pharmaceutically acceptable carriers, such as phosphate buffered saline, preservatives, and the like. "Consisting of" shall mean excluding more than trace elements of other ingredients and substantial method steps for administering the compositions of this invention. Embodiments defined by each of these transition terms are within the scope of this invention.

[039] A "native" or "natural" antigen is a polypeptide, protein or a fragment thereof which contains an epitope, which has been isolated from a natural biological source, and which can specifically bind to an antigen receptor in a subject, for example, T cell antigen receptor (TCR), B cell antigen receptor (BCR) or surface immunoglobulin.

[040] The term "antigen" is well understood in the art and includes substances which induce a response in the subject. The response may be subclinical, e.g., reduction in viral load in a subject or clinical such as reduction in tumor burden in the case of cancer.

[041] An "altered antigen" is one having a primary sequence that is different from that of the corresponding wild-type antigen. Altered antigens can be made by synthetic or recombinant methods and include, but are not limited to, antigenic peptides that are differentially modified during or after translation, e.g., by

phosphorylation, glycosylation, cross-linking, acylation, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule, membrane molecule or other ligand (Ferguson et al. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57:285-320). A synthetic or altered antigen of the invention is intended to bind to and/or cross-react with the same TCR as the natural epitope.

[042] A "self-antigen" also referred to herein as a native or wild-type antigen is an antigenic peptide that induces little or no immune response in the subject due to self-tolerance to the antigen. An example of a self-antigen is the melanoma specific antigen gp100.

[043] The term "tumor associated antigen" or "TAA" refers to an antigen that is associated with or specific to a tumor. Examples of known TAAs include gp100, MART and MAGE.

[044] "Responsive subject serum (antiserum)" refers to a polyclonal serum sample obtained from a subject showing a desired response after a treatment as compared with a responsive polyclonal serum sample isolated or derived from a similar subject, e.g., receiving the same treatment but does not exhibit desired response, i.e., a "non-responsive subject serum". In one aspect, the serum from a responsive subject will be obtained from a subject exhibiting a clinical or subclinical response.

[045] The term "antigen presenting cells (APCs)" refers to a class of cells capable of presenting one or more antigens in the form of antigen-MHC complex recognizable by specific effector cells of the immune system and, thereby, inducing an effective cellular immune response against the antigen or antigens being presented. While many types of cells may be capable of presenting antigens on their cell surface for T cell recognition, only professional APCs have the capacity to present antigens in an efficient amount and further to activate T cells for cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses. APCs can be intact whole cells such as macrophages, B cells and dendritic cells (DCs); or other molecules, naturally occurring or synthetic, such as purified MHC class I molecules complexed to  $\beta$ 2-microglobulin.

[046] The term "dendritic cells (DCs)" refers to a diverse population of morphologically similar cell types found in a variety of lymphoid and non-lymphoid tissues (Steinman (1991) *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-296). Dendritic cells constitute the most potent and preferred APCs in the organism. A subset of, if not all, dendritic

cells are derived from bone marrow progenitor cells, circulate in small numbers in the peripheral blood and appear either as immature Langerhans' cells or terminally differentiated mature cells. While the dendritic cells can be differentiated from monocytes, they possess distinct phenotypes. For example, a particular differentiating marker, CD14 antigen, is not found in dendritic cells but is possessed by monocytes. Also, mature dendritic cells are not typically phagocytic, whereas monocytes are strongly phagocytosing cells. It has been shown that DCs provide all the signals necessary for T cell activation and proliferation.

[047] The term "immune effector cells" refers to cells capable of binding an antigen and which mediate an immune response. These cells include, but are not limited to, T cells, B cells, monocytes, macrophages, NK cells and cytotoxic T lymphocytes (CTLs), for example, CTL lines, CTL clones, and CTLs from tumor, inflammatory, or other infiltrates. Certain diseased tissues express specific antigens and CTLs specific for these antigens have been identified. For example, approximately 80% of melanomas express the antigen known as gp100.

[048] The term "immune effector molecule" as used herein, refers to molecules capable of antigen-specific binding, and includes antibodies, T cell antigen receptors, and MHC class I and class II molecules.

[049] A "naïve" immune effector cell is an immune effector cell that has never been exposed to an antigen.

[050] As used herein, the term "educated, antigen-specific immune effector cell", is an immune effector cell as defined above, which has encountered antigen and which is specific for that antigen. An educated, antigen-specific immune effector cell may be activated upon binding antigen. "Activated" implies that the cell is no longer in G<sub>0</sub> phase, and begins to produce cytokines characteristic of the cell type. For example, activated CD4<sup>+</sup> T cells secrete IL-2 and have an increased number of high affinity IL-2 receptors on their cell surfaces relative to resting CD4<sup>+</sup> T cells.

[051] A peptide or polypeptide of the invention may be preferentially recognized by antibodies or/and antigen-specific immune effector cells, such as B cells and T cells. In the context of T cells, the term "recognized" intends that a peptide or polypeptide is processed and presented on the surface of an APC together with (i.e., bound to) an

MHC molecule in such a way that a T cell antigen receptor (TCR) on the surface of an antigen-specific T cell binds to the epitope wherein such binding results in activation of the T cell. In the context of B cells, upon binding of an antigen to the B cell receptor (BCR) the antigen is internalized and returned to the cell surface as peptides bound to MHC class II molecules. This peptide:MHC complex is "recognized" by antigen-specific T cells which then activate B cells to secrete antibodies. The term "preferentially recognized" intends that a polypeptide of the invention is substantially not recognized, as defined above, by a T cell specific and/or antigen for an unrelated antigen. Assays for determining whether an epitope is recognized by an antibody or antigen-specific T cell are known in the art and are described herein. In the context of antibody:antigen binding, "specifically recognized and binds" means that the members of the pair are substantially not recognized by other binding partners.

[052] As used herein, "solid phase support" or "solid support", used interchangeably, is not limited to a specific type of support. Rather, a large number of supports are available and are known to one of ordinary skill in the art. Solid phase supports include silica gels, resins, derivatized plastic films, glass beads, cotton, plastic beads, alumina gels. As used herein, "solid support" also includes synthetic antigen-presenting matrices, cells, and liposomes. A suitable solid phase support may be selected on the basis of desired end use and suitability for various protocols. For example, for peptide synthesis, solid phase support may refer to resins such as polystyrene (e.g., PAM-resin obtained from Bachem Inc. (King of Prussia, PA), Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos, CA), etc.), POLYHIPE® resin (obtained from Aminotech, Canada), polyamide resin (obtained from Peninsula Laboratories Inc.), polystyrene resin grafted with polyethylene glycol (TentaGel®, Rapp Polymere, Tubingen, Germany) or polydimethylacrylamide resin (obtained from Milligen/Bioscience, Novato, CA).

[053] The terms "polynucleotide" and "nucleic acid molecule" are used interchangeably to refer to polymeric forms of nucleotides of any length. The polynucleotides may contain deoxyribonucleotides, ribonucleotides, and/or their analogs. Nucleotides may have any three-dimensional structure, and may perform any function, known or unknown. The term "polynucleotide" includes, for example,

single-stranded, double-stranded and triple helical molecules, a gene or gene fragment, exons, introns, mRNA, tRNA, rRNA, ribozymes, cDNA, recombinant polynucleotides, branched polynucleotides, plasmids, vectors, isolated DNA of any sequence, isolated RNA of any sequence, nucleic acid probes, and primers. A nucleic acid molecule may also comprise modified nucleic acid molecules.

[054] The term "peptide" is used in its broadest sense to refer to a compound of two or more subunit amino acids, amino acid analogs, or peptidomimetics. The subunits may be linked by peptide bonds. In another embodiment, the subunit may be linked by other bonds, *e.g.* ester, ether, etc. As used herein the term "amino acid" refers to either natural and/or unnatural or synthetic amino acids, including glycine and both the D or L optical isomers, and amino acid analogs and peptidomimetics. A peptide of three or more amino acids is commonly called an oligopeptide if the peptide chain is short. If the peptide chain is long, the peptide is commonly called a polypeptide or a protein.

[055] The term "genetically modified" means containing and/or expressing a foreign gene or nucleic acid sequence which in turn, modifies the genotype or phenotype of the cell or its progeny. In other words, it refers to any addition, deletion or disruption to a cell's endogenous nucleotides.

[056] As used herein, "expression" refers to the process by which polynucleotides are transcribed into mRNA and translated into peptides, polypeptides, or proteins. If the polynucleotide is derived from genomic DNA, expression may include splicing of the mRNA, if an appropriate eukaryotic host is selected. Regulatory elements required for expression include promoter sequences to bind RNA polymerase and transcription initiation sequences for ribosome binding. For example, a bacterial expression vector includes a promoter such as the *lac* promoter and for transcription initiation the Shine-Dalgarno sequence and the start codon AUG (Sambrook et al. (1989) *supra*). Similarly, an eukaryotic expression vector includes a heterologous or homologous promoter for RNA polymerase II, a downstream polyadenylation signal, the start codon AUG, and a termination codon for detachment of the ribosome. Such vectors can be obtained commercially or assembled by the sequences described in methods well known in the art, for example, the methods described below for constructing vectors in general.

[057] A "gene or polynucleotide library" is a library of nucleotide sequences isolated from cells or tissues suspected of containing the gene encoding the antigen (polypeptide) of interest.

[058] A "peptide library" is a combinatorial library of random amino acid (peptide) sequence.

[059] The term "sequence motif" refers to a pattern present in a group of molecules (e.g., amino acids or nucleotides). For instance, in one embodiment, the present invention provides for identification of a sequence motif among peptides present in an antigen. In this embodiment, a typical pattern may be identified by characteristic amino acid residues, such as hydrophobic, hydrophilic, basic, acidic, and the like.

[060] "Under transcriptional control" is a term well understood in the art and indicates that transcription of a polynucleotide sequence, usually a DNA sequence, depends on its being operably (operatively) linked to an element which contributes to the initiation of, or promotes, transcription. "Operably linked" refers to a juxtaposition wherein the elements are in an arrangement allowing them to function.

[061] "Hybridization" refers to a reaction in which one or more polynucleotides react to form a complex that is stabilized via hydrogen bonding between the bases of the nucleotide residues. The hydrogen bonding may occur by Watson-Crick base pairing, Hoogsteen binding, or in any other sequence-specific manner. The complex may comprise two strands forming a duplex structure, three or more strands forming a multi-stranded complex, a single self-hybridizing strand, or any combination of these. A hybridization reaction may constitute a step in a more extensive process, such as the initiation of a PCR reaction, or the enzymatic cleavage of a polynucleotide by a ribozyme.

[062] Examples of stringent hybridization conditions include: incubation temperatures of about 25°C to about 37°C; hybridization buffer concentrations of about 6 X SSC to about 10 X SSC; formamide concentrations of about 0% to about 25%; and wash solutions of about 6 X SSC. Examples of moderate hybridization conditions include: incubation temperatures of about 40°C to about 50°C; buffer concentrations of about 9 X SSC to about 2 X SSC; formamide concentrations of about 30% to about 50%; and wash solutions of about 5 X SSC to about 2 X SSC.

Examples of high stringency conditions include: incubation temperatures of about 55°C to about 68°C; buffer concentrations of about 1 X SSC to about 0.1 X SSC; formamide concentrations of about 55% to about 75%; and wash solutions of about 1 X SSC, 0.1 X SSC, or deionized water. In general, hybridization incubation times are from 5 minutes to 24 hours, with 1, 2, or more washing steps, and wash incubation times are about 1, 2, or 15 minutes. SSC is 0.15 M NaCl and 15 mM citrate buffer. It is understood that equivalents of SSC using other buffer systems can be employed.

[063] The terms "major histocompatibility complex" or "MHC" refers to a complex of genes encoding cell-surface molecules that are required for antigen presentation to T cells and for rapid graft rejection. In humans, the MHC complex is also known as the HLA complex. The proteins encoded by the MHC complex are known as "MHC molecules" and are organized into class I and class II MHC molecules. Class I MHC include membrane heterodimeric proteins made up of an  $\alpha$  chain encoded in the MHC noncovalently linked with the  $\beta$ 2-microglobulin. Class I MHC molecules are expressed by nearly all nucleated cells and have been shown to function in antigen presentation to CD8+ T cells. Class I molecules include HLA-A, B, and C in humans. Class II MHC molecules also include membrane heterodimeric proteins consisting of noncovalently associated  $\alpha$  and  $\beta$  chains. Class II MHC molecules are known to function in CD4+ T cells and, in humans, include HLA-DP, -DQ, and DR.

[064] The term "autologous" or "autogeneic", as used herein, indicates the origin of a cell. The term indicates that cell samples are derived from the same subject or from a donor genetically identical to the subject. An autologous cell can also be a progeny of an autologous cell. The term also indicates that cells of different cell types are derived from the same subject or from donors genetically identical to the subject.

[065] Similarly, the term "allogeneic" indicates the origin of a cell. The term indicates that cell samples are derived from donors not genetically identical to the subject; in particular, the term relates to non-identity in expressed MHC molecules. An allogeneic cell can also be a progeny of an allogeneic cell. The term also indicates that cells of different cell types are derived from donors not genetically identical to the subject.

[066] A "gene delivery vehicle" is defined as any molecule that can carry inserted

polynucleotides into a host cell. Examples of gene delivery vehicles are liposomes, biocompatible polymers, including natural polymers and synthetic polymers; lipoproteins; polypeptides; polysaccharides; lipopolysaccharides; artificial viral envelopes; metal particles; and bacteria, viruses, such as baculovirus, adenovirus and retrovirus, bacteriophage, cosmid, plasmid, fungal vectors and other recombination vehicles typically used in the art which have been described for expression in a variety of eukaryotic and prokaryotic hosts, and may be used for gene therapy as well as for simple protein expression.

[067] Gene delivery," "gene transfer," and the like as used herein, are terms referring to the introduction of an exogenous polynucleotide (sometimes referred to as a "transgene") into a host cell, irrespective of the method used for the introduction. Such methods include a variety of well-known techniques such as vector-mediated gene transfer (by, *e.g.*, viral infection/transfection, or various other protein-based or lipid-based gene delivery complexes) as well as techniques facilitating the delivery of "naked" polynucleotides (such as electroporation, "gene gun" delivery and various other techniques used for the introduction of polynucleotides). The introduced polynucleotide may be stably or transiently maintained in the host cell. Stable maintenance typically requires that the introduced polynucleotide either contains an origin of replication compatible with the host cell or integrates into a replicon of the host cell such as an extrachromosomal replicon (*e.g.*, a plasmid) or a nuclear or mitochondrial chromosome. A number of vectors are known to be capable of mediating transfer of genes to mammalian cells, as is known in the art and described herein.

[068] A "viral vector" is defined as a recombinantly produced virus or viral particle that comprises a polynucleotide to be delivered into a host cell, either *in vivo*, *ex vivo* or *in vitro*. Examples of viral vectors include retroviral vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors and the like. In aspects where gene transfer is mediated by a retroviral vector, a vector construct refers to the polynucleotide comprising the retroviral genome or part thereof, and a therapeutic gene. As used herein, "retroviral mediated gene transfer" or "retroviral transduction" carries the same meaning and refers to the process by which a gene or nucleic acid sequences are stably transferred into the host cell by virtue of the virus entering the cell and

integrating its genome into the host cell genome. The virus can enter the host cell via its normal mechanism of infection or be modified such that it binds to a different host cell surface receptor or ligand to enter the cell. As used herein, retroviral vector refers to a viral particle capable of introducing exogenous nucleic acid into a cell through a viral or viral-like entry mechanism.

[069] Retroviruses carry their genetic information in the form of RNA; however, once the virus infects a cell, the RNA is reverse-transcribed into the DNA form which integrates into the genomic DNA of the infected cell. The integrated DNA form is called a provirus.

[070] In aspects where gene transfer is mediated by a DNA viral vector, such as an adenovirus (Ad) or adeno-associated virus (AAV), a vector construct refers to the polynucleotide comprising the viral genome or part thereof, and a transgene. Adenoviruses (Ads) are a relatively well characterized, homogenous group of viruses, including over 50 serotypes. See, e.g., WO 95/27071. Ads are easy to grow and do not require integration into the host cell genome. Recombinant Ad-derived vectors, particularly those that reduce the potential for recombination and generation of wild-type virus, have also been constructed. See, WO 95/00655 and WO 95/11984. Wild-type AAV has high infectivity and specificity integrating into the host cell's genome. See, Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 and Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996.

[071] Vectors that contain both a promoter and a cloning site into which a polynucleotide can be operatively linked are well known in the art. Such vectors are capable of transcribing RNA *in vitro* or *in vivo*, and are commercially available from sources such as Stratagene (La Jolla, CA) and Promega Biotech (Madison, WI). In order to optimize expression and/or *in vitro* transcription, it may be necessary to remove, add or alter 5' and/or 3' untranslated portions of the clones to eliminate extra, potential inappropriate alternative translation initiation codons or other sequences that may interfere with or reduce expression, either at the level of transcription or translation. Alternatively, consensus ribosome binding sites can be inserted immediately 5' of the start codon to enhance expression.

[072] Gene delivery vehicles also include several non-viral vectors, including

DNA/liposome complexes, and targeted viral protein-DNA complexes. Liposomes that also comprise a targeting antibody or fragment thereof can be used in the methods of this invention. To enhance delivery to a cell, the nucleic acid or proteins of this invention can be conjugated to antibodies or binding fragments thereof which bind cell surface antigens, e.g., TCR, CD3 or CD4.

[073] A polynucleotide or polynucleotide region (or a polypeptide or polypeptide region) has a certain percentage (for example, 80%, 85%, 90%, or 95%) of "sequence identity or homology" to another sequence means that, when aligned, that percentage of bases (or amino acids) are the same in comparing the two sequences. This alignment and the percent homology or sequence identity can be determined using software programs known in the art, for example those described in CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1. Preferably, default parameters are used for alignment. A preferred alignment program is BLAST, using default parameters. In particular, preferred programs are BLASTN and BLASTP, using the following default parameters: Genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Details of these programs can be found at the following Internet address: [www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST).

[074] "*In vivo*" gene delivery, gene transfer, gene therapy and the like as used herein, are terms referring to the introduction of a vector comprising an exogenous polynucleotide directly into the body of an organism, such as a human or non-human mammal, whereby the exogenous polynucleotide is introduced to a cell of such organism *in vivo*.

[075] The term "isolated" means separated from constituents, cellular and otherwise, in which the polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, are normally associated with in nature. For example, with respect to a polynucleotide, an isolated polynucleotide is one that is separated from the 5' and 3' sequences with which it is normally associated in the chromosome. As is apparent to those of skill in the art, a non-naturally occurring polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, does not require "isolation" to

distinguish it from its naturally occurring counterpart. In addition, a "concentrated", "separated" or "diluted" polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, is distinguishable from its naturally occurring counterpart in that the concentration or number of molecules per volume is greater than "concentrated" or less than "separated" than that of its naturally occurring counterpart. A polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, which differs from the naturally occurring counterpart in its primary sequence or for example, by its glycosylation pattern, need not be present in its isolated form since it is distinguishable from its naturally occurring counterpart by its primary sequence, or alternatively, by another characteristic such as glycosylation pattern. Although not explicitly stated for each of the inventions disclosed herein, it is to be understood that all of the above embodiments for each of the compositions disclosed below and under the appropriate conditions, are provided by this invention. Thus, a non-naturally occurring polynucleotide is provided as a separate embodiment from the isolated naturally occurring polynucleotide. A protein produced in a bacterial cell is provided as a separate embodiment from the naturally occurring protein isolated from a eukaryotic cell in which it is produced in nature.

[076] A "subject" is a vertebrate, preferably a mammal, more preferably a human. Mammals include, but are not limited to, murines, simians, humans, farm animals, sport animals, and pets.

[077] A "control" is an alternative subject or sample used in an experiment for comparison purpose. A control can be "positive" or "negative". For example, where the purpose of the experiment is to determine a correlation of an altered expression level of a gene with a particular type of cancer, it is generally preferable to use a positive control (a subject or a sample from a subject, carrying such alteration and exhibiting syndromes characteristic of that disease), and a negative control (a subject or a sample from a subject lacking the altered expression and clinical syndrome of that disease).

[078] The terms "cancer," "neoplasm," and "tumor," used interchangeably and in either the singular or plural form, refer to cells that have undergone a malignant transformation that makes them pathological to the host organism. Primary cancer cells (that is, cells obtained from near the site of malignant transformation) can be

readily distinguished from non-cancerous cells by well-established techniques, particularly histological examination. The definition of a cancer cell, as used herein, includes not only a primary cancer cell, but also any cell derived from a cancer cell ancestor. This includes metastasized cancer cells, and *in vitro* cultures and cell lines derived from cancer cells. When referring to a type of cancer that normally manifests as a solid tumor, a "clinically detectable" tumor is one that is detectable on the basis of tumor mass; *e.g.*, by such procedures as CAT scan, magnetic resonance imaging (MRI), X-ray, ultrasound or palpation. Biochemical or immunologic findings alone may be insufficient to meet this definition.

[079] "Immunization" or "vaccination" shall mean increasing or activating an immune response against an antigen. It does not require elimination or eradication of a condition but, rather, contemplates the clinically favorable enhancement of an immune response toward an antigen.

[080] "Suppressing" tumor growth or "reducing tumor burden" in a subject indicates a growth state that is curtailed compared to a control. Tumor cell growth can be assessed by any means known in the art, including, but not limited to, measuring tumor size, determining whether tumor cells are proliferating using a <sup>3</sup>H-thymidine incorporation assay, or counting tumor cells. "Suppressing" tumor cell growth means any or all of the following states: slowing, delaying, and "suppressing" tumor growth indicates a growth state that is curtailed when stopping tumor growth, as well as tumor shrinkage.

[081] The term "culturing" refers to the *in vitro* propagation of cells or organisms on or in media of various kinds. It is understood that the descendants of a cell grown in culture may not be completely identical (morphologically, genetically, or phenotypically) to the parent cell. By "expanded" is meant any proliferation or division of cells.

[082] A "composition" is intended to mean a combination of active agent and another compound or composition, inert (for example, a detectable agent or label) or active, such as an adjuvant.

[083] A "pharmaceutical composition" is intended to include the combination of an active agent with a carrier, inert or active, making the composition suitable for

diagnostic or therapeutic use *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo*.

[084] As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, such as a phosphate buffered saline solution, water, and emulsions, such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents. The compositions also can include stabilizers and preservatives. For examples of carriers, stabilizers and adjuvants, see Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)).

[085] An "effective amount" is an amount sufficient to effect beneficial or desired results. An effective amount can be administered in one or more administrations, applications or dosages.

[086] "Serum" sample refers to the fluid phase of blood or plasma (collected from a subject) that contains circulating antibodies and other soluble proteins. In a preferred aspect, a serum sample contains antibodies or proteins that correlate with a phenotype of interest. In one aspect, a "phenotype of interest" is a particular disease state. In another aspect, a "phenotype of interest" is characterized by the presence of antibodies or proteins that correlate with an immune response to a particular treatment.

[087] "Responsive" subject serum (antiserum)" refers to a polyclonal serum sample obtained from a subject showing a desired response after a treatment as compared with a polyclonal serum sample isolated or derived from a similar subject, e.g., receiving the same treatment but does not exhibit a desired response, i.e., a "non-responsive subject serum". In one aspect, the serum from a responsive subject will be obtained from a subject exhibiting a clinical or subclinical response.

[088] Antigenic polypeptides and antibodies that specifically recognize and bind to polypeptides are potentially useful as therapeutic agents. However, only a subset of the antigenic polypeptides expressed by antigen-containing or potential antigen-containing cells are effective targets for immuno- or drug therapy. Current methods for identifying antigenic peptides and associated antibodies do not select antigens on the basis of their potential utility. The present invention provides a means to select antigenic polypeptides the presence or absence of which are associated with a desired response or phenotype by providing a method to identify a polypeptide correlating with a phenotype of interest, wherein the polypeptide specifically recognizes and

binds a serum antibody, said method comprising identifying a polypeptide common to a list of characterized genes, wherein said genes are differentially expressed in one or more relevant cells or tissues and a list of characterized polypeptides, thereby identify said polypeptide correlating with said phenotype of interest. The serum antibody is selected from two or more phenotypes of interest. In one aspect, this is accomplished by selecting serum from subjects that are compared according to a pre-determined phenotype, i.e., they express a differential in a phenotype common to each, e.g., differential response to treatment with a cancer vaccine. Characterized gene expression data is then obtained and a list is obtained through the identification and application of characteristics common the antigen or polypeptide and the list. For example, if the serum antibody is selected from a patient having been treated with cancer, the antigen may first be characterized by its ability to bind to the antibody, (e.g., by Western blot) wherein the antigen is selected from cell or tissue types suspected of expressing the antigen of interest and for which gene expression data is available and has been characterized. This may also provide the molecular weight of the antigen. The database of expressed gene sequences can be further selected or limited by additional common characteristics common to the antigen of interest, methods for determining such characteristics are provide herein.

[089] The second list is generated from separate but relevant protein data, e.g., molecular weight, enzymatic digestion pattern and the light. These properties are common to the antigenic peptide, the properties of which can be determined after isolation of additional antigen from the appropriate sample and using the methods provided herein.

[090] The lists are compared and based on the separate lists relating to related or common phenotypic information, at least one polypeptide common to each list is identified. Based on the selection criteria, this polypeptide binds to a serum antibody isolated from a subject having a pre-selected phenotype.

*Selection of the Polyclonal Samples Produced In Vivo or In Vitro*

[091] In one aspect, the desired response is observed after a treatment. In another aspect, a desired response is observed in a subject in the absence of a treatment.

[092] As used herein, a "treatment" or a "therapy" intends any intervention that increases or activates a response in the host or subject. In some aspects, a therapeutic response is a clinical response, although sub-clinical responses are within the scope of this invention as well. Treatments that may lead to a response include, but are not limited to antibiotic therapy, anti-viral therapy, vaccination, immunization, drug therapy (e.g., small molecules) chemotherapy, radiation therapy, successful resolution of disease after primary surgery, antibody therapy, passive immune therapy, active immune therapy, adoptive immune therapy and the like.

[093] The therapeutic response will vary with the subject being treated and the object of the treatment. Examples include humoral and cellular immune responses, the generation of anti-antigen antibodies, generation of cytotoxic T cells specific for the antigen which will lyse cells displaying the antigen, a non-specific innate immune response, e.g., activation of NK cells, phagocytes or macrophages. Methods for determining whether an immune response has been induced are well known in the art. For example, antigen-specific antibody can be detected using any of a variety of immunoassays known in the art, including, but not limited to, ELISA, wherein, for example, binding of an antibody to an immobilized antigen (or epitope) is detected with a detectably-labeled second antibody (e.g., enzyme-labeled mouse anti-human Ig antibody). Immune effector cells specific for the antigen can be detected in any of a variety of assays known to those skilled in the art, including, but not limited to, FACS, <sup>51</sup>Cr-release assays, or <sup>3</sup>H-thymidine uptake assays.

[094] In one aspect of this invention, serum samples containing polyclonal antibodies are isolated from two or more responsive subjects. In one aspect, a sample containing antibodies are isolated from two or more subjects, who are subsequently treated. Post-treatment serum samples are isolated from two or more subjects. When the subjects' respective immune responses are phenotypically distinguishable, e.g., from both a subject who was "responsive" to the given treatment and a subject who was "non-responsive" to the given treatment. In this example the desired response produced by the responsive subject is a therapeutic immune response.

[095] In yet a different aspect of this invention, phenotypically distinct serum samples for analysis and identification of the therapeutic antigen and antibody can be derived from *in vivo* or *in vitro* screening of subject samples. Examples are provided

herein.

[096] The subject method can also be practice with samples obtained *in vitro* using a combinatorial antibody library (antibody phage) which has been panned on tumor cells, tumor cell membranes or shed antigens from tumor cells *in vitro* to derive a polyclonal population of binding antibodies. The polyclonal antibodies are absorbed using the above-described methods to normal cells to eliminate pan reactive antibodies that recognize ubiquitous antigens and then seek to demonstrate either *in vitro* or *in vivo* that the population of enriched antibodies modulates the behavior of target cells.

#### *Selection and Preparation of Target Peptides*

[097] In order to identify the serum antibody and its polypeptide target antigen, protein (polypeptide) preparations from target sample/cells suspected of containing the antigen or polypeptide are isolated from whole cell or tissue lysates. Alternatively, since many relevant antibody targets are naturally present on the cell surface, preparations of plasma membranes ( *e.g.*, membrane proteins) which are membranes are highly enriched for cell surface proteins can be used. Still further, selective preparations of only apical and basolateral cell membrane proteins are used.

[098] Proteins within whole cell lysates, membrane preparations or enriched preparations of the target samples are arrayed or separated, for example, by molecular weight via electrophoresing, on a protein gel such as an SDS polyacrylamide gel. Identical arrays of the target samples are prepared, one for each serum sample to be assayed. Once separated the proteins are then transferred to a suitable assay medium, *e.g.*, solid support, such as nitrocellulose, bead, and the like, or a liquid carrier. Techniques for manipulating proteins are well known to those skilled in the art. Specific details of such techniques can be obtained from well known sources such as CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al, eds. (1987)); and the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.).

#### *Isolation of the Serum Polypeptide*

[099] In one aspect of the invention, each serum sample is then individually and

independently assayed against separate arrays of target sample prepared as described, *infra* using standard immunological assays for detecting and/or measuring antibody-antigen binding. Western blot analysis is a well known example of such methods.

[0100] The serum antibody is then rescued or eluted from the nitrocellulose without destroying the antibody's functionality using a modification of the method of Maa, J.S. et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:1569-1577. However, any method that removes antibody without loss of functionality can be used.

#### *Enrichment of Serum Peptide*

[0101] Isolation of additional antigenic peptide may be necessary for identification of the antigen. Additional antigen can be isolated using immunochemical techniques. In one aspect of the present invention, the antibody is used to immunoprecipitate the antigen from the expressing target sample/cell line. Those of skill in the art are familiar with a variety of techniques that may be employed to identify a protein of interest. For example, methods for immunoprecipitating are described in Harlow and Lane eds. (1988) and (1999) *supra* or by the direct and/or indirect method described *infra*.

#### *Identification Screens*

[0102] The antigen can be identified using a variety of techniques selected from the group consisting of: 1) direct sequencing, 2) direct sequencing and comparison with a gene or polynucleotide database, 3) amino acid sequencing comparison with a combinatorial peptide library (on and off bead); 4) immunoprecipitation with a peptide library (on and off bead), sequencing and comparison to a gene or polynucleotide database, 5) peptidase digestion, mass spectroscopy and comparison with database of known and previously characterized proteins and 6) mass spectroscopy and comparison with database of known and previously characterized proteins.

#### *Polypeptide Library Screens*

[0103] In some embodiments and prior to identification, the isolated serum antibody

is screened against a second panel or library of peptides selected from a sample suspected of containing the antigen of interest using standard immunochemical techniques. Examples of these methods are known in the art (Sambrook et al., (1989) *supra* and Harlow and Lane (1988) and (1999) *supra*) or described *infra*. These assay can be performed directly on with a blocking antibody as described herein.

[0104] Alternatively, a combinatorial library of random peptides can be used. In a further embodiment, the library has been pre-selected to increase the probability that the antigen of interest is present.

#### *"Gene"-Based Identification*

[0105] The polynucleotide sequence of the isolated peptide can be obtained using conventional sequencing techniques or commercially available materials. The peptide can be obtained subsequent to the second screen against the peptide library. In most instances, the sequence of the peptide is insufficient to provide the identify of the protein containing the epitope. This invention provides the means to identify the protein by comparing the sequence against a database of characterized expressed polynucleotide sequences.

[0106] Most suitable, the database(s) used to identify the protein are derived from target samples, target cell lines or cells or tissue expressing the same or similar phenotype. The term "target sample" or "target cell line" intends a biological sample that has gene expression profile data associated with it. For example, the target sample can be a normal tissue sample, an abnormal sample, a tumor sample, or a cell line which has an associated gene expression profile. DNA and Protein databases are commercially available (Incyte Genomics, California USA) publicly available (*e.g.*, <http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; <http://blast.wustl.edu>; <http://expasy.ch/> ) or can be derived *de novo*.

[0107] Alternatively, one can use any method known in the art used to identify differentially expressed polynucleotides and each can be used in invention methods. As used herein, the term "polynucleotide fragment" includes SAGE tags (described in U.S. Patent No. 5,695,937) as well as any other nucleic acid obtained from any methods that yield quantitative/comparative gene expression data. Such methods

include, but are not limited to, cDNA subtraction, differential display and expressed sequence tag methods. Techniques based on cDNA subtraction or differential display can be quite useful for comparing gene expression differences between two cell types (Hedrick et al. (1984) Nature 308:149; and Lian and Pardee (1992) Science 257:967). The expressed sequence tag (EST) approach is another valuable tool for gene discovery (Adams et al. (1991) Science 252:1651), like Northern blotting, RNase protection, and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis (Alwine et al. (1977) PNAS 74:P5350; Zinn et al. (1983) Cell 34:865; and Veres et al. (1987) Science 237:415). A further method is differential display coupled with real-time PCR and representational difference analysis (Lisitsyn and Wigler (1995) Meth. Enzymol. 254:291).

[0108] It should be understood, although not always explicitly stated, that the selection of target samples/cells from which the gene or polynucleotide database is derived and used for sequence comparison will vary depending on the respective indication being treated, *e.g.*, cancer, autoimmune, viral or parasitic. For example, if the indication is viral, the selected target sample/cell is assayed in both an uninfected state and in a state of infection with the virus of interest. Additional samples of the infected target sample/cell may also be included in the assay. For example, target samples that have been infected over a time course representative of the various stages of viral infection, are useful to monitor and detect the temporal components of infection – *e.g.*, immediate early, constant and late gene expression.

[0109] When the length of the amino acid sequence that is being compared with the database is small, it is advantageous to have a pre-selected collection of sequenced amino acids sequences to search for the identity of the query sequence in order to simplify the search procedure. Information about the specific set of genes expressed by the target sample and the characteristics of the proteins that react uniquely with antibodies present only in a serum sample can be used to create a pre-selected set of proteins.

[0110] Because only a portion of the sequence of a selected antibody reactive peptide may be identical to the sequence of the corresponding natural epitope it is further advantageous to use a pre-selected group of polypeptide sequences when screening for the natural epitope. This increases the efficiency of the screening process by

eliminating irrelevant sequences that may share partial homology with the identified antigenic peptides.

*Identification of the Serum Peptide With Peptide Databases*

[0111] In one embodiment of the invention, the amino acid sequence of the serum peptide is determined by comparison to known and previously characterized peptides.

[0112] For example, the peptide sequence of the epitope can be determined using methods that include, but are not limited to the "phage method" (Scott and Smith (1990) Science 249:386; Cwiria et al. (1990) PNAS 87:6378; and Devlin et al. (1990) Science 249:404), the Geysen method (Geysen et al. (1986) Mol. Immunol. 23:709; and Geysen et al. (1987) J. Immunol. Meth. 102:259), the method of Fodor et al. (1991) Science 251:767), methods to test peptides that are agonists or antagonists as described in Furka et al. (1988) 14<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry Vol. 5 Abstract FR:013; Furka (1991) Int. J. Peptide Protein Res. 37:487); Houghton (U.S. Pat. No. 4,631,211); and Rutter et al. (U.S. Pat. No. 5,101,175), the method utilizing synthetic libraries (Needels et al. (1993) PNAS 90:10700; and Lam et al., U.S. Pat. No. 5,510,240), the method that utilizes indexed combinatorial peptide displays (Ohlmeyer et al. (1993) PNAS 90:10922) and the pepscan technique (Van der Zee (1989) Eur. J. Immunol. 19:43).

[0113] In embodiments employing peptide library screens, most preferably, peptides of the present invention can be synthesized using an appropriate solid state synthetic procedure; Steward and Young, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Freeman, San Francisco, Calif. (1968). A preferred method is the Merrifield process. See, Merrifield (1967) Recent Progress in Hormone Res. 23:451. The amino acid sequence of the antigenic epitope is then determined and compared with the amino acid sequences encoded by a plurality of genes in a pre-selected set of sequences expressed in the target tissue. Polypeptide sequences encoded by genes in the pre-selected group that share sequence homology with the amino acid sequence of the antibody binding peptide will define a natural epitope recognized and bound by the antibody from the serum.

[0114] When the antigenic epitope present in a polypeptide that reacts uniquely with

an antibody in the serum of a subject is identified using the method described herein, it is advantageous to additionally identify a plurality of antigenic peptides that each react with the selected antibody. Because the binding of an antibody to a polypeptide substrate depends on the three dimensional structure of the substrate, and frequently not all of the residues in the epitope make direct contact with the antibody molecule, more than one specific peptide sequence may be found to react with a selected antibody. Alignment of a plurality of identified antibody binding peptides enables the determination of a consensus sequence (or sequence motif) of the epitope to facilitate identification of the natural epitope in a protein database (See Figure 3).

#### *MALDI-TOF MS*

[0115] In this embodiment, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry ("MALDI-TOF MS") is used to identify the peptide targets recognized by antibodies shown to possess reactivity (see Figure 5). In this aspect, after the antibody is isolated or alternatively, the serum in which antibody is present is identified (See Figure 5), an additional protein gel is run to isolate the peptide. The band is excised and the peptide is isolated and prepared for analysis through the mass spectrometer by digestion with one or more known and previously characterized peptidase. As used herein, the term "known and previously characterized peptidase" intends a protein or peptide for which the fragments of a known peptidase digestion have been previously identified, characterized and cataloged.

[0116] For example, using well known procedures described for example in Shevchenko, A et al. (2000) Anal. Chem. 72:2132-2141, the sample or unknown peptide is mixed with matrix and dried on a sample plate. The sample is introduced into the high vacuum of the mass spectrometer. The sample spot is irradiated with laser, desorbing ions into the gas phase and starting the clock measuring the time of flight. Ions are accelerated by an electrical field to the same kinetic energy, and they drift (or fly) down a field free flight tube where they are separated into space. Ions strike the detector at different times depending on the mass to charge ratio of the ion. A data system controls all instrument parameters, acquires the signal versus time, and permits data processing. The spectrometer generates a profile of the sample which is then compared against previously characterized proteins and peptides. Peptide mass

spectrometry databases are available on the web, e.g., <http://ntwade/htmlucsf/msfit.htm>, or can be internally generated. Matches identify the targets recognized by antibodies shown to possess reactivity.

#### *Confirmation of Biological Activity*

[0117] Polyclonal or monoclonal antibodies and peptides containing the epitope of interest can be prepared and isolated using invention methods.

[0118] The functional activity or relevance of the isolated antigen or peptide can be confirmed using well known *in vitro* or *in vivo* methods. Therapeutic and diagnostic utility is confirmed by administration of the peptide or antigen to a subject in need of treatment. For example, a target sample/cell line (the gene expression profile of which is known) from a human subject is used to immunize mice to elicit a specific humoral immune response against a polypeptide antigen expressed by the target sample/cell. Means for producing a more robust humoral response in mammals are known in the art. For example, the mice selected to receive the immunization can be naturally T cell deficient or rendered T cell deficient by treatment with anti-CD8 antibody to suppress T cell response.

[0119] Methods for demonstrating that the humoral immune response elicited by the immunization also confers protective immunity are known in the art, for example, adoptive transfer of antibodies obtained from the immunized (protected) mice to a group of naïve mice. The naïve mice receiving these antibodies are then challenged with the target sample/cell line and/or other antigenically related cells and monitored for immune responses thereto. Monoclonal and polyclonal antibodies may be obtained from the immunized mice using standard techniques.

[0120] These antibodies (monoclonal or polyclonal) can also be assayed *in vitro* to determine their ability to inhibit proliferation of human tumor cells. The specificity of antibodies shown to inhibit human tumor cell proliferation *in vitro* can be assessed by Western blot analyses using cell lysates or membrane preparations of a panel of target sample/cell lines as described hereinabove.

*Polynucleotides Identified by the Invention*

[0121] The polynucleotides can be conjugated to a detectable marker, e.g., an enzymatic label or a radioisotope for detection of nucleic acid and/or expression of the gene in a cell. A wide variety of appropriate detectable markers are known in the art, including fluorescent, radioactive, enzymatic or other ligands, such as avidin/biotin, which are capable of giving a detectable signal. In preferred embodiments, one will likely desire to employ a fluorescent label or an enzyme tag, such as urease, alkaline phosphatase or peroxidase, instead of radioactive or other environmental undesirable reagents. In the case of enzyme tags, colorimetric indicator substrates are known which can be employed to provide a means visible to the human eye or spectrophotometrically, to identify specific hybridization with complementary nucleic acid-containing samples.

[0122] This invention further provides a method for detecting a single-stranded polynucleotide or its complement, by contacting target single-stranded polynucleotides with a labeled, single-stranded polynucleotide (a probe) under conditions permitting hybridization (preferably moderate or stringent hybridization conditions) of complementary single-stranded polynucleotides, or more preferably, under highly stringent hybridization conditions. Hybridized polynucleotide pairs are separated from un-hybridized, single-stranded polynucleotides. The hybridized polynucleotide pairs are detected using methods well known to those of skill in the art and set forth, for example, in Sambrook et al. (1989) supra.

[0123] The polynucleotides of this invention can be replicated using PCR. PCR technology is the subject matter of United States Patent Nos. 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065, and 4,683,202 and described in PCR: THE POLYMERASE CHAIN REACTION (Mullis et al. eds., Birkhauser Press, Boston (1994)) and references cited therein.

[0124] Alternatively, one of skill in the art can use the sequences provided herein and a commercial DNA synthesizer to replicate the DNA. Accordingly, this invention also provides a process for obtaining the polynucleotides of this invention by providing the linear sequence of the polynucleotide, appropriate primer molecules, chemicals such as enzymes and instructions for their replication and chemically replicating or linking the nucleotides in the proper orientation to obtain the polynucleotides. In a separate embodiment, these polynucleotides are further isolated.

Still further, one of skill in the art can insert the polynucleotide into a suitable replication vector and insert the vector into a suitable host cell (prokaryotic or eukaryotic) for replication and amplification. The DNA so amplified can be isolated from the cell by methods well known to those of skill in the art. A process for obtaining polynucleotides by this method is further provided herein as well as the polynucleotides so obtained.

[0125] RNA can be obtained by first inserting a DNA polynucleotide into a suitable host cell. The DNA can be inserted by any appropriate method, e.g., by the use of an appropriate gene delivery vehicle (e.g., liposome, plasmid or vector) or by electroporation. When the cell replicates and the DNA is transcribed into RNA; the RNA can then be isolated using methods well known to those of skill in the art, for example, as set forth in Sambrook et al. (1989) *supra*. For instance, mRNA can be isolated using various lytic enzymes or chemical solutions according to the procedures set forth in Sambrook et al. (1989) *supra* or extracted by nucleic-acid-binding resins following the accompanying instructions provided by manufactures.

[0126] It is known in the art that a "perfectly matched" probe is not needed for a specific hybridization. Minor changes in probe sequence achieved by substitution, deletion or insertion of a small number of bases do not affect the hybridization specificity. In general, as much as 20% base-pair mismatch (when optimally aligned) can be tolerated. Preferably, a probe useful for detecting the aforementioned mRNA is at least about 80% identical to the homologous region of comparable size. More preferably, the probe is 85% identical to the corresponding gene sequence after alignment of the homologous region; even more preferably, it exhibits 90% identity.

[0127] These probes can be used in radioassays (e.g. Southern and Northern blot analysis) to detect or monitor various cells or tissue containing these cells. The probes also can be attached to a solid support or an array such as a chip for use in high throughput screening assays for the detection of expression of the gene corresponding to one or more polynucleotide(s) of this invention.

[0128] The invention further provides the isolated polynucleotide operatively linked to a promoter of RNA transcription, as well as other regulatory sequences for replication and/or transient or stable expression of the DNA or RNA. As used herein,

the term "operatively linked" means positioned in such a manner that the promoter will direct transcription of RNA off the DNA molecule. Examples of such promoters are SP6, T4 and T7. In certain embodiments, cell-specific promoters are used for cell-specific expression of the inserted polynucleotide. Vectors which contain a promoter or a promoter/enhancer, with termination codons and selectable marker sequences, as well as a cloning site into which an inserted piece of DNA can be operatively linked to that promoter are well known in the art and commercially available. For general methodology and cloning strategies, see "Gene Expression Technology" (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) and references cited therein and "Vectors: Essential Data Series" (Gacesa and Ramji, eds., John Wiley & Sons, N.Y. (1994)), which contains maps, functional properties, commercial suppliers and a reference to GenEMBL accession numbers for various suitable vectors. Preferably, these vectors are capable of transcribing RNA *in vitro* or *in vivo*.

***Delivery Vehicles Comprising a Polynucleotide of the Invention***

[0129] The present invention also provides delivery vehicles suitable for delivery of a polynucleotide of the invention into cells (whether *in vivo*, *ex vivo*, or *in vitro*). A polynucleotide of the invention can be contained within a cloning or expression vector. These vectors (especially expression vectors) can in turn be manipulated to assume any of a number of forms that may, for example, facilitate delivery to and/or entry into a cell.

[0130] Expression vectors containing these nucleic acids are useful to obtain host vector systems to produce proteins and polypeptides. It is implied that these expression vectors must be replicable in the host organisms either as episomes or as an integral part of the chromosomal DNA. Suitable expression vectors include plasmids, viral vectors, including adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, cosmids, etc. Adenoviral vectors are particularly useful for introducing genes into tissues *in vivo* because of their high levels of expression and efficient transformation of cells both *in vitro* and *in vivo*. When a nucleic acid is inserted into a suitable host cell, e.g., a prokaryotic or a eukaryotic cell and the host cell replicates, the protein can be recombinantly produced. Suitable host cells will depend on the vector and can include mammalian cells, animal cells, human cells, simian cells,

insect cells, yeast cells, and bacterial cells constructed using well known methods. See Sambrook, et al. (1989) *supra*. In addition to the use of viral vector for insertion of exogenous nucleic acid into cells, the nucleic acid can be inserted into the host cell by methods well known in the art such as transformation for bacterial cells; transfection using calcium phosphate precipitation for mammalian cells; or DEAE-dextran; electroporation; or microinjection. See Sambrook et al. (1989) *supra* for this methodology. Thus, this invention also provides a host cell, e.g., a mammalian cell, an animal cell (rat or mouse), a human cell, or a prokaryotic cell such as a bacterial cell, containing a polynucleotide encoding a protein or polypeptide or antibody.

[0131] When the vectors are used for gene therapy *in vivo* or *ex vivo*, a pharmaceutically acceptable vector is preferred, such as a replication-incompetent retroviral or adenoviral vector. Pharmaceutically acceptable vectors containing the nucleic acids of this invention can be further modified for transient or stable expression of the inserted polynucleotide.

#### *Host Cells Comprising Polynucleotides of the Invention*

[0132] The present invention further provides host cells comprising polynucleotides of the invention. Host cells containing the polynucleotides of this invention are useful for the recombinant replication of the polynucleotides and for the recombinant production of peptides of the invention. Alternatively, host cells comprising a polynucleotide of the invention may be used to induce an immune response in a subject in the methods described herein.

[0133] Host cells which are suitable for recombinant replication of the polynucleotides of the invention, and for the recombinant production of peptides of the invention can be prokaryotic or eukaryotic. Host systems are known in the art and need not be described in detail herein. Prokaryotic hosts include bacterial cells, for example *E. coli*, *B. subtilis*, and mycobacteria. Among eukaryotic hosts are yeast, insect, avian, plant, *C. elegans* (or nematode) and mammalian cells. These cells are cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

[0134] When the host cells are antigen presenting cells, they can be used to expand a population of immune effector cells such as tumor infiltrating lymphocytes which in turn are useful in adoptive immunotherapies. Antigen presenting cells are described in more detail below.

*Host Cells Presenting Antigens of the Invention*

[0135] The invention further provides isolated host cells comprising antigens identified by the methods of this invention. In some embodiments, these host cells present two or more peptides of the invention on the surface of the cell in the context of an MHC molecule such that the peptide can be recognized by an immune effector cell. Isolated host cells which present the polypeptides of this invention in the context of MHC molecules are further useful to expand and isolate a population of educated, antigen-specific immune effector cells. The immune effector cells, *e.g.*, cytotoxic T lymphocytes, are produced by culturing naïve immune effector cells with antigen-presenting cells which present the polypeptides in the context of MHC molecules on the surface of the APCs. The population can be purified using methods known in the art, *e.g.*, FACS analysis or FICOLL™ gradient. The methods to generate and culture the immune effector cells as well as the populations produced thereby also are the inventor's contribution and invention. Pharmaceutical compositions comprising the cells and pharmaceutically acceptable carriers are useful in adoptive immunotherapy. Prior to administration *in vivo*, the immune effector cells are screened *in vitro* for their ability to target cells.

[0136] In some of these embodiments, isolated host cells are APCs. APCs include, but are not limited to, dendritic cells (DCs), monocytes/macrophages, B lymphocytes or other cell type(s) expressing the necessary MHC/co-stimulatory molecules.

[0137] In some embodiments, the immune effector cells and/or the APCs are genetically modified. Using standard gene transfer, genes coding for co-stimulatory molecules and/or stimulatory cytokines can be inserted prior to, concurrent to or subsequent to expansion of the immune effector cells.

[0138] APCs can be obtained from a variety of sources, including but not limited to, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), whole blood or fractions thereof

containing mixed populations, spleen cells, bone marrow cells, tumor infiltrating lymphocytes, cells obtained by leukapheresis, lymph nodes, e.g., lymph nodes draining from a tumor. Suitable donors include an immunized donor, a non-immunized (naïve) donor, treated or untreated donors. A "treated" donor is one that has been exposed to one or more biological modifiers. An "untreated" donor has not been exposed to one or more biological modifiers. APCs can also be treated *in vitro* with one or more biological modifiers.

[0139] The APCs are generally alive but can also be irradiated, mitomycin C treated, attenuated, or chemically fixed. Further, the APCs need not be whole cells. Instead, vesicle preparations of APCs can be used.

[0140] APCs can be genetically modified, i.e., transfected with a recombinant polynucleotide construct such that they express a polypeptide or an RNA molecule which they would not normally express or would normally express at lower levels. Examples of polynucleotides include, but are not limited to, those which encode an MHC molecule; a co-stimulatory molecule such as B7; and a peptide or polypeptide of the invention.

[0141] Cells which do not normally function *in vivo* in mammals as APCs can be modified in such a way that they function as APCs. A wide variety of cells can function as APCs when appropriately modified. Examples of such cells are insect cells, for example *Drosophila* or *Spodoptera*; and foster cells, such as the human cell line T2. For example, expression vectors which direct the synthesis of one or more antigen-presenting polypeptides, such as MHC molecules, optionally also accessory molecules such as B7, can be introduced into these cells to effect the expression on the surface of these cells antigen presentation molecules and, optionally, accessory molecules or functional portions thereof. Alternatively, antigen-presenting polypeptides and accessory molecules which can insert themselves into the cell membrane can be used. For example, glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-modified polypeptides can insert themselves into the membranes of cells. Hirose et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:582-614; and Huang et al. (1994) *Immunity* 1:607-613. Accessory molecules include, but are not limited to, co-stimulatory antibodies such as antibodies specific for CD28, CD80, or CD86; costimulatory molecules, including, but not limited to, B7.1 and B7.2; adhesion molecules such as ICAM-1 and LFA-3;

and survival molecules such as Fas ligand and CD70. See, for example, PCT Publication No. WO 97/46256.

[0142] Foster antigen presenting cells are particularly useful as APCs. Foster APCs are derived from the human cell line 174xCEM.T2, referred to as T2, which contains a mutation in its antigen processing pathway that restricts the association of endogenous peptides with cell surface MHC class I molecules. Zweerink et al. (1993) *J. Immunol.* 150:1763-1771. This is due to a large homozygous deletion in the MHC class II region encompassing the genes TAP1, TAP2, LMP1, and LMP2, which are required for antigen presentation to MHC class I-restricted CD8<sup>+</sup> CTLs. In effect, only "empty" MHC class I molecules are presented on the surface of these cells. Exogenous peptide added to the culture medium binds to these MHC molecules provided that the peptide contains the allele-specific binding motif. These T2 cells are referred to herein as "foster" APCs. They can be used in conjunction with this invention to present antigen(s).

[0143] Transduction of T2 cells with specific recombinant MHC alleles allows for redirection of the MHC restriction profile. Libraries tailored to the recombinant allele will be preferentially presented by them because the anchor residues will prevent efficient binding to the endogenous allele.

[0144] High level expression of MHC molecules makes the APC more visible to the CTLs. Expressing the MHC allele of interest in T2 cells using a powerful transcriptional promoter (e.g., the CMV promoter) results in a more reactive APC (most likely due to a higher concentration of reactive MHC-peptide complexes on the cell surface).

[0145] The following is a brief description of two fundamental approaches for the isolation of APC. These approaches involve (1) isolating bone marrow precursor cells (CD34<sup>+</sup>) from blood and stimulating them to differentiate into APC; or (2) collecting the precommitted APCs from peripheral blood. In the first approach, the patient must be treated with cytokines such as GM-CSF to boost the number of circulating CD34<sup>+</sup> stem cells in the peripheral blood.

[0146] The second approach for isolating APCs is to collect the relatively large numbers of precommitted APCs already circulating in the blood. Previous techniques

for isolating committed APCs from human peripheral blood have involved combinations of physical procedures such as metrizamide gradients and adherence/nonadherence steps (Freudenthal et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7698-7702); Percoll gradient separations (Mehta-Damani et al. (1994) J. Immunol. 153:996-1003); and fluorescence activated cell sorting techniques (Thomas et al. (1993) J. Immunol. 151:6840-52).

[0147] One technique for separating large numbers of cells from one another is known as countercurrent centrifugal elutriation (CCE). In this technique, cells are subject to simultaneous centrifugation and a washout stream of buffer which is constantly increasing in flow rate. The constantly increasing countercurrent flow of buffer leads to fractional cell separations that are largely based on cell size.

[0148] In one aspect of the invention, the APC are precommitted or mature dendritic cells which can be isolated from the white blood cell fraction of a mammal, such as a murine, simian or a human (See, e.g., WO 96/23060). The white blood cell fraction can be from the peripheral blood of the mammal. This method includes the following steps: (a) providing a white blood cell fraction obtained from a mammalian source by methods known in the art such as leukapheresis; (b) separating the white blood cell fraction of step (a) into four or more subfractions by countercurrent centrifugal elutriation, (c) stimulating conversion of monocytes in one or more fractions from step (b) to dendritic cells by contacting the cells with calcium ionophore, GM-CSF and IL-13 or GM-CSF and IL-4, (d) identifying the dendritic cell-enriched fraction from step (c), and (e) collecting the enriched fraction of step (d), preferably at about 4°C. One way to identify the dendritic cell-enriched fraction is by fluorescence-activated cell sorting. The white blood cell fraction can be treated with calcium ionophore in the presence of other cytokines, such as recombinant (rh) rhIL-12, rhGM-CSF, or rhIL-4. The cells of the white blood cell fraction can be washed in buffer and suspended in  $Ca^{++}/Mg^{++}$  free media prior to the separating step. The white blood cell fraction can be obtained by leukapheresis. The dendritic cells can be identified by the presence of at least one of the following markers: HLA-DR, HLA-DQ, or B7. 2, and the simultaneous absence of the following markers: CD3, CD14, CD16, 56, 57, and CD 19, 20. Monoclonal antibodies specific to these cell surface markers are commercially available.

[0149] More specifically, the method requires collecting an enriched collection of white cells and platelets from leukapheresis that is then further fractionated by countercurrent centrifugal elutriation (CCE). Abrahamson et al. (1991) J. Clin. Apheresis 6:48-53. Cell samples are placed in a special elutriation rotor. The rotor is then spun at a constant speed of, for example, 3000 rpm. Once the rotor has reached the desired speed, pressurized air is used to control the flow rate of cells. Cells in the elutriator are subjected to simultaneous centrifugation and a washout stream of buffer which is constantly increasing in flow rate. This results in fractional cell separations based largely but not exclusively on differences in cell size.

[0150] Quality control of APC and more specifically DC collection and confirmation of their successful activation in culture is dependent upon a simultaneous multi-color FACS analysis technique which monitors both monocytes and the dendritic cell subpopulation as well as possible contaminant T lymphocytes. It is based upon the fact that DCs do not express the following markers: CD3 (T cell); CD14 (monocyte); CD16, 56, 57 (NK/LAK cells); CD19, 20 (B cells). At the same time, DCs do express large quantities of HLA-DR, significant HLA-DQ and B7.2 (but little or no B7.1) at the time they are circulating in the blood (in addition they express Leu M7 and M9, myeloid markers which are also expressed by monocytes and neutrophils).

[0151] Once collected, the DC rich/monocyte APC fractions (usually 150 through 190) can be pooled and cryopreserved for future use, or immediately placed in short term culture.

[0152] Alternatively, others have reported that a method for upregulating (activating) dendritic cells and converting monocytes to an activated dendritic cell phenotype. This method involves the addition of calcium ionophore to the culture media convert monocytes into activated dendritic cells. Adding the calcium ionophore A23187, for example, at the beginning of a 24-48 hour culture period resulted in uniform activation and dendritic cell phenotypic conversion of the pooled "monocyte plus DC" fractions: characteristically, the activated population becomes uniformly CD14 (Leu M3) negative, and upregulates HLA-DR, HLA-DQ, ICAM-1, B7.1, and B7.2.

[0153] Specific combination(s) of cytokines have been used successfully to amplify (or partially substitute) for the activation/conversion achieved with calcium

ionophore: these cytokines include but are not limited to purified or recombinant human ("rh") rhGM-CSF, rhIL-2, and rhIL-4. Each cytokine when given alone is inadequate for optimal upregulation.

*Presentation Of Polypeptides By Antigen-Presenting Matrices*

[0154] For use in immunomodulatory methods and diagnostic methods of the invention, an antigen-presenting matrix presents convergent antigenic peptide ligands of the invention bound to an MHC molecule. Any known method can be used to achieve presentation by an antigen-presenting matrix. The following are non-limiting examples of methods that can be used.

[0155] Polypeptides can be delivered to antigen-presenting cells as polypeptide or peptide or in the form of cDNA encoding the protein/peptide.

[0156] Another method to deliver a synthetic antigenic peptide epitope of the invention to an APC is by pulsing. Pulsing can be accomplished *in vitro/ex vivo* by exposing APCs to the antigenic polypeptide(s) or peptide(s) of this invention. The polypeptide(s) or peptide(s) are added to APCs at a concentration of 1-10  $\mu$ m for approximately 3 hours. Pulsed APCs can subsequently be administered to the host via an intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery.

[0157] Polypeptides can also be delivered *in vivo*, for example, as part of a polypeptide or complexed with another macromolecule, with or without adjuvant via the intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery.

[0158] Various other techniques can be used, including the following. Paglia et al. (1996) J. Exp. Med. 183:317-322 has shown that APC incubated with whole protein *in vitro* are recognized by MHC class I-restricted CTLs, and that immunization of animals with these APCs led to the development of antigen-specific CTLs *in vivo*. In addition, several different techniques have been described which lead to the expression of antigen in the cytosol of APCs, such as DCs. These include (1) the introduction into the APCs of RNA isolated from tumor cells, (2) infection of APCs with recombinant vectors to induce endogenous expression of antigen, and (3)

introduction of tumor antigen into the DC cytosol using liposomes. (See Boczkowski et al. (1996) *J. Exp. Med.* 184:465-472; Rouse et al. (1994) *J. Virol.* 68:5685-5689; and Nair et al. (1992) *J. Exp. Med.* 175:609-612).

[0159] Another method which can be used is termed "painting." It has been demonstrated that glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-modified proteins possess the ability to reincorporate themselves back into cell membranes after purification. Hirose et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:582-614; Medof et al., (1984) *J. Exp. Med.* 160:1558-1578; Medof (1996) *FASEB J.* 10:574-586; and Huang et al. (1994) *Immunity* 1:607-613 have exploited this property in order to create APCs of specific composition for the presentation of antigen to CTLs. They devised expression vectors for  $\beta$ 2-microglobulin and the HLA-A2.1 allele. The proteins were expressed in Schneider S2 *Drosophila melanogaster* cells, known to support GPI-modification. After purification, the proteins could be incubated together with a purified antigenic peptides which resulted in a trimolecular complex capable of efficiently inserting itself into the membranes of autologous cells. In essence, these protein mixtures were used to "paint" the APC surface, conferring the ability to stimulate a CTL clone that was specific for the antigenic peptide. Cell coating was shown to occur rapidly and to be protein concentration dependent. This method of generating APCs bypasses the need for gene transfer into the APC and permits control of antigenic peptide densities at the cell surfaces.

#### *Immune Effector Cells*

[0160] The present invention makes use of the above-described compositions including APCs, to stimulate production of an enriched population of antigen-specific immune effector cells. Accordingly, the present invention provides a population of cells enriched in educated, antigen-specific immune effector cells, specific for an antigenic peptide of the invention. These cells can cross-react with (bind specifically to) antigenic determinants (epitopes) on natural (endogenous) antigens. In some embodiments, the natural antigen is on the surface of tumor cells and the educated, antigen-specific immune effector cells of the invention suppress growth of the tumor cells. When APCs are used, the antigen-specific immune effector cells are expanded at the expense of the APCs, which die in the culture. The process by which naive

immune effector cells become educated by other cells is described essentially in Coulie (1997) *Molec. Med. Today* 3:261-268.

[0161] The APCs prepared as described above are mixed with naïve immune effector cells. Preferably, the cells may be cultured in the presence of a cytokine, for example IL-2. Because dendritic cells secrete potent immunostimulatory cytokines, such as IL-12, it may not be necessary to add supplemental cytokines during the first and successive rounds of expansion. In any event, the culture conditions are such that the antigen-specific immune effector cells expand (i.e. proliferate) at a much higher rate than the APCs. Multiple infusions of APCs and optional cytokines can be performed to further expand the population of antigen-specific cells.

[0162] In one embodiment, the immune effector cells are T cells. In a separate embodiment, the immune effector cells can be genetically modified by transduction with a transgene coding for example, IL-2, IL-11 or IL-13. Methods for introducing transgenes *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* are well known in the art. See Sambrook, et al. (1989) *supra*.

[0163] An effector cell population suitable for use in the methods of the present invention can be autogeneic or allogeneic, preferably autogeneic. When effector cells are allogeneic, preferably the cells are depleted of alloreactive cells before use. This can be accomplished by any known means, including, for example, by mixing the allogeneic effector cells and a recipient cell population and incubating them for a suitable time, then depleting CD69<sup>+</sup> cells, or inactivating alloreactive cells, or inducing anergy in the alloreactive cell population.

[0164] Hybrid immune effector cells can also be used. Immune effector cell hybrids are known in the art and have been described in various publications. See, for example, International Patent Application Nos. WO 98/46785 and WO 95/16775.

[0165] The effector cell population can comprise unseparated cells, i.e., a mixed population, for example, a PBMC population, whole blood, and the like. The effector cell population can be manipulated by positive selection based on expression of cell surface markers, negative selection based on expression of cell surface markers, stimulation with one or more antigens *in vitro* or *in vivo*, treatment with one or more biological modifiers *in vitro* or *in vivo*, subtractive stimulation with one or more

antigens or biological modifiers, or a combination of any or all of these.

[0166] Effector cells can be obtained from a variety of sources, including but not limited to, PBMC, whole blood or fractions thereof containing mixed populations, spleen cells, bone marrow cells, tumor infiltrating lymphocytes, cells obtained by leukapheresis, biopsy tissue, lymph nodes, e.g., lymph nodes draining from a tumor. Suitable donors include an immunized donor, a non-immunized (naïve) donor, a treated or untreated donor. A "treated" donor is one that has been exposed to one or more biological modifiers. An "untreated" donor has not been exposed to one or more biological modifiers.

[0167] Methods of extracting and culturing effector cells are well known. For example, effector cells can be obtained by leukapheresis, mechanical apheresis using a continuous flow cell separator. For example, lymphocytes and monocytes can be isolated from the buffy coat by any known method, including, but not limited to, separation over Ficoll-Hypaque™ gradient, separation over a Percoll gradient, or elutriation. The concentration of Ficoll-Hypaque™ can be adjusted to obtain the desired population, for example, a population enriched in T cells. Other methods based on affinity are known and can be used. These include, for example, fluorescence-activated cell sorting (FACS), cell adhesion, magnetic bead separation, and the like. Affinity-based methods may utilize antibodies, or portions thereof, which are specific for cell-surface markers and which are available from a variety of commercial sources, including, the American Type Culture Collection (Manassas, MD). Affinity-based methods can alternatively utilize ligands or ligand analogs, of cell surface receptors.

[0168] The effector cell population can be subjected to one or more separation protocols based on the expression of cell surface markers. For example, the cells can be subjected to positive selection on the basis of expression of one or more cell surface polypeptides, including, but not limited to, "cluster of differentiation" cell surface markers such as CD2, CD3, CD4, CD8, TCR, CD45, CD45RO, CD45RA, CD11b, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD40L; other markers associated with lymphocyte activation, such as the lymphocyte activation gene 3 product (LAG3), signaling lymphocyte activation molecule (SLAM), T1/ST2; chemokine receptors such as CCR3, CCR4, CXCR3, CCR5; homing receptors such as CD62L,

CD44, CLA, CD146, a4b7, aEb7; activation markers such as CD25, CD69 and OX40; and lipoglycans presented by CD1. The effector cell population can be subjected to negative selection for depletion of non-T cells and/or particular T cell subsets. Negative selection can be performed on the basis of cell surface expression of a variety of molecules, including, but not limited to, B cell markers such as CD19, and CD20; monocyte marker CD14; the NK cell marker CD56.

[0169] An effector cell population can be manipulated by exposure, *in vivo* or *in vitro*, to one or more biological modifiers. Suitable biological modifiers include, but are not limited to, cytokines such as IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ ; non-specific modifiers such as phytohemagglutinin (PHA), phorbol esters such as phorbol myristate acetate (PMA), concanavalin-A, and ionomycin; antibodies specific for cell surface markers, such as anti-CD2, anti-CD3, anti-IL2 receptor, anti-CD28; chemokines, including, for example, lymphotactin. The biological modifiers can be native factors obtained from natural sources, factors produced by recombinant DNA technology, chemically synthesized polypeptides or other molecules, or any derivative having the functional activity of the native factor. If more than one biological modifier is used, the exposure can be simultaneous or sequential.

[0170] The present invention provides compositions comprising immune effector cells, which may be T cells, enriched in antigen-specific cells. By "enriched" is meant that a cell population is at least about 50-fold, more preferably at least about 500-fold, and even more preferably at least about 5000-fold or more enriched from an original naive cell population. The proportion of the enriched cell population which comprises antigen-specific cells can vary substantially, from less than 10% up to 100% antigen-specific cells. If the cell population comprises at least 50%, preferably at least 70%, more preferably at least 80%, and even more preferably at least 90%, antigen-specific immune effector cells, specific for a peptide of the invention, then the population is said to be "substantially pure." The percentage which are antigen-specific can readily be determined, for example, by a <sup>3</sup>H-thymidine uptake assay in which the effector cell population (for example, a T-cell population) is challenged by an antigen-presenting matrix presenting an antigenic peptide of the invention.

*Isolated Antibodies and Derivative Antibodies*

[0171] Serum antibodies, monoclonal antibodies and antibody derivatives are within the scope of this invention. The antibody compositions recognize the polypeptides identified by practicing the methods of the invention. Such antibodies include polyclonal and monoclonal antibodies. Laboratory methods for producing polyclonal antibodies and monoclonal antibodies, as well as deducing their corresponding nucleic acid sequences, are known in the art, see Harlow and Lane (1988) and (1999) *supra* and Sambrook, et al. (1989) *supra*. The monoclonal antibodies of this invention can be biologically produced by introducing protein or a fragment thereof into an animal, *e.g.*, a mouse or a rabbit. The antibody producing cells in the animal are isolated and fused with myeloma cells or heteromyeloma cells to produce hybrid cells or hybridomas. Accordingly, the hybridoma cells producing the monoclonal antibodies of this invention also are provided.

[0172] Thus, using the protein or fragment thereof, and well known methods, one of skill in the art can produce and screen the hybridoma cells and antibodies of this invention for antibodies having the ability to bind the proteins or polypeptides.

[0173] If a monoclonal antibody being tested binds with the protein or polypeptide, then the antibody being tested and the antibodies provided by the hybridomas of this invention are equivalent. It also is possible to determine, without undue experimentation, whether an antibody has the same specificity as the monoclonal antibody of this invention by determining whether the antibody being tested prevents a monoclonal antibody of this invention from binding the protein or polypeptide with which the monoclonal antibody is normally reactive. If the antibody being tested competes with the monoclonal antibody of the invention as shown by a decrease in binding by the monoclonal antibody of this invention, then it is likely that the two antibodies bind to the same or a closely related epitope. Alternatively, one can pre-incubate the monoclonal antibody of this invention with a protein with which it is normally reactive, and determine if the monoclonal antibody being tested is inhibited in its ability to bind the antigen. If the monoclonal antibody being tested is inhibited then, in all likelihood, it has the same, or a closely related, epitopic specificity as the monoclonal antibody of this invention.

[0174] The term "antibody" also is intended to include antibodies of all isotypes.

Particular isotypes of a monoclonal antibody can be prepared either directly by selecting from the initial fusion, or prepared secondarily, from a parental hybridoma secreting a monoclonal antibody of different isotype by using the sib selection technique to isolate class switch variants using the procedure described in Steplewski et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8653 or Spira et al. (1984) J. Immunol. Meth. 74:307.

[0175] This invention also provides biological active fragments of the polyclonal and monoclonal antibodies described above. These "antibody fragments" retain some ability to selectively bind with its antigen or immunogen. Such antibody fragments can include, but are not limited to: 1) Fab, 2) Fab', 3) F(ab')<sub>2</sub>, 4) Fv, and 5) single chain antibodies ("SCA").

[0176] A specific example of "a biologically active antibody fragment" is a complementarity determining region (CDR) of the antibody. Methods of making these fragments are known in the art, see for example, Harlow and Lane (1988) and (1999) *supra*.

[0177] The antibodies of this invention also can be modified to create chimeric and humanized antibodies (Oi et al. (1986) BioTechniques 4(3):214). Chimeric antibodies are those in which the various domains of the antibodies' heavy and light chains are coded for by DNA from more than one species.

[0178] The isolation of other hybridomas secreting monoclonal antibodies with the specificity of the monoclonal antibodies of the invention can also be accomplished by one of ordinary skill in the art by producing anti-idiotypic antibodies (Herlyn et al. (1986) Science 232:100). An anti-idiotypic antibody is an antibody which recognizes unique determinants present on the monoclonal antibody produced by the hybridoma of interest.

[0179] Idiotypic identity between monoclonal antibodies of two hybridomas demonstrates that the two monoclonal antibodies are the same with respect to their recognition of the same epitopic determinant. Thus, by using antibodies to the epitopic determinants on a monoclonal antibody it is possible to identify other hybridomas expressing monoclonal antibodies of the same epitopic specificity.

[0180] It is also possible to use the anti-idiotypic technology to produce monoclonal antibodies which mimic an epitope. For example, an anti-idiotypic monoclonal antibody made to a first monoclonal antibody will have a binding domain in the hypervariable region which is the mirror image of the epitope bound by the first monoclonal antibody. Thus, in this instance, the anti-idiotypic monoclonal antibody could be used for immunization for production of these antibodies.

[0181] As used in this invention, the term "epitope" is meant to include any determinant having specific affinity for the monoclonal antibodies of the invention. Epitopic determinants usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics.

[0182] The antibodies and/or antigens (polypeptides) of this invention can be linked to a detectable agent or label. There are many different labels and methods of labeling known to those of ordinary skill in the art.

[0183] The coupling of antibodies to low molecular weight haptens can increase the sensitivity of the assay. The haptens can then be specifically detected by means of a second reaction. For example, it is common to use haptens such as biotin, which reacts avidin, or dinitrophenol, pyridoxal, and fluorescein, which can react with specific anti-hapten antibodies. See Harlow and Lane (1988) and (1999) *supra*.

[0184] The antibodies of the invention also can be bound to many different carriers. Thus, this invention also provides compositions containing the antibodies and another substance, active or inert. Examples of well-known carriers include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble or insoluble for purposes of the invention. Those skilled in the art will know of other suitable carriers for binding antibodies, or will be able to ascertain such, using routine experimentation.

[0185] Compositions containing the antibodies, fragments thereof or cell lines which produce the antibodies, are encompassed by this invention. When these compositions are to be used pharmaceutically, they are combined with a pharmaceutically acceptable carrier.

[0186] Compositions containing antibodies or antigens of the invention are useful to detect and isolate specific antigenic polypeptides, antibody-reactive peptide epitopes and therapeutic antibody molecules. These compositions have a variety of uses for diagnosing and inhibiting pathological cells. For example, antigen-reactive antibodies can be generated by immunizing an animal with the antigenic polypeptide using methods well known in the art. It is also desirable to prepare a monoclonal antibody for administration to a subject. For use with human subjects, methods have now been established to produce "humanized antibodies" where species specific portions of the antibody molecule have been converted to sequences characteristic of human antibodies. Such molecules function more effectively when administered to a human subject.

[0187] Diagnostic antibodies are useful for detecting a pathological cell and a variety of alternative techniques for labeling and detecting these antibodies have been established. For example, the antibody can be conjugated to a radioactive isotope that can be localized in the subject following administration of the antibody. It is a specific purpose of the present invention to provide an improved means for obtaining novel antigenic peptides and antibodies that recognize these peptides for use as diagnostic agents.

[0188] Therapeutic antibodies can also be administered to a subject to inhibit the progression of disease. In a human subject it is desirable to administer a humanized monoclonal antibody for this purpose. The antibody can confer a passive immunity wherein it inhibits disease by binding to antigens in the target pathological tissue and inducing complement mediated cytotoxicity, antibody-directed cytotoxicity, or interference with receptor-ligand interactions. Alternatively, administration of an antibody to a subject can vaccinate against disease by inducing an anti-idiotypic immune response. For use in a human subject a monoclonal antibody such as a mouse monoclonal antibody is effective for this purpose.

[0189] The antigenic polypeptides identified by practicing the methods of the invention are also useful as therapeutic agents when administered to a subject or useful to educate naïve immune effector cells. Such polypeptides can be formulated with an adjuvant and administered as a vaccine to induce an immune response against the pathological target tissue. Such antigenic polypeptides can also be administered

*ex vivo*, for example to dendritic cells isolated from the subject. The antigen pulsed dendritic cells can then be expanded in culture and returned to the subject to perform adoptive immunotherapy.

[0190] Similar methods can be practiced using synthetic and natural peptides comprising the antigenic epitopes identified by the methods of the invention. Such peptides can be administered *in vivo* or *ex vivo*. They may also be delivered using a gene delivery vehicle that comprises a polynucleotide sequence encoding the appropriate amino acid sequence of the antigen and epitope. A variety of formats and formulations for vaccinating subjects with recombinant vaccines are well known to those skilled in the art.

#### ***Compositions of the Invention***

[0191] This invention also provides compositions containing any of the above-mentioned peptides, polypeptides, polynucleotides, antigen-presenting matrices, vectors, cells, antibodies and fragments thereof, and an acceptable solid or liquid carrier. When the compositions are used pharmaceutically, they are combined with a "pharmaceutically acceptable carrier" for diagnostic and therapeutic use. These compositions also can be used for the preparation of medicaments for the diagnostic and immunomodulatory methods of the invention.

#### ***Diagnostic Methods***

[0192] The present invention provides diagnostic methods using polypeptides and antibodies of the invention. The methods can be used to detect the presence of an antigen-specific CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cell which binds the polypeptide of the invention.

[0193] The diagnostic methods of the invention include: (1) assays to predict the efficacy of a polypeptide of the invention; (2) assays to determine the precursor frequency (i.e., the presence and number of) of immune effector cells specific for a polypeptide and/or its natural counterpart; and (3) assays to determine the efficacy of a polypeptide or antibody once in an immunomodulatory method of the invention. Antibodies also can be used to identify the cell surface ligand against which the antibody has been raised.

[0194] Diagnostic methods of the invention are generally carried out under suitable conditions and for a sufficient time to allow specific binding to occur between a polypeptide and an immune effector molecule, such as a TCR, on the surface of an immune effector cell, such as a CD4+ or CD8+ T cell or antibody. "Suitable conditions" and "sufficient time" are generally conditions and times suitable for specific binding. Suitable conditions occur between about 4°C and about 40°C, preferably between about 4°C and about 37°C, in a buffered solution, and within a pH range of between 5 and 9. A variety of buffered solutions are known in the art, can be used in the diagnostic methods of this invention, and include, but are not limited to, phosphate-buffered saline. Sufficient time for binding and response will generally be between about 1 second and about 24 hours after exposure of the sample to the convergent antigenic peptide ligand.

[0195] In some embodiments, the invention provides diagnostic assays to predict the efficacy of a polypeptide of the invention. In some of these embodiments, defined T cell epitopes are used to clinically characterize tumors and viral pathogens in order to determine in advance the predicted efficacy of an *in vivo* vaccine trial. This can be achieved by a simple proliferation assay of a patient's peripheral blood mononuclear cells using defined T cell epitopes as stimulators. Polypeptides that elicit a response are viable vaccine candidates for that patient.

[0196] In other embodiments, assays are provided to determine the precursor frequency (i.e., the presence and number of) of resting (naïve) immune effector cells specific for a polypeptide of this invention and which therefore have the potential to become activated. In these embodiments, an antigen-presenting cell bearing on its surface a polypeptide of the invention is used to detect the presence of immune effector cells in a biological sample. A functional assay is used to determine (and quantitate) the antigen-specific immune effector cells. As an illustrative example, PBMCs are isolated from a subject with a tumor. A sample of these PBMCs is cultured together for a suitable time with the target cells from the same subject. Functional assays include, but are not limited to, immune effector cell proliferation, cytokine production, specific lysis of an APC.

[0197] In other embodiments, the efficacy of an immunomodulatory method, including immunomodulatory methods of the invention, in modulating an immune

response to a polypeptide of the invention can be tested using diagnostic assays of the invention. These diagnostic assays are also useful to confirm biological activity of the polypeptide or monitor the efficacy of an immunotherapeutic agent. In some of these embodiments, the method allows detection of immune effector cells, which may be activated CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells, which have become activated or energized as a result of exposure to a polypeptide of the invention. A sample containing cells from a subject can be tested for the presence of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells which have become activated or energized as a result of binding to a given polypeptide of the invention.

#### *Immunomodulatory Methods*

[0198] The invention provides methods of modulating an immune response in an individual to a polypeptide of the invention. Immunomodulatory methods of the invention include methods that result in induction or increase, as well as methods that result in suppression or reduction, of an immune response in a subject, and comprise delivering to the subject an effective amount of a peptide (or any immunomodulatory agent) of the invention in formulations and/or under conditions that result in the desired effect on an immune response (or lack thereof) to the peptide. Immunomodulatory methods of the invention include vaccine methods, adoptive immunotherapy, and methods to induce T cell anergy.

[0199] An "immunomodulatory agent" for use in the methods of the invention is a molecule, a macromolecular complex, or a cell that modulates an immune response and encompasses: a polypeptide of the invention alone or in any of a variety of formulations described herein; a polypeptide comprising a polypeptide; a polynucleotide encoding a peptide or polypeptide of the invention; a polypeptide bound to MHC Class I which in turn is bound to an antigen-presenting matrix, including an APC (in the presence or absence of co-stimulatory molecule(s)); a polypeptide or antibody or a derivative thereof covalently or non-covalently complexed to another molecule(s) or macromolecular structure; and an educated, antigen-specific immune effector cell which is specific for a polypeptide of the invention.

[0200] Various methods are known to evaluate T cell activation. CTL activation can be detected by any known method, including but not limited to, tritiated thymidine

incorporation (indicative of DNA synthesis), and examination of the population for growth or proliferation, e.g., by identification of colonies. Alternatively, the tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethyl-thazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) may be added. Mossman (1983) *J. Immunol. Methods* 65:55-63; Niks and Otto (1990) *J. Immunol. Methods* 130:140-151. Succinate dehydrogenase, found in mitochondria of viable cells, converts the MTT to formazan blue. Thus, concentrated blue color would indicate metabolically active cells. In yet another embodiment, incorporation of radiolabel, e.g., tritiated thymidine, may be assayed to indicate proliferation of cells. Similarly, protein synthesis may be shown by incorporation of  $^{35}\text{S}$ -methionine. In still another embodiment, cytotoxicity and cell killing assays, such as the classical chromium release assay, may be employed to evaluate epitope-specific CTL activation. To detect activation of  $\text{CD4}^+$  T cells, any of a variety of methods can be used, including, but not limited to, measuring cytokine production; and proliferation, for example, by tritiated thymidine incorporation

[0201] Release of  $^{51}\text{Cr}$  from labeled target cells is a standard assay which can be used to assess the number of peptide-specific CTLs in a biological sample. Tumor cells, or APCs of the invention, are radiolabeled as targets with about 200  $\mu\text{Ci}$  of  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  for 60 minutes at  $37^\circ\text{C}$ , followed by washing. T cells and target cells ( $\sim 1 \times 10^4$ /well) are then combined at various effector-to-target ratios in 96-well, U-bottom plates. The plates are centrifuged at  $100 \times g$  for 5 minutes to initiate cell contact, and are incubated for 4-16 hours at  $37^\circ\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ . Release of  $^{51}\text{Cr}$  is determined in the supernatant, and compared with targets incubated in the absence of T cells (negative control) or with 0.1% TRITON<sup>TM</sup> X-100 (positive control). See, e.g., Mishell and Shiigi, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology* (1980) W.H. Freeman and Co.

[0202] The formulation of a polypeptide of the invention will vary, depending on the desired result. In general, peptides presented on an antigen-presenting matrix by a Class I MHC molecule, together with the appropriate co-stimulatory molecules, will result in induction of an immune response to the polypeptide. An anergic (or unresponsive) state may be induced in T lymphocytes by presentation of an antigen by an antigen-presenting matrix (which may be an APC) which contains appropriate MHC molecules on its surface, but which lacks the appropriate co-stimulatory molecules. Any of the various formulations described herein can be used.

[0203] Polynucleotides of the invention can be administered in a gene delivery vehicle or by inserting into a host cell which in turn recombinantly transcribes, translates and processes the encoded polypeptide. Isolated host cells containing a polynucleotide of the invention in a pharmaceutically acceptable carrier can be combined with appropriate and effective amount of an adjuvant, cytokine or co-stimulatory molecule for an effective vaccine regimen. In some embodiments, the host cell is an APC, such as a dendritic cell. The host cell can be further modified by inserting of a polynucleotide coding for an effective amount of either or both of a cytokine a co-stimulatory molecule.

[0204] The methods of this invention can be further modified by co-administering an effective amount of a cytokine or co-stimulatory molecule to the subject.

[0205] The agents provided herein as effective for their intended purpose can be administered to subjects having a disease to be treated with an immunomodulatory method of the invention or to individuals susceptible to or at risk of developing such a disease. When the agent is administered to a subject such as a mouse, a rat or a human patient, the agent can be added to a pharmaceutically acceptable carrier and systemically or topically administered to the subject. Therapeutic amounts can be empirically determined and will vary with the pathology or condition being treated, the subject being treated and the efficacy and toxicity of the therapy.

[0206] The amount of a polypeptide, antibody, antibody derivative, host cell or immune effector cell of the invention will vary depending, in part, on its intended effect, and is ultimately at the discretion of the medical or veterinary practitioner. The factors to be considered include the condition being treated, the route of administration, and nature of the formulation, the mammal's body weight, surface area, age, and general condition and the particular peptide to be administered. A suitable effective dose of an immune effector cell of the invention generally lies in the range of from about  $10^2$  to about  $10^9$  cells per administration. Cells can be administered once, followed by monitoring of the clinical response, such as diminution of disease symptoms or tumor mass. Administration may be repeated on a monthly basis, for example, or as appropriate. Those skilled in the art will appreciate that an appropriate administrative regimen would be at the discretion of the physician or veterinary practitioner.

[0207] Administration *in vivo* can be effected in one dose, continuously or intermittently throughout the course of treatment. Methods of determining the most effective means and dosage of administration are well known to those of skill in the art and will vary with the composition used for therapy, the purpose of the therapy, the target cell being treated, and the subject being treated. Single or multiple administrations can be carried out with the dose level and pattern being selected by the treating physician. Suitable dosage formulations and methods of administering the agents can be found below.

[0208] The agents and compositions of the present invention can be used in the manufacture of medicaments and for the treatment of humans and other animals by administration in accordance with conventional procedures, such as an active ingredient in pharmaceutical compositions.

[0209] More particularly, an agent of the present invention also referred to herein as the active ingredient, may be administered for therapy by any suitable route including nasal, topical (including transdermal, aerosol, buccal and sublingual), parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous and intradermal) and pulmonary. It will also be appreciated that the preferred route will vary with the condition and age of the recipient, and the disease or condition being treated.

#### ***Vaccines For Cancer Treatment And Prevention***

[0210] In one embodiment, immunomodulatory methods of the present invention comprise vaccines for cancer treatment. Cancer cells contain many new antigens potentially recognizable by the immune system. Given the speed with which epitopes can be identified, custom anticancer vaccines can be generated for affected individuals by isolating TILs from patients with solid tumors, determining their MHC restriction, and assaying these CTLs against the appropriate library for reactive epitopes. These vaccines will be both treatments for affected individuals as well as preventive therapy against recurrence (or establishment of the disease in patients which present with a familial genetic predisposition to it). Inoculation of individuals who have never had the cancer is expected to be quite successful as preventive therapy, even though a tumor antigen-specific CTL response has not yet been elicited, because in most cases high affinity peptides seem to be immunogenic suggesting that

holes in the functional T cell repertoire, if they exist, may be relatively rare. Sette et al. (1994) *J. Immunol.*, 153:5586-5592. In mice, vaccination with appropriate epitopes not only eliminates established tumors but also protects against tumor re-establishment after inoculation with otherwise lethal doses of tumor cells. Bystryk et al. (1993) *supra*.

[0211] Recent advances in vaccine adjuvants provide effective means of administering peptides so that they impact maximally on the immune system. Del-Giudice (1994) *Experientia* 50:1061-1066. These peptide vaccines will be of great value in treating metastatic tumors that are generally unresponsive to conventional therapies. Tumors arising from the homozygous deletion of recessive oncogenes are less susceptible to elimination by a humoral (antibody) response and would thus be treated more effectively by eliciting a cellular, CTL response.

*Vaccines for Diseases caused by Pathogenic Organisms*

[0212] The polypeptides of the present invention are also useful in methods to induce (or increase, or enhance) an immune response to a pathogenic organism. These include pathogenic viruses, bacteria, and protozoans.

[0213] Viral infections are ideal candidates for immunotherapy. Immunological responses to viral pathogens are sometimes ineffective as in the case of the lentiviruses such as HIV which causes AIDS. The high rates of spontaneous mutation make these viruses elusive to the immune system. However, a saturating profile of CTL epitopes presented on infected cells will identify shared antigens among different serotypes in essential genes that are largely intolerant to mutation which would allow the design of more effective vaccines.

*Adoptive Immunotherapy Methods*

[0214] The expanded populations of antigen-specific immune effector cells and APCs of the present invention find use in adoptive immunotherapy regimes and as vaccines. These compositions are useful to confirm therapeutic and diagnostic efficacy.

[0215] Adoptive immunotherapy methods involve, in one aspect, administering to a subject a substantially pure population of educated, antigen-specific immune effector

cells made by culturing naïve immune effector cells with APCs as described above. In some embodiments, the APCs are dendritic cells.

[0216] In one embodiment, the adoptive immunotherapy methods described herein are autologous. In this case, the APCs are made using parental cells isolated from a single subject. The expanded population also employs T cells isolated from that subject. Finally, the expanded population of antigen-specific cells is administered to the same patient.

[0217] In a further embodiment, APCs or immune effector cells are administered with an effective amount of a stimulatory cytokine, such as IL-2 or a co-stimulatory molecule.

#### *Methods of Inducing T Cell Anergy*

[0218] Antigenic polypeptides isolated by the methods of the present invention are useful in methods to induce T cell anergy. Disorders which can be treated using these methods include autoimmune disorders, allergies, and allograft rejection.

[0219] Autoimmune disorders are diseases in which the body's immune system responds against self tissues. They include most forms of arthritis, ulcerative colitis, and multiple sclerosis. Convergent antigenic peptide ligands corresponding to endogenous elements that are recognized as foreign can be used in the development of treatments using gene therapy or other approaches. For example, synthetic CTL epitopes, which can act as "suicide substrates" for CTLs that mediate autoimmunity, can be designed as described above. That is to say, peptides which have a high affinity for the MHC allele but fail to activate the TCR could effectively mask the cellular immune response against cells presenting the antigen in question. In support of this approach, it is believed that the long latency period of the HIV virus is due to an antiviral immune response and a mechanism by which the virus finally evades the immune system is by generating epitopes that occupy the MHC molecules but do not stimulate a TCR lytic response, inducing specific T cell anergy. Klenerman et al. (1995) Eur. J. Immunol. 25:1927-1931.

[0220] *In vitro* stimulation of T cells through the complex of T cell-antigen receptor and CD3 alone in the absence of other signals, induces T cell anergy or paralysis.

T cell activation as measured by interleukin-2 production and proliferation *in vitro* requires both antigenic and co-stimulatory signals engendered by cell to cell interactions among antigen-specific T cells and antigen presenting cells. Various interactions of these CD2 proteins on the T-cell surface with CD58 (LFA-3) proteins and antigen-presenting cells, those of CD11a/CD18 (LFA-1) proteins with CD54 (ICAM-1) proteins and those of CD5 proteins with CD72 proteins can impart such a co-stimulatory signal *in vitro*. Cytokines derived from antigen-presenting cells (e.g., interleukin-1 and interleukin-6) can also provide co-stimulatory signals that result in T-cell activation *in vitro*. The delivery of both antigenic and co-stimulatory signals leads to stable transcription of the interleukin-2 gene and other pivotal T cell-activation genes. The foregoing co-stimulatory signals depend on protein kinase C and calcium. Potent antigen presenting cells express CD80 (B7 and BB1) and other related surface proteins and many T cells express B7 binding proteins, namely CD28 and CTLA-4 proteins. Binding of CD80 by CD28 and CDLA-4 stimulates a T cell co-stimulatory pathway that is independent of protein kinase C and calcium leading to vigorous T cell proliferation. The stimulation of B cells also depends on the interaction between the specific antigen and the cell-surface immunoglobulin. T cell derived cytokines (e.g., interleukins 1 and 4), physical contact between T cells and B cells through specific pairs of receptors and co-receptors, or both, provide the signal or signals essential for B cell stimulation.

[0221] Conventional routes of administration are used. A T-cell stimulating or anergy producing amount (or therapeutically effective amount as described above) of an immunotherapeutic antigen-superantigen polymer according to the invention is contacted with the target cells. By "T-cell anergy effective amount" is intended an amount which is effective in producing a statistically significant inhibition of a cellular activity mediated by a TCR. This may be assessed *in vitro* using T-cell activation tests. Typically, T-cell anergy or activation is assayed by tritiated thymidine incorporation in response to specific antigen.

[0222] One way in which T cell anergy can be induced is to present to a T cell an antigen-presenting matrix which presents a polypeptide of the invention in an MHC Class I molecule, but which lack co-stimulatory molecules necessary to activate the T cell. For example, a cell other than a normal antigen presenting cell (APC), which has

been transfected with MHC antigen to which a selected T cell clone is restricted, can be used. Resting T cells are provided with an appropriate peptide recognized by the resting T cells in the context of the MHC transfected into a cellular host other than an APC. The MHC is expressed as a result of introduction into a mammalian cell other than an antigen presenting cell of genes constitutively expressing an MHC Class I molecule together with invariant chain. Importantly, these cells do not provide other proteins, either cell surface proteins or secreted proteins, associated with antigen presenting cells, which together with the MHC and peptide result in co-stimulatory signals.

[0223] To determine whether anergy has been induced, the T cells to be tested can be cultured together with an which presents the antigens of the invention in an MHC Class I molecule together with co-stimulatory molecules necessary to activate the T cell. The cultures are incubated for about 48 hours, then pulsed with tritiated thymidine and incorporation measured about 18 hours later. The absence of incorporation above control levels, where the T-cells are presented with antigen presenting cells which do not stimulate the T cells, either due to using an MHC to which the T cells are not restricted or using a peptide to which the T cells are not sensitive, is indicative of an absence of activation. One may use other conventional assays to determine the extent of activation, such as assaying for IL-2, -3, or -4, cell surface proteins associated with activation, e.g. CD71 or other convenient techniques. Another method is to determine the expression of a protein which is expressed on quiescent T cells, but not on anergic T cells. U.S. Patent No. 5,747,299.

[0224] The following examples are intended to illustrate but not limit the invention.

#### **Experimental Methods**

##### ***Method for Isolating Apical and Basolateral Cell Membrane Proteins***

[0225] Figure 4 shows a schematic for isolation of apical and basolateral cell membranes. This modification of the method disclosed in Chaney and Jacobsen (1983) J. Biol. Chem. 258:10062-10072, enriches for apical and basolateral membrane proteins as compared to the yields of a whole cell lysate preparation. First, a monolayer of target cells are coated with an "activated" cationic colloidal silica

particle slurry that binds to the plasma membrane. By "activated" it is intended that the slurry acquire a positive charge (i.e., become cationic) through coating the silica particles with aluminum chlorohydroxide. Next, an anionic polymer, such as sodium polyacrylate, is added to crosslink the cationic silica particles, generating a structurally stable pellicle on the outside of the plasma membranes. The cells are then contacted with a hypotonic imidazole-based buffer to gently swell and rupture the cells. The resulting lysate contains nuclei, internal and silica coated apical membranes; while the basolateral membrane remains attached to the cell culture plate. The aqueous lysate is sedimented at 900g for 10 min to pellet the coated membranes and nuclei. The resulting supernatant containing internal membranes is discarded. The pelleted nuclei and membrane are resuspended and further sedimented at 28,000g for 30 min. through 70% Nycodenz (Sigma, St. Louis, MO) and the resulting supernatant containing nuclei is discarded. The remaining pellet contains silica coated apical membranes. The isolated apical membrane preparation may be used alone or in combination with the basolateral membrane preparation (which can be readily removed from the culture plate using standard cell culture techniques).

*Antibody Elution from an Immunoblot*

[0226] In order to conduct further analyses with a serum antibody that is bound to an antigen of interest on a solid support, the antibody must be removed in a manner so as to retain its functionality. In order to isolate the functional antibody, the portion of the solid support (e.g. nitrocellulose) to which the antibody is bound is excised and the antibody is eluted off of the solid support using a method adapted from Maa, J.S., Rodriguez, et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:1569-1577.

[0227] After a band of interest is identified by the described Western blotting technique, a prep-scale gel containing as much of the target antigen as possible is prepared and transferred to nitrocellulose. The blot is incubated with the appropriate serum or antibody and washed according to the standard Western blotting protocol. Antibody reactivities (i.e., bands) present on the blot are visualized on film by standard techniques (i.e., radioactive labeling, ECL, etc.)

[0228] After aligning the film with the nitrocellulose membrane, the fragment of nitrocellulose containing the band of interest is excised with a scalpel, placed into a

tube containing 100 mM glycine pH 2.5 buffer and incubated at room temperature for 5 min. The fragment of nitrocellulose is then removed from the tube and the buffer (containing the eluted antibody) is neutralized with 1/10 volume of 1M Tris pH 8.0. After neutralization, BSA is added to the buffer (eluate) to a final concentration of 1%.

[0229] Figure 1 shows that antibody eluted by the above protocol retains its specific antigen binding property. The blot on the right was generated with anti-Her2 antibody (Neomarkers, cat#: MS-327-P: clone L87 and e2-4001 (Ab-10)), (LabVision Corp., Fremont, CA) eluted from the blot on the left.

[0230] The isolated functional antibody can then be used to screen a library of peptides to identify candidate antibody epitopes.

[0231] The isolated antibody is contacted with the library and positive beads are sequenced to identify the epitope. Positive beads can be visualized by using standard labeling techniques i.e., biotin, enzymes, fluorochromes, and similar reagents. Once the epitope sequence is determined, the sequence of this peptide can be compared to the specific list of candidate genes having the appropriate sized expression product to identify the gene expression product sequence that contains the epitope sequence identified in the peptide library screen.

#### *Methods for Immunoprecipitating Polypeptide Antigens*

##### *Direct Method*

[0232] Standard immunoprecipitation techniques can be used when antibody of interest is abundant. For example, using the antibody of interest in well known Western blotting techniques as described hereinabove, a target sample/cell line that exhibits high level expression of the polypeptide antigen is initially identified. The target sample/cell line is then metabolically labeled with, for example <sup>35</sup>S-Methionine, and using standard techniques or the methods described herein. Target cells are gently broken open in solution. Serum antibody is then added to and incubated with the radioactive cell lysate (typically 1-2 hours at 4°C with rotation) and collected on, for example, Protein A Sepharose beads. The antibody and antigen is bound to the solid support allowing washing and concentration of the sample. After removing the

washing buffer (e.g., PBS/Tween-20), the beads are incubated with SDS-PAGE sample buffer, heated to 95°C for 3 minutes and loaded onto a standard protein gel. When the gel is finished running, one of the glass plates is separated to expose the gel (still attached to one of the plates). A sheet of plastic wrap may be placed over the gel to prevent the gel from drying out. The gel is then placed on X-ray film for an appropriate period of time in order to detect the position of the labeled antigen. Upon detection of the position of the antigen, the plastic wrap is removed from the gel, and the gel is aligned precisely with the exposed X-ray film, and the portion of the gel corresponding to the position of the labeled antigen is excised using a scalpel and recovered from the gel. The recovered antigen is analyzed by standard methods, for example MALDI-TOF MS.

***Tracer or Indirect Method.***

[0233] This method can be utilized when there is limiting amounts of antibody available. This method is similar to the Direct method except that the antibody of interest is eluted from the immunoblot and then used to immunoprecipitate its corresponding antigen from an <sup>35</sup>S-Methionine-labeled cell lysate. In the event that the amount of immunoprecipitated antigen recovered is insufficient to allow for sequencing, the labeled immunoprecipitated antigen will serve as a 'tracer' to identify and recover additional amounts of antigen. Accordingly, the labeled 'tracer' antigen is mixed in with a larger amount of cold (unlabeled) cell lysate of the same target sample/cell line used for the previous immunoprecipitation and the proteins are separated on a gel as described hereinabove. Detection of the labeled 'tracer' antigen not only identifies its own position on the gel, it additionally identifies the position of a much greater amount of corresponding unlabeled protein antigen that has co-migrated along with it on the gel. As described hereinabove, the gel is then exposed to film for an appropriate period of time in order to detect the position of the labeled 'tracer' antigen and corresponding co-migratory unlabeled protein antigen. Once excised from the gel using the method described herein. The antigen can be sequenced by standard methods or used to further isolate antigen or antibody.

*Peptide Library Screening.*

[0234] A combinatorial library comprised of random peptides is prepared with the 19 common amino acids (excluding cysteine) each having a fixed amino acid position at its carboxy-terminus which is bound to the solid phase support via a linker. The fixation of the carboxy-terminal position of the peptides provides for equal release of the peptides from the solid support. The library has a complexity of  $19^6$  or approximately 47 million peptide species. In one embodiment, the library is comprised of random 6-mers. In alternative embodiments, the library may be comprised of partially degenerative peptides having one or more fixed or invariant positions, i.e., 7- to 10-mers.

[0235] In a typical antibody capture assay, the unlabeled antigen/epitope is immobilized on a solid support and the antibody is allowed to bind to the immobilized antigen/epitope, the antibody can be labeled directly or can be detected by using a labeled secondary reagent that will specifically recognize the antibody.

[0236] Since most immunochemical techniques have a certain background, and as the abundance of a particular antigen decreases relative to the other proteins, the ability of an antibody to distinguish the correct antigen from the background can be reduced. This is particularly true for polyclonal antibodies. Any technique that allows the antigen to be identified specifically among the background noise can be used as a secondary technique.

[0237] When utilizing an "off-bead" screening technology, enrichment of the antibody by the use of blocking antibodies is preferred. In one embodiment of the invention method (see Figure 2) the antibodies utilized were designated as follows: (a) the 1° antibody is the antibody eluted off of the Western blot; (b) the "first" 2° antibody, specific for human IgG constant region, is the "blocking antibody" and is also enzyme labeled for use in an indirect detection assay; (c) the "second" 2° antibody is the "real or actual 2° antibody" and is identical to the "first" 2° or blocking antibody in every aspect, with the exception of its label. For example, a single animal was immunized with a single immunogen (i.e., human IgG CR), its sera collected and divided into two aliquots, one aliquot was derivatized into the "first" 2° (blocking) antibody having horseradish peroxidase (HRP) label, and the second aliquot was

derivatized into the "second" 2° (real or actual) antibody having alkaline phosphatase (AP) label.

[0238] In one embodiment of the invention, the peptide library is screened as follows. The library is first saturated with the "first" 2° (blocking) antibody. After several washes to remove the blocking antibody, the 1° antibody is then contacted with the peptide library. The 1° antibody is removed from the library after several washing steps. Next, the "second" 2° (real or actual) antibody is contacted with the bead library. After washing the "second" 2° (real or actual) antibody off, 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), the substrate for the AP-labeled "second" 2° (real or actual) antibody is added to the library - staining beads with peptides specifically bound a purplish hue (shown as black in Figure 2). After several washes to remove the DAB, the library was contacted with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/4-nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT), the substrate for the HRP-labeled "first" 2° (blocking) antibody - staining beads with peptides specifically bound a brownish hue (shown as gray in Figure 2). Since the "second" 2° antibody should only bind to the human constant region on the 1° antibody, any bead having a peptide to which the 1° antibody bound will stain purple. The "purple" bead(s) is/are readily detectable and distinguished from the remainder of the library beads which are a mixture of brown and clear beads. The positive bead(s) is/are then isolated and the peptide(s) is/are sequenced.

[0239] In another embodiment of the invention, library screening is accomplished "off bead" by arraying the beads containing the peptides in 96-well teflon filter bottom plates at, for example, 10,000 beads/well. A portion of peptide from every bead in each well is chemically released (as a peptide pool) and collected in a replica plate (standard 96-well plate). An aliquot of released peptide pool is then spotted onto, or alternatively a 96-well vacuum manifold can be used to deposit a fixed amount of released peptide onto, a membrane such as nitrocellulose. The eluted antibody of interest can then be used to perform a Western blot on the membrane containing the released peptides. Upon identification of a positive antibody:peptide complex on the Western blot, the beads contained in the well from which the 'positive' peptide pool was released can be re-arrayed into a new 96-well filter plate (at approximately 100 beads/well). As before, a portion of peptide from every bead in

each well is released as a peptide pool, the pool then transferred to a solid membrane support and tested for reactivity with the antibody. At this point there should be a single positive well corresponding to the peptides released from the ~100 bead pool. These ~100 beads are re-arrayed into a new 96-well plate (now ~1 bead/well), a portion of the solid-phase peptide released, and transferred to a membrane support. Probing the membrane once more with the antibody of interest will identify the well containing the single bead that contains the reactive peptide. Residual peptide on the positive bead can be directly sequenced by Edman degradation or other suitable methods known in the art.

*Preparation of Gene Expression Database Using SAGE*

[0240] SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) is described in U.S. Patent No. 5,695,937. SAGE is a technique for rapidly identifying and analyzing thousands of gene transcripts. Using SAGE, sequence tags corresponding to expressed genes can be identified and analyzed. A "tag" or "SAGE tag" is a short polynucleotide sequence, generally under or about 20 nucleotides that occur in a certain position in messenger RNA. The tag can be used to identify the corresponding transcript and gene from which it was transcribed. Application of a SAGE database is employed to identify the polypeptide of interest. First, the expression data for the target sample/cell line expressing the protein to which the antibody bound (*i.e.*, the 'positive' target sample/cell) is examined to identify all genes over-expressed in said target sample/cell line. Genes so identified comprise a "preliminary list of candidate genes" (*i.e.*, over-expressed in the positive target sample/cell). Second, the expression data for each gene in the "preliminary list" is examined in the target sample/cell lines that did not contain a protein (antigen) uniquely bound by an antibody present in the serum of a subject (*i.e.*, the 'negative' target sample/cells). After determining the gene expression levels in the negative target samples/cells, genes not meeting the sorting criteria (described above) are eliminated and a refined "subset of candidate genes" is defined, *e.g.*, genes that are over-expressed in the 'positive' target sample/cells and that are under-expressed in the 'negative' target sample/cells. Third, the candidate genes in the refined "subset" are further sorted to identify and select a gene that expresses a protein having a molecular weight approximately equal to the molecular weight observed of the antibody-bound protein (antigen) in the Western blot analysis

of the subject's serum. Those of skill in the art appreciate that oftentimes the apparent molecular weight of a protein as determined from, for example, Western blot analyses, may present slightly larger than its actual molecular weight. Therefore, any gene in the refined "subset" that does not express a protein having the pre-selected molecular weight is eliminated, further narrowing the number of genes that meet the criteria for the "short list", *e.g.* over-expressed in positive target sample/cells, under-expressed in negative target sample/cells, having a protein product of a specific pre-selected molecular weight.

[0241] SAGE can identify the antigen-encoding gene from the expression data and protein size analysis described above, *e.g.*, where only a single candidate gene meets all criteria for the "short list". However, there may also be instances where the "short list" consists of multiple candidate genes that meet the criteria. In such instances the invention further provides methods for identifying the target protein precisely. In order to perform such additional analyses, the antibody (that complexed with the polypeptide-antigen in the Western analysis) is further employed. In circumstances where the amount of available antibody is limited, for example, as may be the case when the antibody is from the serum sample of a human patient, in the methods of the present invention, the serum antibody is removed from the solid support in a manner such that the antibody's functional activity is retained. In one embodiment of the invention, the isolated antibody is used to immunoprecipitate the polypeptide antigen. In another embodiment, the isolated antibody is used to screen a library of peptides to identify candidate antibody epitopes. Positive candidate epitopes can be visualized by using standard labeling techniques (*i.e.*, radioisotopes, enzymes, biotin, fluorochromes, and the like). The amino acid sequence of the candidate epitope (peptide) is then determined and compared with the amino acid sequences of the gene expression products encoded by genes in the pre-selected "short list". Polypeptide sequences encoded by genes in the pre-selected "short list" that contain the amino acid sequence of the candidate epitope (peptide) will define the natural epitope recognized and bound by the antibody.

[0242] SAGE data can be sorted to identify differentially expressed genes that encode the cell surface targets recognized by antibodies shown to possess anti-tumor reactivity. Once the antigen is identified, the target protein antigen can be further

assayed against serum samples obtained from human cancer subjects in order to determine whether the target protein antigen is naturally immunogenic.

*Antigen Identification with MALDI-TOF*

[0243] With knowledge of a nucleotide or gene candidate list and the apparent molecular weight of the antigen of interest, it may still not be possible to identify the legitimate antigen definitively. In cases where the solid-phase library screening does not yield useful information, a second technique, MALDI-TOF (shown in Figure 5) may be coupled to the nucleotide sequence homology analysis in place of the library screen. This method allows generation of a list of candidate antigens by a method independent of genetic analysis.

[0244] Since there can be only one 'correct' antigen on any list of nucleotide sequences or databases and the same antigen must be present on the MALDI-TOF list, a comparison of the two can rapidly identify the antigen of interest. Furthermore, successful analysis can be obtained using antigen obtained from a standard 1-dimensional protein gel. The reason that there is little or no overlap between the 'false positives' on either list is due to the very different criteria that led to each set of false positives being present. That is, there appears to be no consistent causal relationship between a false positive that has a similar expression pattern to the correct antigen (SAGE) and a false positive that happens to co-migrate with the correct antigen or is erroneously identified by database searching (MALDI-TOF).

*Epitope Mapping with MALDI-TOF*

[0245] A purified or semi-purified antigen preparation and the antibody of interest are required reagents. First, the intact antigen is digested with an enzyme (e.g., trypsin, chymotrypsin) or chemical (e.g., CNBr) method in order to produce peptides of predictable molecular weights. Next, the antibody is added to the peptide mixture and allowed to "capture" the peptide that contains its linear recognition sequence. The antibody-peptide complexes can be collected on, for example, protein A-coated magnetic beads to allow for easy washing away of non-bound peptides. After washing, the antibody complexes can be denatured by adjusting the pH of the solution, releasing the bound peptides that contain the epitope of interest. By

performing MALDI-TOF mass spectrometry on the eluted peptides, the molecular weight of the peptide fragment can be determined. This "actual" molecular weight can be compared to a list of theoretical "calculated" molecular weights to identify the sequence of the peptide fragment that contains the epitope.

[0246] Ambiguous results (using the above method) can occur in the following situations: (1) where 'contaminating' peptides co-purify with the legitimate epitope-containing peptide, in such case more than one molecular mass will be detected in the MS analysis; and (2) where the minimal essential epitope could be disrupted during the digestion of the antigen (i.e., if it harbors a cleavage consensus sequence), in which case either no masses or only contaminating masses will be identified by MS analysis.

[0247] In either situation (described above), the ambiguity can often be resolved as follows. Identical samples can be processed using different antigen digestion methods (preferably methods with mutually exclusive consensus sequences). This greatly enhances the chances of not destroying the minimal epitope in both digests. The masses retrieved from both digests are compared to identify the correct epitope-containing peptide. Comparison of the digest results may show that the epitope resides in an overlap region between peptides identified from each digest, further refining the position of the minimal essential epitope. In the event that one of the digestion methods did destroy the epitope, one could then deduce that the correct epitope-containing peptide in the other digest must contain a cleavage consensus sequence specific to the first digest.

*Example No. 1: Screening a Combinatorial Peptide Library for  $\alpha$ Her-2 Antibody-Reactive Peptides*

[0248] Two novel epitopes (EYLGLDYQI; SEQ ID NO:1) and (EYLGLEMDV, SEQ ID NO: 2) that correlate with the HER-2 antigen (EYLGLDVPV, SEQ ID NO: 3), and the polynucleotides encoding them, were identified using the methods shown in Figures 2 and 3. Because the peptide library screen was performed "off-bead" it was necessary to obtain an enriched sample of antigen or polypeptide using the Indirect or Tracer Method described *supra*.

[0249] The antibodies used were, Anti-Her2/neu: Neomarkers cat# MS-599-P1: clone 3B5 (Ab-15) (LabVision Corp., Fremont, CA), goat anti-mouse IgG + HRP : Sigma cat# A9917 (pooled polyclonal serum from 2 goats), and goat anti-mouse IgG + AP : Sigma cat# A1293 (polyclonal serum from 1 goat : the serum from this particular goat is also part of the pooled polyclonal serum described immediately hereinabove).

[0250]  $10^7$  beads (dry weight in an orange top 50ml tube = 20.43g {beads = 7.2g}) were blocked in 5% BLOTTO for >30min. The beads were incubated with the goat anti-mouse IgG + HRP (1:2500) for 1.5 hrs while rotating at room temperature ("RT"). The beads were washed several times with PBS + 0.1% Tween20 and incubated with the anti-Her2/neu antibody Ab-15 (previously eluted from an immunoblot) in 20ml for 2 hrs at RT. The beads were washed several times with PBS + 0.1% Tween20. The beads were incubated with the goat anti-mouse IgG + AP (1:2500) for 1.5 hrs while rotating at RT.

[0251] The beads were washed O/N @ 4°C while rotating. The substrate for AP (alkaline phosphatase) was added, BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/4-nitro blue tetrazolium chloride), (Zymed cat# 00-2210; So. San Francisco, CA) and incubated with the beads for 30min at RT. The beads were washed several times with PBS. The substrate for HRP (horseradish peroxidase) was added, DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), (Vector labs cat# SK-4100; Burlingame, CA) and incubated for 10 min. The beads were washed several times with PBS. The beads were viewed under a dissecting microscope. The violet-stained beads were selected and arrayed in a filter bottom 96-well microtiter plate. Peptide was released from 2 of the arrayed beads by chemical cleavage with trifluoroacetic acid (TFA) and then subsequently sequenced.

[0252] Figure 3 shows the Western blot from which the Her-2 antibody was eluted (top left) and one of the "positive" beads that was sequenced (bottom left). The figure on the bottom right shows an alignment of the two library sequences with a region of the Her-2 protein. These sequences are compared to the candidate gene database list. This region lies within the 15 amino acid peptide that was originally used to generate the  $\alpha$ Her2 antibody.

**Example No. 2: Antigen Identification Using MALDI-TOF**

[0253] In this example, unfractionated longitudinal serum samples from a melanoma patient treated with a MART-1 vaccine delivered in an adenoviral vector and that had a complete clinical response were analyzed.

[0254] An IgM antibody activity that correlated with multisite regression of metastases was identified. The cell lines used to prepare the lysates that the serum was blotted against were all tumor cell lines for which SAGE data was available. See Figure 6.

[0255] Having identified a band of interest, an identical protein gel used for the analysis shown above was prepared using the third longitudinal serum sample. This band was cut out of the gel and digested with trypsin. MALDI-TOF MS was performed on the tryptic peptides and 99 molecular masses were elucidated. These masses were analyzed for matches with calculated tryptic digests of all proteins in the SwissProt database using the program MS-FIT developed by Peter Baker and Karl Clauser at UCSF (see <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>).

[0256] The search parameters are summarized below:

Database Statistics	{ Database: SwissProt.111000 Mol. Wt. Range: 1,000-50,000 Da (selects 66,218 entries) PI Range: Full (90,195 entries) Species search: Human (6,187 entries) [Combined MW, PI, Species selects 3,801 entries]
Sample Statistics	{ Min # peptides to match: 4 Digest: Trypsin Max. # missed cleavages: 1 # Input Masses: 99
Results	{ MS-Fit search selects 187 entries (Top 100 collected)

[0257] Having generated a MALDI-TOF antigen candidate list, with the protein

shown above having the highest score, the top 100 on this list were checked for expression patterns in the cell lines using the a database library, in this case a SAGE library generated from melanoma cell lines. Only protein of roughly the correct molecular weight that roughly matched the Western blot results.

[0258] In order to confirm the antibody, a commercially available monoclonal antibody was used to immunoprecipitate the protein from a whole cell lysate of a tumor cell line that was known to express this protein. The whole cell lysate, the immunoprecipitated protein, and the supernatant of the immunoprecipitated sample were analyzed by western blotting with the third longitudinal patient serum sample. That blot is shown in Figure 7.

***Example No.3 Identification or Confirmation of Antigens Using Animal Models***

[0259] Immunocompetent mice are immunized with whole tumor cells using the method of Fradet et al. (1984) P.N.A.S. USA 81: 224, tumor cell membranes or serum-free conditioned medium from cultured tumor cells. Total serum is collected from sacrificed mice and total antibodies are collected using the method of Reilly et al. (2001) Cancer Research 61:880. The mouse antibodies are absorbed to normal cells (fibroblasts, lymphocytes) to eliminate pan reactive mouse antibodies recognizing ubiquitous antigens. *In vitro* or *in vivo* assays can be conducted to assess the functional properties of the enriched antibody preparation. For instance enriched antibodies can be added to human tumor cells in the presence of complement and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) *in vitro* to determine if the antibodies can mediate antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) by the method of Scott et al. (2000) Cancer Research 60:3254. Alternatively enriched antibodies can be adoptively transferred to immunodeficient mice by the method of Reilly et al. (2001) *supra*, of a similar genetic background to the immunocompetent mice used to generate the antibodies to determine if they confer protection from challenge by the human tumor cells. If the antibody preparation are shown to kill human tumor cells *in vitro* or retard human tumor cell growth *in vivo*, a biologically active anti-human cancer cell antibody must be present. Western blot analyses using the biologically active antibody are tested for reactivity against human cancer cells that are affected by

the antibody relative to other human cells (cancerous and normal) that are not to rapidly identify the cognate antigens for therapeutic antibodies. Autologous or allogeneic human cancer cells or mouse cancer cells or their respective membrane fractions or shed antigens are useful to generate biologically active polyclonal antibodies in immunocompetent mice. However, the probability of generating biologically active antibodies will be greater if the human tumor cells used to generate antibodies in immunocompetent mice are the same as those used to challenge immunodeficient mice.

*Example No. 4 Use of Methods to Identify Antigens Implicated in an Autoimmune Disease, Systemic Lupus Erythematosus*

[0260] A number of different cytokines have been implicated in the development of systemic lupus erythematosus ("SLE"). Interleukin 10 for instance appears to be elevated in SLE patients suggesting that it may play a role in the development or progression of the autoimmune disease Llorente et al. (1955) Journal of Experimental Medicine 181:839 administered anti-IL-10 antibodies to immunodeficient mice that had previously been injected with peripheral blood mononuclear cells from SLE patients and observed that this treatment reduced the concentration of human autoantibodies in the serum of treated mice. However other secreted factors (interleukin 1) and cell surface markers (CD40L) have been reported to be elevated in SLE patients and as the relative contributions of these molecules to the pathogenesis of SLE are unknown, the arbitrary selection of any one target (IL-10) for neutralization may fail in the clinic.

[0261] As an alternative to generating an antibody to one defined target, immunocompromised mice are immunized with SLE patient peripheral blood mononuclear cells ("PBMCs"), or isolated cells from SLE patients (e.g., dendritic cells, T cells or B cells) or cell membranes or serum-free conditioned medium derived from such cells. Total serum is collected from sacrificed mice and total antibodies are collected. The mouse antibodies are absorbed to normal human cells (fibroblasts, lymphocytes) to eliminate pan reactive mouse antibodies recognizing ubiquitous antigens. *In vitro* or *in vivo* assays are conducted to assess the functional properties of the enriched antibody preparation. For instance enriched antibodies are added to SLE

patient cells in the presence of complement and PBMCs *in vitro* to determine if the antibodies can mediate ADCC. Alternatively enriched antibodies are adoptively transferred to immunodeficient mice (of a similar genetic background to the immunocompetent mice used to generate the antibodies) to determine if they modulate the behavior of SLE patient PBMCs that have been injected into the immunodeficient mice. If the antibody preparation is shown to modulate SLE patient PBMCs *in vitro* or *in vivo*, a biologically active antibody recognizing a SLE target must be present. One then conducts Western blot analyses using the biologically active antibody and tests for reactivity against patient SLE cells that are affected by the antibody relative to other human cells (normal counterparts from healthy donors) that are not, to rapidly identify the cognate antigens for therapeutic antibodies.

***Example No. 5 Identification of Antigens in Conditions where Inappropriate Expression of Protein is Associated with Disease State, Polycystic Kidney Disease***

[0262] Immunocompetent mice are immunized with polycystic kidney cells or cell membranes or serum-free conditioned medium derived from such cells. Total serum is collected from sacrificed mice and total antibodies are collected. The mouse antibodies are absorbed to normal cells (fibroblasts, lymphocytes, normal kidney) to eliminate pan reactive mouse antibodies recognizing ubiquitous antigens. *In vitro* or *in vivo* assays are conducted to assess the functional properties of the enriched antibody preparation. For instance enriched antibodies are added to polycystic kidney cells in the presence of complement and PBMCs *in vitro* to determine if the antibodies can mediate ADCC. Alternatively enriched antibodies are adoptively transferred to mice that spontaneously develop polycystic kidney disease (of a similar genetic background to the immunocompetent mice used to generate the antibodies) to determine if they inhibit the development of cysts *in vivo*. If the antibody preparation is shown to be cytostatic or cytotoxic for cysts, an antibody of potential therapeutic utility must be present. Western blot analyses is conducted using the biologically active antibody and tests for reactivity against cystic cells that are affected by the antibody relative to other cells that are not to rapidly identify the cognate antigens for therapeutic antibodies. Either human or non-human polycystic kidney cells are used to generate the polyclonal antibodies and prepare lysates for Western blot analysis and

subsequent antigen identification.

[0263] It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the above embodiments, that the foregoing description and examples are intended to illustrate and not to limit the scope of the invention. Other aspects, advantages and modifications within the scope of the invention will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains.

**CLAIMS**

What is claimed is:

1. A method to identify a polypeptide correlating with a phenotype of interest, wherein the polypeptide specifically recognizes and binds a serum antibody, said method comprising identifying a polypeptide common to a list of characterized genes, wherein said genes are differentially expressed in one or more relevant cells or tissues and a list of characterized polypeptides, thereby identify said polypeptide correlating with said phenotype of interest.

2. The method of claim 1, wherein the polypeptide is membrane associated.

3. The method of claim 1, wherein the genes are characterized by cell or tissue type.

4. The method of claim 4, wherein the genes of the list are characterized by properties of the gene product, wherein said properties are selected from the group consisting of specific reactivity with the serum antibody, highly expressed in the relevant cell line or tissue, little or no detectable expression in the relevant cell line or tissue, and uniquely expressed in the relevant cell line or tissue.

5. The method of claim 4, wherein two or more properties characterize the properties of the gene product.

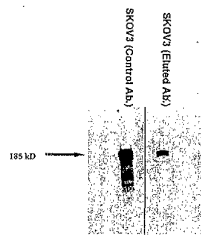
6. The method of claim 4 or 5, further comprising the property of molecular weight.

7. The method of claim 1, wherein the list of characteristics of the proteins of the list is a selected from mass, reactivity with the serum antibody, peptidase digestion pattern, enzymatic digestion pattern and MOLDI-TOF selection criteria.

8. The method of claim 7, wherein two or more properties characterize the properties of the gene product.
9. The method of claim 7 or 8, further comprising the property of molecular weight.
10. The method of claim 9, wherein MOLDI-TOF selection criteria are selected from the group consisting database selection, species, type of digest, CNBr, number of miscleavages, molecular weight range, contamination indication, and mass accuracy.
11. The method of claim 1, wherein the relevant cell or tissues are isolated from subject a treated with a therapy selected from the group consisting of antiviral, antibiotic, chemotherapeutic, and immunotherapeutic.
12. The method of claim 10, wherein the immunotherapeutic therapy is selected from treatment with a cancer vaccine, antibody therapy and adoptive immunotherapy.
13. The method of claim 1, further comprising isolating the antibody that specifically recognizes and bind the antigen.
14. A polypeptide identified by the method of claim 1.
15. An antibody isolated by the method of claim 14.
16. The antibody of claim 15, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
17. A hybridoma cell line that produces the monoclonal antibody of claim 16.
18. A composition comprising the isolated polypeptide of claim 14 and a carrier.

19. An isolated polynucleotide encoding the polypeptide of claim 14.
20. The complement of the polynucleotide of claim 19.
21. A composition comprising the isolated polynucleotide of claim 19 and a carrier.
22. The composition of claim 18 or 21 wherein the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.
23. A gene delivery vehicle comprising a polynucleotide of claims 19.
24. An isolated host cell comprising a polynucleotide of claim 19.
25. An isolated host cell comprising a polypeptide of claim 17.
26. The host cell of claim 25, wherein the cell is an antigen presenting cell (APC) and the polypeptide is presented by a Class I MHC molecule on the surface of the cell.
27. The host cell of claim 26, wherein the antigen presenting cell (APC) is a dendritic cell.

**Eluted Anti-Her2 Antibody Retains Activity**



**FIGURE 1**

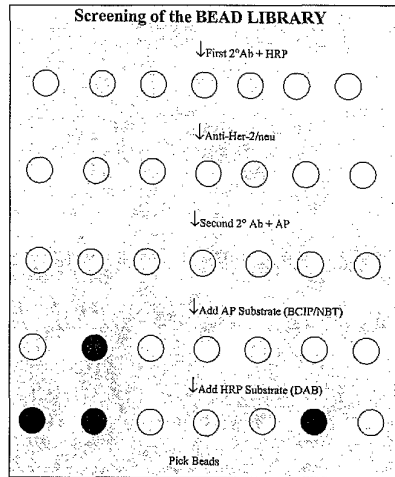


FIGURE 2

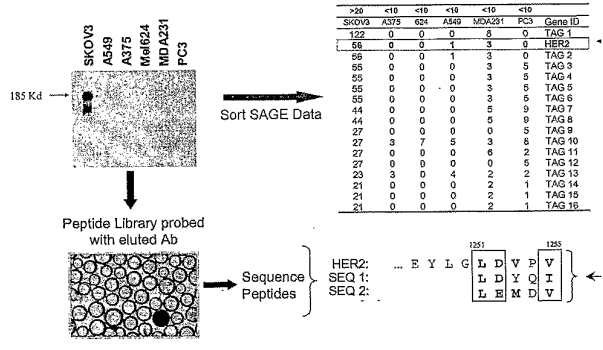


FIGURE 3

### Strategy to Purify Apical and Basolateral Membrane Proteins

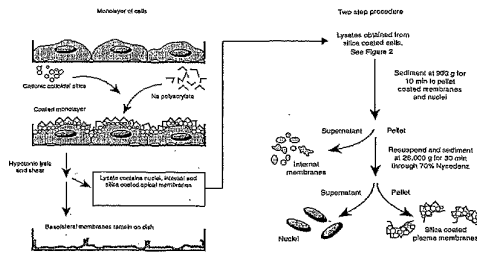


FIGURE 4

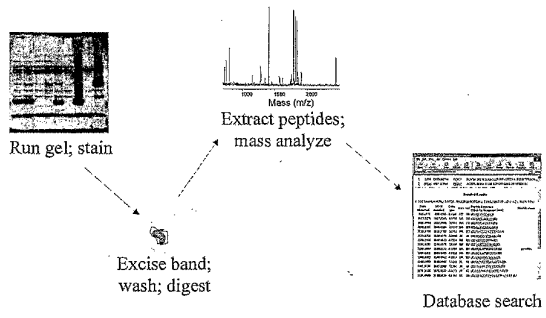


FIGURE 5

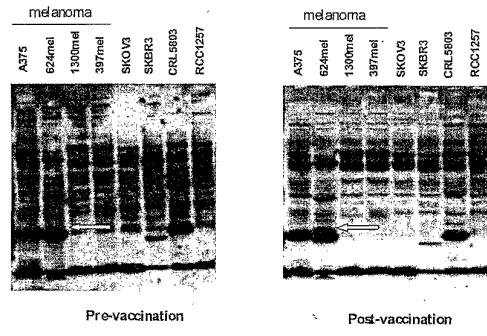


FIGURE 6

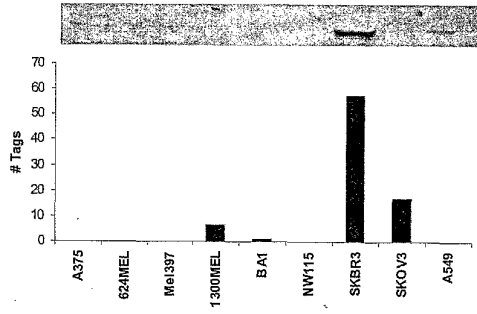


FIGURE 7

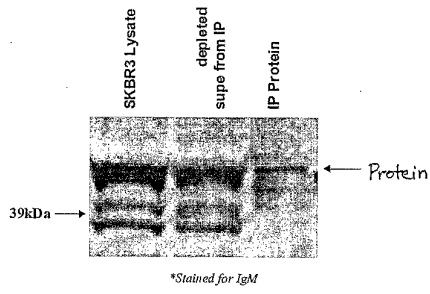


FIGURE 8

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
21 March 2002 (21.03.2002)

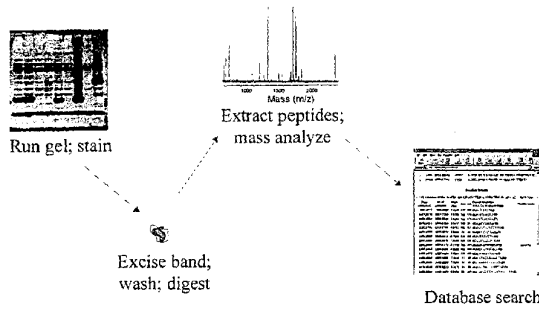
PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/023202 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, C07K 1/14, 14/47, 16/06, C12N 5/20, 5/10, A61K 38/00
- (52) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): NICOLETTE, Charles, A. [US/US]; 4 Mill Street, Framingham, MA 01701 (US). ROBERTS, Bruce, L. [US/US]; 108 Pinehill Road, Southborough, MA 01772 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/29238
- (74) Agent: KONSKI, Antoinette, F.; McCutchen, Doyle, Brown & Eversen LLP, Suite 1800, Three Embarcadero Center, San Francisco, CA 94111 (US).
- (22) International Filing Date: 18 September 2001 (18.09.2001)
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/235,586 18 September 2000 (18.09.2000) US  
60/262,835 19 January 2001 (19.01.2001) US  
60/303,751 6 July 2001 (06.07.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENZYME CORPORATION [US/US]; One Kendall Square, Cambridge, MA 01701-9322 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD TO IDENTIFY THERAPEUTIC ANTIBODY TARGETS ASSOCIATED WITH A THERAPEUTIC RESPONSE



(57) Abstract: The present invention provides methods for methods of identifying novel therapeutic polypeptide antigens and epitopes. These methods are designed to select polypeptides that are particularly effective targets for antibody based immunotherapies. The invention further provides therapeutic polypeptide antigens and epitopes polypeptides that are useful for inducing an immune response in a subject. In addition, the invention provides antibodies directed against these polypeptide antigens and epitopes and methods for using these antibodies to inhibit the progression of disease in a subject.

WO 02/023202 A2

---

**WO 02/023202 A2** 

patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(48) Date of publication of this corrected version: 4 July 2002

(15) Information about Correction:  
see PCT Gazette No. 27/2002 of 4 July 2002, Section II

**Published:**  
without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/023202 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/68, C07K 1/14, 14/47, 16/06, C12N 5/20, 5/10, A61K 38/00

(74) Agent: KONSKI, Antoinette, F.; McCutchen, Doyle, Brown & Emerson LLP, Suite 1800, Three Embarcadero Center, San Francisco, CA 94111 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/29238

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date:  
18 September 2001 (18.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/233,586 18 September 2000 (18.09.2000) US  
60/262,835 19 January 2001 (19.01.2001) US  
60/303,751 6 July 2001 (06.07.2001) US

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

(71) Applicant (for all designated States except US): GENZYME CORPORATION [US/US]; One Kendall Square, Cambridge, MA 01701-9322 (US).

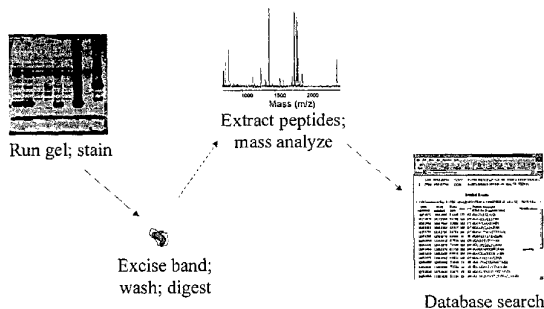
(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): NICOLETTE, Charles, A. [US/US]; 4 Mill Street, Framingham, MA 01701 (US). ROBERTS, Bruce, L. [US/US]; 108 Pinehill Road, Southborough, MA 01772 (US).

Published: with international search report

(88) Date of publication of the international search report:  
22 May 2003

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD TO IDENTIFY ANTIBODY TARGETS BASED ON MASS SPECTROMETRY (MALDI-TOF)



(57) Abstract: The present invention provides methods for identifying novel therapeutic polypeptide antigens and epitopes. These methods are designed to select polypeptides that are particularly effective targets for antibody based immunotherapies. The invention further provides therapeutic polypeptide antigens and epitopes polypeptides that are useful for inducing an immune response in a subject. In addition, the invention provides antibodies directed against these polypeptide antigens and epitopes and methods for using these antibodies to inhibit the progression of disease in a subject.



WO 02/023202 A3

**WO 02/023202 A3** 

**(15) Information about Correction:**

**Previous Correction:**

see PCT Gazette No. 27/2002 of 4 July 2002, Section II

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

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/29238
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 601N33/68 C07K1/14 C07K14/47 C07K16/06 C12N5/20 C12N5/10 A61K38/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JURINKE CHRISTIAN ET AL: "Application of nested PCR and mass spectrometry for DNA-based virus detection: HBV-DNA detected in the majority of isolated anti-Hbc positive sera." GENETIC ANALYSIS BIOMOLECULAR ENGINEERING, vol. 14, no. 3, January 1998 (1998-01), pages 97-102, XP004114932, page 97, left-hand column, line 1 -page 98, line 24, page 99, right-hand column, line 1 - line 52 --- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *C* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 January 2003		Date of mailing of the international search report 14/01/2003
Name and mailing address of the ISA Etiopsean Patent Office, P. B. 5516 Patentlaan 2 NL - 2250 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Flao, K

Form PCT/ISA/210 (revised version) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intl. Application No.  
 PCT/US 01/29238

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GALEA P ET AL: "Rationale for a vaccine using cellular-derived epitope presented by HIV isolates" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 13-14, January 1999 (1999-01), pages 1700-1705, XP004158307 ISSN: 0264-410X the whole document	1-5, 11-13
X	SICKMANN A ET AL: "Identification of major histocompatibility complex class II-associated peptides derived from freshly prepared rat Langerhans cells" using MALDI-PSD and Edman degradation." THE ANALYST, ENGLAND APR 2000, vol. 125, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 569-573, XP008005304 ISSN: 0003-2654 the whole document	1-11
X	PETER JOCHEN ET AL: "Analysis of free prostate-specific antigen (PSA) after chemical release from the complex with alpha1-antichymotrypsin (PSA-ACT)." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 46, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 474-482, XP001053674 ISSN: 0009-9147 page 474, right-hand column, line 20 -page 475, left-hand column, line 29	1,3-12
X	JUNGBLUT PETER R ET AL: "Proteomics in human disease: Cancer, heart and infectious diseases." ELECTROPHORESIS, vol. 20, no. 10, July 1999 (1999-07), pages 2100-2110, XP000870393 ISSN: 0173-0835 page 2101, left-hand column, line 14 -right-hand column, line 15; figure 1	1-12
A	CHAURAND P ET AL: "Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, ELSEVIER SCIENCE INC., NEW YORK, NY, US, vol. 10, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 91-103, XP004155740 ISSN: 1044-0305 the whole document	1-12

5

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/29238

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02 12899 A (BIOVATION LTD ; CARTER GRAHAM (GB); CARR FRANCIS J (GB); HELLENDOR) 14 February 2002 (2002-02-14) page 1, line 4 -page 5, line 25; claims 1-34 -----	1-12

5

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

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	national application No. PCT/US 01/29238
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 1-13 (partially) and 14-27 (totally) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 29238

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-13 (partially) and 14-27 (totally)

The scope of claims 14-27 is unclear and speculative within the meaning of Article 6 PCT. Said claims lack indication concerning their technical features. The available experimental data actually relate to screening and identification of antigens, but not to a composition containing such obtained antigens, to gene delivery vehicle or to isolated host cell. The latter are mentioned in the description but not in relation with the invention as shown in the examples. Consequently, no search has been carried out for the claims 14-27.

The scope of claims 1-13 is also unclear and speculative within the meaning of Article 6 PCT. The search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear and concise, namely a method to identify a polypeptide, in a list of genes, correlating with a phenotype of interest, the polypeptide being recognized and bound by a serum antibody.

Present claims 1-11, 15-17 and 25-27 contain typing and/or syntax errors implying a lack of clarity and conciseness within the meaning of Article 6 PCT.

Each time the term "MOLDI" was found in the application it was understood as the term "MALDI". It was particularly the case in claims 7 and 10 and dependent claims.

Claim 4 was supposed to refer to claim 1 and not to claim 4.

Claims 15 to 17 were supposed to refer to claim 13 and not to claim 14.

Claim 25 was supposed to refer to claim 14 and not to claim 17.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

Int. Application No.  
PCT/US 01/29238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0212899 A	14-02-2002	AU 8395801 A WO 0212899 A2	18-02-2002 14-02-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 15/00	C
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

(72)発明者 ロバーツ ブルース エル.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サウスバラ パインヒル ロード 108

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA02 GA03 GA11

4B064 AG27 CA10 CA20 CG24 DA01 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 BA05 CA24 CA25 CA45

CA46

4H045 AA11 CA42 DA75 DA76 EA28 EA29 EA31 FA72 FA73 FA74

专利名称(译)	基于质谱法 ( MALDI-TOF ) 鉴定抗体靶标的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004513332A</a>	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2002527798	申请日	2001-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	建新公司		
申请(专利权)人(译)	Genzyme公司, 公司		
[标]发明人	ニコレットチャールズエイ ロバーツブルースエル		
发明人	ニコレット チャールズ エイ. ロバーツ ブルース エル.		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/10 C12N5/20 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/6818		
FI分类号	G01N33/53.D C07K14/47 C07K16/18 G01N33/577.Z C12N15/00.A C12N5/00.B C12N15/00.C C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/233586 2000-09-18 US 60/262835 2001-01-19 US 60/303751 2001-07-06 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了涉及新型治疗性多肽抗原的方法和鉴定表位的方法。设计这些方法的目的是选择作为基于抗体的免疫疗法的特别有效靶标的多肽。本发明还提供治疗性多肽抗原和表位多肽，其可用于在受试者中诱导免疫应答。此外，本发明还提供了靶向这些多肽抗原和表位的抗体，以及使用这些抗体抑制受试者疾病进展的方法。

