

(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2004-512022

(P2004-512022A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) | |
|----------------------------|-------------------|-------------|-----------|
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 | Z N A A | 4 B O 2 4 |
| A 6 1 K 31/7088 | A 6 1 K 31/7088 | | 4 B O 6 5 |
| A 6 1 K 35/12 | A 6 1 K 35/12 | | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 K 39/00 | H | 4 C O 8 5 |
| A 6 1 K 39/00 | A 6 1 K 39/39 | | 4 C O 8 6 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 | (全 183 頁) | 最終頁に続く |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-510525 (P2002-510525) | (71) 出願人 | 397069329 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年6月8日 (2001.6.8) | | コリクサ コーポレーション |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成14年12月9日 (2002.12.9) | | アメリカ合衆国 ワシントン 98104 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/018557 | | , シアトル, コロンビア ストリート |
| (87) 国際公開番号 | W02001/096388 | | 1124, スイート 200 |
| (87) 国際公開日 | 平成13年12月20日 (2001.12.20) | (74) 代理人 | 100107489 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/210, 899 | | 弁理士 大塩 竹志 |
| (32) 優先日 | 平成12年6月9日 (2000.6.9) | (72) 発明者 | ジャン, ユーキュー |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国 ワシントン 98032 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/270, 216 | | , ケント, エス. 232エヌディー |
| (32) 優先日 | 平成13年2月20日 (2001.2.20) | | ストリート 5001 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (72) 発明者 | ハーロッカー, スーザン エル. |
| | | | アメリカ合衆国 ワシントン 98117 |
| | | | , シアトル, 13ティーエイチ アベ |
| | | | ニュー ダブリュー. 7522 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 結腸癌の治療および診断のための組成物および方法

(57) 【要約】

癌（例えば、結腸癌）の治療および診断のための組成物および方法が開示される。組成物は、1つ以上の結腸腫瘍タンパク質、その免疫原性タンパク質、またはこのようなタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み得る。あるいは、治療組成物は、結腸腫瘍タンパク質を発現する抗原提示細胞、またはこのようなタンパク質を発現する細胞に特異的なT細胞を含み得る。このような組成物は、例えば、結腸癌のような疾患の予防および処置のために使用され得る。結腸腫瘍タンパク質、またはこのようなタンパク質をコードする mRNA の、サンプル中での検出に基づく診断方法もまた、提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者における免疫応答を刺激するための薬学的組成物であって、該組成物は、第一の成分および第二の成分を含み、該第一の成分は、生理学的に受容可能なキャリアおよび免疫刺激剤からなる群より選択され、そして該第二の成分は、以下：

- (a) 配列番号 2 3 3 2 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；
- (b) 配列番号 2 2 3 5 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および
- (c) 配列番号 2 2 3 5 の配列に少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

からなる群より選択されるポリペプチドを含む、薬学的組成物。

10

【請求項 2】

患者における癌の処置のための薬学的組成物であって、該組成物は、第一の成分および第二の成分を含み、該第一の成分は、生理学的に受容可能なキャリアおよび免疫刺激剤からなる群より選択され、そして該第二の成分は、以下：

- (a) 配列番号 2 3 3 2 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；
- (b) 配列番号 2 2 3 5 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および
- (c) 配列番号 2 2 3 5 に記載の配列に少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

からなる群より選択されるポリペプチドを含む、薬学的組成物。

20

【請求項 3】

単離されたポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、以下：

- (a) 配列番号 2 2 3 2 に提供される配列；
- (b) 配列番号 2 2 3 2 に提供される配列の相補体；
- (c) 配列番号 2 2 3 2 に提供される配列の少なくとも 20 個連続する残基からなる配列；
- (d) 配列番号 2 2 3 2 に提供される配列に、中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列；
- (e) 配列番号 2 2 3 2 の配列に少なくとも 75% の同一性を有する配列；
- (f) 配列番号 2 2 3 2 の配列に少なくとも 90% の同一性を有する配列；ならびに
- (g) 配列番号 2 2 3 2 に提供される配列の縮重改変体、

からなる群より選択される配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 4】

単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：

- (a) 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる配列；
- (b) 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる配列に、少なくとも 70% の同一性を有する配列、
- (c) 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる配列に、少なくとも 90% の同一性を有する配列、
- (d) 配列番号 2 2 3 5 において提供されるアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

40

【請求項 5】

発現制御配列に作動可能に連結された請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 4 に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

患者における癌の存在を検出するためのキットであって、キットは、以下：

50

- (a) 請求項 4 に記載のポリペプチドに結合する結合因子
 - (b) 該結合因子に結合するポリペプチドの量を、生物学的サンプル中で検出するための指示書；および
 - (c) 該ポリペプチドの量を、所定のカットオフ値と比較し、そしてこれから、該患者における癌の存在を決定するための指示書、
- を備える、キット。

【請求項 9】

請求項 4 に記載の少なくとも 1 つのポリペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項 10】

配列番号 2 2 3 2 に列挙される配列に中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、オリゴヌクレオチド。 10

【請求項 11】

腫瘍タンパク質に特異的な T 細胞を刺激および / または拡大するための方法であって、該方法は、以下：

- (a) 請求項 4 に記載のポリペプチド；
 - (b) 請求項 3 に記載のポリヌクレオチド；および
 - (c) 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを発現する抗原提示細胞、
- からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分と、T 細胞とを、T 細胞の刺激および / または拡大を可能にするのに十分な条件下および時間で接触させる工程、を包含する、方法。 20

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法に従って調製された T 細胞を含む、単離された T 細胞集団。

【請求項 13】

第 1 の成分および第 2 の成分を含む組成物であって、該第 1 の成分は、生理学的に受容可能なキャリアおよび免疫刺激剤からなる群より選択され、そして該第 2 の成分は、以下：

- (a) 請求項 4 に記載のポリペプチド；
 - (b) 請求項 3 に記載のポリヌクレオチド；
 - (c) 請求項 7 に記載の抗体；
 - (d) 請求項 9 に記載の融合タンパク質；
 - (e) 請求項 12 に記載の T 細胞集団；および 30
 - (f) 請求項 4 に記載のポリペプチドを発現する抗原提示細胞、
- からなる群より選択される、組成物。

【請求項 14】

患者における癌の存在を決定するためのキットであって、該キットは、以下：

- (a) 請求項 10 に記載のオリゴヌクレオチド；
 - (b) 該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、生物学的サンプル中で検出するための指示書；および
 - (c) 該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、所定のカットオフ値と比較し、そしてこれから、該患者における癌の存在を決定するための指示書、
- を備える、キット。 40

【請求項 15】

請求項 10 に記載の少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを備える、診断キット。

【請求項 16】

請求項 7 に記載の少なくとも 1 つの抗体および検出試薬を備える診断キットであって、該検出試薬がレポーター基を含む、診断キット。

【請求項 17】

患者における癌の発生を阻害するためのキットであって、該キットは、以下：

- (a) 以下：
- (i) 請求項 4 に記載のポリペプチド；
- (i i) 請求項 3 に記載のポリヌクレオチド；および 50

(i i i) 請求項 4 に記載のポリペプチドを発現する抗原提示細胞、
からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分；

(b) T 細胞が増殖するように、C D 4 + および / または C D 8 + T 細胞を該成分とイン
キュベートするための指示書、

(c) 有効量の該増殖した T 細胞を該患者に投与するための指示書
を備える、キット。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

(発明の技術分野)

本発明は概して、癌（例えば、結腸癌）の治療および診断に関する。本発明は、より詳細 10
には、結腸腫瘍タンパク質の少なくとも一部を含むポリペプチド、およびこのようなポリ
ペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。このようなポリペプチドおよびポリヌ
クレオチドは、結腸悪性腫瘍の予防および処置のための、ならびにこのような癌の診断お
よびモニタリングのためのワクチンおよび薬学的組成物において用いられ得る。

【 0 0 0 2 】

(発明の背景)

癌は、世界中で、重大な健康問題である。癌の検出および治療において、進歩が成されて 20
きたが、現在利用可能な、予防または処置のためのワクチンも他の普遍的に首尾よい方法
もない。一般的に化学療法または手術および放射線療法の組み合わせに基づく現在の治療
法は、多くの患者において不十分であることが証明され続けている。

【 0 0 0 3 】

結腸癌は、米国において二番目に高頻度で診断される悪性疾患であり、そして癌死の二番 30
目に一般的な原因である。早期局在段階で検出された結腸直腸癌を有する患者での 5 年生
存率は、92% である；不幸にも、この段階で診断されるのは、結腸直腸癌の 37% に過
ぎない。癌が隣接する器官またはリンパ節に伝播される場合、生存率は 64% に低下し、
そして遠隔転移を有する患者では 7% に低下する。

【 0 0 0 4 】

結腸癌の診断は、腸壁を通じた腫瘍の浸透の程度、および結節関与の存在または非存在に 30
直接関し、結果として早期検出および処置が特に重要である。現在、診断は、便潜血検査
、S 状結腸鏡検査、結腸内視鏡検査、およびバリウム浣腸二重造影に関するスクリーニン
グアッセイの使用によって補助される。処置レジメンは、癌のタイプおよび段階によって
決定され、そして手術、放射線療法、および / または化学療法を含む。手術（治療の最も
一般的な形態）後の再発は、主な問題であり、そしてしばしば死亡の最終原因である。

【 0 0 0 5 】

これらの癌および他の癌のための治療におけるかなりの探索にもかかわらず、結腸癌は、
効果的に診断および処置することが困難なままである。従って、このような癌を検出およ
び処置するための改善された方法の必要性が存在する。本発明は、これらの必要性を満た
し、さらに他の関係する利点を提供する。

【 0 0 0 6 】

(発明の要旨)

1 つの局面において、本発明はポリヌクレオチド組成物を提供し、このポリヌクレオチド 40
組成物は、以下：

(a) 配列番号 1 ~ 2 2 3 4 に提供される配列；

(b) 配列番号 1 ~ 2 2 3 4 に提供される配列の相補体；

(c) 配列番号 1 ~ 2 2 3 4 に提供される配列の少なくとも 20 個、25 個、30 個、3
5 個、40 個、45 個、50 個、75 個および 100 個連続する残基からなる配列；

(d) 配列番号 1 ~ 2 2 3 4 に提供される配列に中程度にストリンジェントな条件または 30
高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列；

(e) 配列番号 1 ~ 2 2 3 4 の配列に少なくとも 75%、80%、85%、90%、95
%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する配列；ならびに 50

(f) 配列番号 1 ~ 2 2 3 4 に提供される配列の縮重改変体、
からなる群より選択される配列を含む。

【0007】

1つの好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド組成物は、試験された結腸癌サンプルの少なくとも約 20% において、より好ましくは少なくとも約 30% において、そして最も好ましくは少なくとも約 50% において、正常組織のレベルの少なくとも約 2 倍、好ましくは少なくとも約 5 倍、そして最も好ましくは少なくとも約 10 倍のレベルで、発現される。

【0008】

本発明は、別の局面において、上記のポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド組成物を提供する。 10

【0009】

本発明はさらに、配列番号 2 2 3 5 に列挙される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド組成物を提供する。

【0010】

特定の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドは、本明細書中にさらに記載されるように、免疫原性である。すなわち、これらは、免疫応答（特に、体液性および/または細胞性免疫応答）を誘発し得る。

【0011】

本発明はさらに、開示されたポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド配列のフラグメント、改変体および/または誘導体を提供し、ここで、フラグメント、改変体および/または誘導体は、好ましくは、配列番号 2 2 3 5 に示されるポリペプチド配列、または配列番号 1 ~ 2 2 3 4 に示されるポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列の少なくとも約 50% 免疫原性活性のレベル、好ましくは少なくとも約 70% そしてより好ましくは少なくとも約 90% の免疫原性活性のレベルを有する。 20

【0012】

本発明はさらに、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドを含む発現ベクター、およびこのような発現ベクターで形質転換されたかまたはトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

【0013】

他の局面において、本発明は、上記のようなポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む薬学的組成物および生理学的に受容可能なキャリアを提供する。 30

【0014】

本発明の関連した局面において、薬学的組成物（例えば、ワクチン組成物）が、予防適用または治療適用のために提供される。このような組成物は、一般に、本発明の免疫原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび免疫刺激剤（例えば、アジュバント）を含む。

【0015】

本発明はさらに、以下を含む薬学的組成物を提供する：(a) 本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合フラグメント、またはそれらのフラグメント；および (b) 生理学的に受容可能なキャリア。 40

【0016】

さらなる局面において、本発明は、以下を含む薬学的組成物を提供する：(a) 上記のようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞および (b) 薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤。例示的な抗原提示細胞としては、樹状細胞、マクロファージ、単球、線維芽細胞および B 細胞が挙げられる。

【0017】

関連した局面において、以下を含む薬学的組成物が提供される：(a) 上記のようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞および (b) 免疫刺激剤。

【0018】

本発明はさらに、他の局面において、代表的に、生理学的に受容可能なキャリアおよび/ 50

または免疫刺激剤を含む薬学的組成物（例えば、ワクチン組成物）の形態で、上記のような少なくとも1つのポリペプチドを含む融合タンパク質、ならびにこのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。この融合タンパク質は、上記のように、複数の免疫原性ポリペプチドまたはその部分/改変体を含み得、そしてポリペプチドの発現、精製および/または免疫原性を容易にする1つ以上のポリペプチドセグメントをさらに含み得る。

【0019】

さらなる局面において、本発明は、患者における免疫応答（好ましくは、ヒト患者におけるT細胞応答）を刺激するための方法を提供し、この方法は、本明細書中に記載された薬学的組成物を投与する工程を包含する。患者は、結腸癌に冒され得るか（この場合、この方法が疾患の処置を提供する）、またはこのような疾患についての危険性が考えられる患者は、予防的に処置され得る。

10

【0020】

さらなる局面において、本発明は、患者における癌の発生を阻害するための方法を提供し、この方法は、上記のような薬学的組成物を患者に投与する工程を包含する。患者は、結腸癌に冒され得るか（この場合、この方法が疾患の処置を提供する）、またはこのような疾患についての危険性が考えられる患者は、予防的に処置され得る。

【0021】

本発明は、他の局面において、生物学的サンプルから腫瘍細胞を除去する方法をさらに提供する。この方法は、生物学的サンプルと、本発明のポリペプチドと特異的に反応するT細胞とを接触させる工程を包含し、ここで、この接触させる工程は、このサンプルからのこのタンパク質を発現する細胞の除去を可能にするための条件下および十分な時間で実施される。

20

【0022】

関連する局面において、患者における癌の発生を阻害するための方法が提供される。この方法は、上記のように処理された生物学的サンプルを患者に投与する工程を包含する。

【0023】

他の局面において、本発明のポリペプチドに特異的なT細胞を刺激するか、そして/または、これらを増大する方法がさらに提供される。これらの方法は、T細胞の刺激および/または増大を可能にするための条件下および十分な時間で、以下の1つ以上とT細胞とを接触させる工程を包含する：(i)上記のようなポリペプチド；(ii)このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；および/または(iii)このようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞。上記のように調製されたT細胞を含む単離されたT細胞集団がまた、提供される。

30

【0024】

さらなる局面において、本発明は、患者における癌の発生を阻害する方法を提供する。この方法は、上記のように治療有効量のT細胞集団を患者に投与する工程を包含する。

【0025】

本発明はさらに、患者における癌の発達を阻害する方法を提供する。この方法は、以下の工程を包含する：(a)以下の1つ以上を有する患者から単離したCD4⁺T細胞および/またはCD8⁺T細胞をインキュベートする工程：(i)本明細書中で開示されたポリペプチドの少なくとも1つの免疫原性部位を含むポリペプチド；(ii)このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；および(iii)このようなポリペプチドを発現した抗原提示細胞；ならびに(b)有効量の増殖したT細胞を患者に投与し、それによって、患者における癌の発達を阻害する工程。増殖した細胞は、患者への投与前にクローン化され得るが、必ずしもクローン化するに及ばない。

40

【0026】

さらなる局面において、本発明は、患者において癌（好ましくは結腸癌）の存在または非存在を決定するための方法を提供する。この方法は、以下を包含する：(a)患者から得た生物学的サンプルと、上に列挙したポリペプチドに結合する結合因子とを接触させる工

50

程；(b) サンプル中で、この結合因子に結合するポリペプチドの量を検出する工程；および(c) このポリペプチドの量と事前に決定していたカットオフ値とを比較し、それによって患者における癌の存在または非存在を決定する工程。好ましい実施形態において、この結合因子は、抗体であり、より好ましくはモノクローナル抗体である。

【0027】

他の局面において、本発明はまた、患者における癌の進行をモニタリングする方法を提供する。このような方法は、以下の工程を包含する：(a) 最初の時点で患者から得た生物学的サンプルと上に列挙したポリペプチドに結合する結合因子とを接触させる工程；(b) サンプルにおいて、この結合因子に結合するポリペプチドの量を検出する工程；(c) 次の時点において、患者から得られた生物学的サンプルを使用し、工程(a)および工程(b)を反復する工程；ならびに(d) 工程(c)において検出されたポリペプチドの量を工程(b)において検出された量と比較し、それらによって、患者における癌の進行をモニタリングする工程。

10

【0028】

他の局面において、本発明は、患者の癌の存在または非存在を決定するための方法をさらに提供する。この方法は以下の工程を包含する：(a) 患者から得られた生物学的サンプルと、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドとを接触させる工程；(b) そのサンプルにおいて、そのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチド、好ましくはmRNAのレベルを検出する工程；ならびに(c) そのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドのレベルと事前に決定されたカットオフ値とを比較して、それによって患者の癌の存在または非存在を検出する工程。特定の実施形態において、mRNAの量は、例えば、上記に列挙されるようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそのようなポリヌクレオチドの相補体とハイブリダイズする、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって検出される。他の実施形態において、mRNAの量は、上記に列挙されるようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそのようなポリヌクレオチドの相補体とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを使用する、ハイブリダイゼーション技術を使用して検出される。

20

【0029】

関連する局面において、患者の癌の進行をモニタリングする方法が、提供され、その方法は以下の工程を包含する：(a) 患者から得られた生物学的サンプルと、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドとを接触させる工程；(b) そのサンプルにおいて、そのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出する工程；ならびに(c) 次の時点において、患者から得られた生物学的サンプルを使用し、工程(a)および工程(b)を反復する工程；ならびに(d) (c)において検出されたポリヌクレオチドの量を工程(b)において検出された量と比較し、それらによって、患者における癌の進行をモニタリングする工程。

30

【0030】

さらなる局面において、本発明は、上記のようなポリペプチドに結合する抗体(例えば、モノクローナル抗体)ならびにこのような抗体を含む診断キットを提供する。上記のような1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブまたはオリゴヌクレオチドプライマーを含む診断キットがまた、提供される。

40

【0031】

本発明のこれらの局面および他の局面は、以下の詳細な説明および添付物を参照することによって明らかになる。本明細書中で開示される全ての参考文献は、各々が個々に援用されるがごとく参考としてその全体が本明細書によって援用される。

【0032】

(発明の詳細な説明)

本発明は、一般に、組成物、ならびに癌(特に、結腸癌)の治療および診断におけるその使用に関する。以下でさらに記載するように、本発明の例示的な組成物としては、以下を

50

含むがこれらに限定されない：ポリペプチド、特に免疫原性ポリペプチド、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、抗体および他の結合因子、抗原提示細胞（APC）ならびに免疫系細胞（例えば、T細胞）。

【0033】

本発明の実施は、特にそれと逆であることを示さなければ、ウイルス学、免疫学、細菌学、分子生物学、および当業者の範囲である組換えDNA技術の従来の方法（これらの多くは、例示目的で以下に記載される）を使用する。このような技術は、文献によって完全に説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版、1989）；Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（1982）；DNA Cloning: A Practical Approach、第I巻および第II巻（D. Glover編）；Oligonucleotide Synthesis（N. Gait編、1984）；Nucleic Acid Hybridization（B. HamesおよびS. Higgins編、1985）；Transcription and Translation（B. HamesおよびS. Higgins編、1984）；Animal Cell Culture（R. Freshney編、1986）；Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning（1984）を参照のこと。

10

【0034】

本明細書中で引用される、全ての刊行物、特許および特許出願は、上記または下記にかかわらず、全体が参考して本明細書によって援用される。

20

【0035】

本明細書中および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈によって明らかに他の方法で示されていない限り、複数の参照を含む。

【0036】

（ポリペプチド組成物）

本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、その従来の意味、すなわちアミノ酸の配列として使用される。これらのポリペプチドは、特定の長さの生成物に限定されず；従って、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質は、このポリペプチドの定義に含まれ、そしてこのような用語は、別段示さない限り、本明細書中で交換可能に使用され得る。この用語はまた、このポリペプチドの発現後修飾（例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化など）ならびに天然および非天然の両方の、当該分野で公知の他の改変を称さない。すなわち、この用語は、これらを排除する。ポリペプチドは、タンパク質全体でもあり、または部分配列でもあり得る。本発明の状況において特定の目的のポリペプチドは、エピトープ、すなわち、ポリペプチドの免疫原特性の実質的に原因となり、かつ免疫応答を誘起し得る抗原決定基を含むアミノ酸部分配列である。

30

【0037】

本発明の特に例示的なポリペプチドとしては、配列番号1～2234のいずれか1つに示されたポリヌクレオチド配列、あるいは中度のストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1～2234のいずれか1つに示されるポリペプチド配列に対してハイブリダイズする配列によってコードされるポリペプチドを含む。特定の他の例示的な本発明のポリペプチドとしては、配列番号2235に示されるアミノ酸配列が挙げられる。

40

【0038】

本発明のポリペプチドは、これらの同定が結腸腫瘍サンプルにおけるこれらの発現の増大したレベルに少なくとも部分的に基づくことの現れとして、本明細書中で時々、結腸腫瘍タンパク質または結腸腫瘍ポリペプチドとして参照される。従って、「結腸腫瘍ポリペプチド」または「結腸腫瘍タンパク質」は、一般に本発明のポリペプチド配列、またはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を示し、これらは、例えば、本明

50

細書中で提供された代表的なアッセイを使用して決定されるように、正常組織での発現レベルより、少なくとも2倍高いレベル、および好ましくは5倍高いレベルで、試験された結腸腫瘍サンプルの、好ましくは約20%を超える、より好ましくは約30%を超える、そして最も好ましくは約50%以上を超える、結腸腫瘍サンプルの実質的な部分において発現される。本発明の結腸腫瘍ポリペプチド配列は、その腫瘍細胞での増大した発現レベルに基づき、以下にさらに記載されるように、診断マーカーならびに治療標的の両方として特定の有用性を有する。

【0039】

特定の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは免疫原性であり、すなわちこれらは、結腸癌を有する患者からの抗血清および/またはT細胞を用いる免疫アッセイ（例えば、ELISAまたはT細胞刺激アッセイ）で検出可能に反応する。免疫原性活性についてのスクリーニングは、当業者に周知の技術を使用して実施され得る。例えば、このようなスクリーニングは、例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されるスクリーニングのような方法を使用して実施され得る。1つの例示的な例において、ポリペプチドは固体支持体に固定され得、そして患者の血清と接触され得、血清中の抗体の固定されたポリペプチドへの結合を可能にする。次いで、非結合血清は除去され、そして結合した抗体は、例えば、¹²⁵I標識プロテインAを用いて検出され得る。

10

【0040】

当業者に認識されるように、本明細書中で開示されるポリペプチドの免疫原性部分もまた、本発明により包含される。本明細書中で用いられる場合、「免疫原性部分」は、それ自体が本発明の免疫原性ポリペプチドを認識するB細胞および/またはT細胞表面抗原レセプターと免疫学的に反応性である（すなわち、特異的に結合する）、本発明の免疫原性ポリペプチドのフラグメントである。免疫原性部分は、一般に、周知の技術（例えば、Paul、Fundamental Immunology, 第3版、243-247 (Raven Press, 1993)およびこの文献で引用される参考文献に要約されている技術）を用いて同定され得る。このような技術は、抗原特異的抗体、抗血清、および/またはT細胞株もしくはクローンと反応する能力について、ポリペプチドをスクリーニングすることを包含する。本明細書中で用いられる場合、抗血清および抗体は、これらが、抗

20

30

【0041】

1つの好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドの免疫原性部分は、（例えば、ELISAおよび/またはT細胞反応性アッセイにおいて）全長ポリペプチドの反応性よりも実質的に低くないレベルで、抗血清および/またはT細胞と反応する部分である。好ましくは、免疫原性部分の免疫原性活性のレベルは、全長ポリペプチドの免疫原性の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%、そして最も好ましくは90%より。いくつかの例において、対応する全長ポリペプチドよりも大きい免疫原性活性のレベルを有する（例えば、約100%または150%もしくはそれより大きい免疫原性活性を有する）好ましい免疫原性部分が同定される。

40

【0042】

特定の他の実施形態において、例示的な免疫原性部分は、N末端リーダー配列および/または膜貫通ドメインが欠失されたペプチドを含み得る。他の例示的な免疫原性部分は、成熟タンパク質に対して小さなN末端および/またはC末端の欠失（例えば、1~30アミノ酸、好ましくは5~15アミノ酸）を含む。

【0043】

別の実施形態において、本発明のポリペプチド組成物また、T細胞および/または本発明

50

のポリペプチド（特に、本明細書中に開示されたアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそれらの免疫原性フラグメントもしくは改変体）に対して生成された抗体と免疫学的に反応性である1つ以上のポリペプチドを含み得る。

【0044】

本発明の別の実施形態において、本明細書中に記載される1つ以上のポリペプチドによりコードされる1つ以上のポリペプチドと免疫学的に反応性であるT細胞および/または抗体を惹起し得る、1つ以上のポリペプチドを含むポリペプチド、または本明細書中に開示されるポリヌクレオチド配列に含まれる連続的な核酸配列、またはそれらの免疫原性フラグメントもしくは改変体、あるいは中程度から高度のストリンジェンシーの条件下で1つ以上のこれらの配列にハイブリダイズする1つ以上の核酸配列が提供される。

10

【0045】

別の局面において、本発明は、本明細書中に示されるポリペプチド組成物（例えば、配列番号2235に示されるポリペプチド、または配列番号1~2234の配列に示されるポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド）の少なくとも約5、10、15、20、25、50、または100連続するアミノ酸またはそれ以上（全ての中間の長さを含む）を含むポリペプチドフラグメントを提供する。

【0046】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるポリペプチド組成物の改変体を提供する。一般的に本発明により包含されるポリペプチド改変体は、代表的に、本明細書中に示されるポリペプチド配列に対して、その長さに沿って、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれ以上の同一性（以下に記載するように決定された）を示す。

20

【0047】

1つの好ましい実施形態において、本発明により提供されるポリペプチドフラグメントおよび改変体は、本明細書中に詳細に示される全長ポリペプチドと反応する抗体および/またはT細胞と免疫学的に反応性である。

【0048】

別の好ましい実施形態において、本発明により提供されるポリペプチドフラグメントおよび改変体は、本明細書中に詳細に示される全長ポリペプチド配列により示される免疫原性活性のレベルの少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%、そして最も好ましくは少なくとも約90%またはそれ以上の免疫原性活性のレベルを示す。

30

【0049】

ポリペプチド「改変体」は、本明細書中でこの用語が使用される場合、代表的に、本明細書中で詳細に開示されるポリペプチドと1つ以上の置換、欠失、付加、および/または挿入において異なるポリペプチドである。このような改変体は、天然に生じるか、または例えば、本発明の1つ以上の上記のポリペプチド配列を改変し、そして本明細書中に記載されるようなそれらの免疫学的活性を評価することにより、ならびに/または当該分野で周知の多くの技術のいずれかを用いて、合成的に作製され得る。

【0050】

例えば、本発明のポリペプチドの特定の例示的な改変体として、1つ以上の部分（例えば、N末端リーダー配列または膜貫通ドメイン）が除去された改変体が挙げられる。他の例示的な改変体として、小さな部分（例えば、1~30アミノ酸、好ましくは5~15アミノ酸）が成熟タンパク質のN末端および/またはC末端から除去された改変体が挙げられる。

40

【0051】

多くの例において、改変体は、保存的置換を含む。「保存的置換」は、アミノ酸が類似の特性を有する別のアミノ酸で置換され、その結果、ペプチド化学の当業者がポリペプチドの二次構造および疎水的性質が実質的に変化していないことを期待するような置換である。上記のように、改変は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造において

50

なされ得、そしてなお所望の特性（例えば、免疫原性特性）を有する改変体または誘導体ポリペプチドをコードする機能的分子を獲得し得る。本発明のポリペプチドの等価物を（または本発明のポリペプチドの改善された免疫原性の改変体もしくは部分さえも）作製するようポリペプチドのアミノ酸配列が変更されることが所望される場合、当業者は、代表的に、表1に基づくコードDNA配列の1つ以上のコドンを変更する。

【0052】

例えば、特定のアミノ酸は、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位のような構造を有するタンパク質構造中の他のアミノ酸に、感知可能な相互作用的結合能の損失なしで、置換され得る。タンパク質の相互作用的な能力および性質がタンパク質の生物学的機能的活性を規定するので、特定のアミノ酸配列置換は、タンパク質配列、および当然ながら、その根底にあるDNAコード配列においてなされ得、そしてそれにも関わらず、同様の特性を有するタンパク質が入手される。従って、種々の変化が、ペプチドの生物学的有用性または活性の感知可能な損失を伴わずに、開示された組成物のペプチド配列またはそのペプチドをコードする対応するDNA配列においてなされ得ることが意図される。

10

【0053】

【表1】

表1

| アミノ酸 | | コドン | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| アラニン | Ala | A | GCA | GCC | GCG | GCU | | |
| システイン | Cys | C | UGC | UGU | | | | |
| アスパラギン酸 | Asp | D | GAC | GAU | | | | |
| グルタミン酸 | Glu | E | GAA | GAG | | | | |
| フェニルアラニン | Phe | F | UUC | UUU | | | | |
| グリシン | Gly | G | GGA | GGC | GGG | GGU | | |
| ヒスチジン | His | H | CAC | CAU | | | | |
| イソロイシン | Ile | I | AUA | AUC | AUU | | | |
| リジン | Lys | K | AAA | AAG | | | | |
| ロイシン | Leu | L | UUA | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU |
| メチオニン | Met | M | AUG | | | | | |
| アスパラギン | Asn | N | AAC | AAU | | | | |
| プロリン | Pro | P | CCA | CCC | CCG | CCU | | |
| グルタミン | Gln | Q | CAA | CAG | | | | |
| アルギニン | Arg | R | AGA | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU |
| セリン | Ser | S | AGC | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU |
| スレオニン | Thr | T | ACA | ACC | ACG | ACU | | |
| バリン | Val | V | GUA | GUC | GUG | GUU | | |
| トリプトファン | Trp | W | UGG | | | | | |
| チロシン | Tyr | Y | UAC | UAU | | | | |

20

30

40

このような変化を作製する際に、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮され得る。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与する際の疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、一般的に当該分野において理解されている（KyteおよびDoolittle、1982、本明細書中に参考として援用される）。アミノ酸の相対的な疎水性親水性の性質は、得られるタンパク質の二次構造に寄与し、これが次に、他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など）とのタンパク質の相互作用を規定することが受け入れられている。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて疎水性親水性指

50

標を割り当てられている (K y t e および D o o l i t t l e、1982)。これらの値は以下である：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5)。

【0054】

特定のアミノ酸が類似の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換され得、そしてなお類似の生物学的活性を有するタンパク質を生じる (すなわち、生物学的に機能的に等価なタンパク質をなお入手する) ことが、当該分野において公知である。このような変化を作製する際に、その疎水性親水性指標が ±2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、その疎水性親水性指標が ±1 以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そしてその疎水性親水性指標が ±0.5 以内であるアミノ酸の置換がなおより特に好ましい。同様なアミノ酸の置換が、親水性に基づいて有効になされ得ることもまた、当該分野で理解されている。米国特許第 4,554,101 号 (その全体が本明細書中に参考として詳細に援用される) は、そのタンパク質の最大局所的平均親水性が、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるので、そのタンパク質の生物学的特性と相関することを言及している。

【0055】

米国特許第 4,554,101 号に詳述されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0 ± 1)；グルタミン酸 (+3.0 ± 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 ± 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；トリプトファン (-3.4)。アミノ酸は、類似の親水性の値を有する別のアミノ酸に置換され得、そしてなお、生物学的な等価物 (特に、免疫学的に等価なタンパク質) を得ることが理解される。このような変化において、その親水性値が ±2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、その親水性値が ±1 以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そしてその親水性値が ±0.5 以内であるアミノ酸の置換がなおより特に好ましい。

【0056】

上記で概説したように、従って、アミノ酸置換は、一般的にアミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性 (例えば、その疎水性、親水性、電荷、大きさ、など) に基づく。前述の種々の特徴を考慮する典型的な置換は当業者に周知であり、そして以下を含む：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン。

【0057】

さらに、任意のポリヌクレオチドが、インピボでの安定性を増加させるためにさらに改変され得る。可能性のある改変として以下が挙げられるがこれらに限定されない：5' 末端および/または 3' 末端での隣接配列の付加；骨格におけるホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオエートまたは 2'-O-メチルの使用；ならびに/あるいは従来とは異なる塩基 (例えば、イノシン、キューオシン、およびワイプトシン、ならびにアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンのアセチル、メチル、チオ、および他の修飾形態) の含有。

【0058】

アミノ酸置換はさらに、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性特性の類似性に基づいて作製され得る。例えば、負に荷電したアミノ酸としては、ア

10

20

30

40

50

スパラギン酸およびグルタミン酸；正に荷電したアミノ酸としては、リジンおよびアルギニン；そして類似の親水性値を有する非荷電性の極性ヘッド基を有するアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、スレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。保存的变化を示し得るアミノ酸の他のグループとしては、(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2) cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；および(5) phe、tyr、trp、hisが挙げられる。改変体はまた、またはあるいは、非保存的变化を含み得る。好ましい実施形態において、改変体ポリペプチドは、5アミノ酸またはそれより少ないアミノ酸の置換、欠失または付加によって、ネイティブの配列とは異なる。改変体はまた(またはあるいは)、例えば、ポリペプチドの免疫原性、二次構造および疎水性親水性特性に対する最小の影響を有するアミノ酸の欠失または付加によって、改変され得る。

10

【0059】

上記のように、ポリペプチドは、タンパク質のN末端にシグナル(または、リーダー)配列を含み得、これは、翻訳と同時に、または翻訳後に、そのタンパク質の転移を指向する。このポリペプチドはまた、このポリペプチドの合成、精製または同定を容易にするために、またはこのポリペプチドの固体支持体への結合を増強するために、リンカー配列または他の配列(例えば、ポリHis)に結合体化され得る。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域に結合体化され得る。

20

【0060】

ポリペプチド配列が比較される場合、以下に記載されるように最大的一致で整列するとき、2つの配列中のアミノ酸の配列が同じである場合、2つの配列は、「同一」といわれる。2つの配列間の比較は、代表的には、比較ウィンドウによって配列を比較して、配列類似性の局所的領域を同定および比較することによって行われる。本明細書中で使用される「比較ウィンドウ」とは、少なくとも約20、通常は30~約75、40~約50の連続する位置のセグメントをいう。ここで、配列は、2つの配列が最適に整列された後、同じ数の連続する位置の参照配列と比較され得る。

【0061】

比較のための配列の最適な整列は、生命情報科学ソフトウェアのLasergeneスタートにおけるMegalignプログラム(DNA STAR, Inc., Madison, WI)を使用して、デフォルトパラメータを用いて行われ得る。このプログラムは、以下の参考文献に記載のいくつかの整列スキームを統合する: Dayhoff, M. O. (編) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC 第5巻, 補遺3, 345~358頁におけるDayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships.; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis 626~645頁 Methods in Enzymology 第183巻, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. および Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5: 151-153; Myers, E. W. および Muller W. (1988) CABIOS 4: 11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11: 105; Saitou, N. Nei, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P. H. A. および Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. および Lipman, D. J.

30

40

50

(1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730。

【0062】

あるいは、比較のための配列の最適な整列は、SmithおよびWaterman(1981) Add. Appl. Math 2:482の部分的同一性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch(1970) J. Mol. Biol. 48:443の同一性整列アルゴリズムによって、PearsonおよびLipman(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化した実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group(GCG), 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA)によって、または検査によって行われ得る。 10

【0063】

配列同一性および配列類似性の割合を決定するために適切なアルゴリズムの1つの好ましい例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれAltschulら(1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschulら(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載される。BLASTおよびBLAST2.0は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドについての配列同一性の割合を決定するために、例えば、本明細書中に記載のパラメータを使用して使用され得る。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通して公に利用可能である。アミノ酸配列について、スコアリングマトリクスは、累積スコアを算出するために使用され得る。各指示におけるワードヒットの拡大は、以下の場合に停止する：累積整列スコアが、その最大到達値から量Xだけ低下した場合；累積スコアが、1以上の負のスコアリングの残基整列の累積に起因してゼロ以下になった場合；またはいずれかの配列の末端に到達した場合。このBLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、整列の感度および速度を決定する。 20

【0064】

好ましい1つのアプローチにおいて、「配列同一性のパーセンテージ」は、少なくとも20位置の比較ウィンドウにわたる2つの最適に整列した配列を比較することによって決定され、ここで比較ウィンドウ中のポリペプチド配列の部分は、参照配列(これは、付加または欠失を含まない)と比較して、2つの配列の最適な整列について20パーセント以下、通常は5~15パーセント、または10~12パーセントの付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含み得る。このパーセンテージは、両方の配列で同一のアミノ酸残基が生じる位置の数を決定して一致する位置の数を得、この一致する位置の数を参照配列における位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で除算し、そしてこの結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。 30

【0065】

他の例示的实施形態において、ポリペプチドは、参照ポリペプチドとして働くヒトポリペプチド(自己抗原とも名付けられる)に対して、上記のように、実質的な配列同一性を有するポリペプチドを含む異種ポリペプチドであり得るが、その異種ポリペプチドは、異なる非ヒト種から誘導される。当業者は、「自己」抗原が、しばしば、CD8+およびCD4+Tリンパ球応答の劣った刺激因子であり、従って腫瘍ポリペプチドに対する効果的な免疫治療戦略には、特定の自己腫瘍ポリペプチドに対する免疫寛容に打ち勝つための方法の開発が必要であることを認識する。例えば、異種(非ヒト)起源のプロスタゼ(prostase)タンパク質で免疫されたヒトは、ヒトタンパク質対応物(例えば、ヒト腫瘍細胞に存在するヒトプロスタゼ腫瘍タンパク質)に対する免疫応答をマウントし(高め)得る。従って、本発明は、本明細書に示される腫瘍タンパク質(例えば、配列番号2235に示されるポリペプチド、または配列番号1~2234に示されるポリヌ 40 50

クレオチド配列によりコードされるポリペプチド)の異種形態を精製するための方法を提供する。

【0066】

従って、本発明の1つの局面は、本明細書に記載されるポリペプチド組成物の異種改変体を提供する。本発明によって一般に包含されるこのような異種改変体は、代表的に、本明細書中に示されるポリペプチド配列に対して、その長さに沿って、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれ以上の同一性を示す。

【0067】

さらに詳細には、本発明は、本発明の腫瘍ポリペプチドに対する免疫応答を誘導するための、本明細書に示されたヒトポリペプチドの異種形態として用いられ得るマウス、ラット、サル、ブタ、および他の非ヒトのポリペプチドに関する。 10

【0068】

他の例示的实施形態において、ポリペプチドは、本明細書中に記載の複数のポリペプチドを含むか、または本明細書に記載の少なくとも1つのポリペプチドおよび関連しない配列(例えば、公知の腫瘍タンパク質)を含む融合ポリペプチドであり得る。例えば、融合パートナーは、Tヘルパーエピトープ、好ましくはヒトによって認識されるTヘルパーエピトープを提供する際に補助し得るか(免疫学的融合パートナー)、またはネイティブの組換えタンパク質より高い収量でタンパク質を発現する際に補助し得る(発現エンハンサー)。特定の好ましい融合パートナーは、免疫学的融合パートナーおよび発現増強融合パートナーの両方である。他の融合パートナーは、ポリペプチドの溶解性を増加するように、またはポリペプチドが所望の細胞内コンパートメントに標的化されることを可能にするように選択され得る。なおさらなる融合パートナーとしては、親和性タグ(これは、ポリペプチドの精製を容易にする)が挙げられる。 20

【0069】

融合ポリペプチドは、一般に、標準的な技術(化学的結合体化を含む)を使用して調製され得る。好ましくは、融合ポリペプチドは、発現系において、組換えポリペプチドとして発現され、非融合ポリペプチドと比較して、増加したレベルの産生を可能にする。手短に言うと、このポリペプチド成分をコードするDNA配列を、別々に組立て得、そして適切な発現ベクターに連結し得る。1つのポリペプチド成分をコードするDNA配列の3'末端は、ペプチドリンカーを用いてまたは用いずに、第2のポリペプチド成分をコードするDNA配列の5'末端に、これらの配列のリーディングフレームが同位相にあるように連結される。このことが、両方の成分ポリペプチドの生物学的活性を保持する単一の融合ポリペプチドへの翻訳を可能にする。 30

【0070】

ペプチドリンカー配列は、各ポリペプチドがその二次構造および三次構造へと折り畳まれるのを保証するために十分な距離で第一および第二のポリペプチド成分を隔てるために用いられ得る。このようなペプチドリンカー配列は、当該分野で周知の標準的な技術を用いて融合タンパク質中に組み込まれる。適切なペプチドリンカー配列は、以下の因子に基づいて選択され得る：(1)伸長した可変コンホメーションを取る能力；(2)第一および第二のポリペプチド上の機能的なエピトープと相互作用し得る二次構造を取ることができないこと；ならびに(3)ポリペプチドの機能的なエピトープと反応し得る疎水性または荷電した残基が無いこと。好ましいペプチドリンカー配列は、Gly、AsnおよびSer残基を含む。ThrおよびAlaのような中性に近い他のアミノ酸もまた、リンカー配列に用いられ得る。リンカーとして有用に用いられ得るアミノ酸配列としては、Marateaら、Gene 40:39-46、1985；Murphyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262、1986；米国特許第4,935,233号および米国特許第4,751,180号に開示されるアミノ酸配列が挙げられる。リンカー配列は、一般的に1から約50アミノ酸長であり得る。リンカー配列は、第一および第二のポリペプチドが、機能的ドメインを分離するため、および立体的な 40 50

干渉を防ぐために用いられ得る非必須N末端アミノ酸領域を有する場合、必要とされない。

【0071】

連結されたDNA配列は、適切な転写または翻訳調節エレメントに作動可能に連結される。DNAの発現を担う調節エレメントは、第一のポリペプチドをコードするDNA配列の5'側にのみ位置する。同様に、翻訳および転写終結シグナルを終了するために必要とされる終止コドンは、第二のポリペプチドをコードするDNA配列の3'側にのみ存在する。

【0072】

融合ポリペプチドは、関連しない免疫原性タンパク質（例えば、リコール（recall）応答を惹起し得る免疫原性タンパク質）と共に、本明細書中に記載されるようなポリペプチドを含み得る。このようなタンパク質の例としては、破傷風タンパク質、結核タンパク質および肝炎タンパク質が挙げられる（例えば、Stout et al., *New Engl. J. Med.*, 336: 86-91 (1997) を参照のこと）。

【0073】

1つの好ましい実施形態において、免疫学的融合パートナーは、*Mycobacterium tuberculosis* 由来のRa12フラグメントのように *Mycobacterium* sp. 由来である。Ra12組成物、ならびに異種ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列の発現および/または免疫原性を増強する際にRa12を使用するための方法は、米国特許出願60/158,585（この開示は、本明細書中でその全体が参考として援用される）に記載されている。簡単には、Ra12は、*Mycobacterium tuberculosis* MTB32A核酸のサブ配列であるポリヌクレオチド領域をいう。MTB32Aは、*M. tuberculosis* の毒性菌株および無毒性菌株の遺伝子によってコードされる分子量32KDのセリンプロテアーゼである。MTB32Aのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が、記載されている（例えば、米国特許出願60/158,585；また、Skeiky et al., *Infection and Immunity*, (1999) 67: 3998-4007も参照のこと。これらは、本明細書中で参考として援用される）。MTB32Aコード配列のC末端フラグメントは高いレベルで発現し、精製プロセス全体にわたって可溶性ポリペプチドとして残存する。さらに、Ra12は、これが融合される、異種免疫原性ポリペプチドの免疫原性を増強し得る。1つの好ましいRa12融合ポリペプチドは、MTB32Aのアミノ酸残基192~323に対応する14KDのC末端フラグメントを含む。他の好ましいRa12ポリヌクレオチドは、一般的に、Ra12ポリペプチドの一部をコードする少なくとも約15個の連続するヌクレオチド、少なくとも約30個のヌクレオチド、少なくとも60個のヌクレオチド、少なくとも約100個のヌクレオチド、少なくとも約200個のヌクレオチド、または少なくとも約300個のヌクレオチドを含む。Ra12ポリヌクレオチドは、ネイティブな配列（すなわち、Ra12ポリペプチドまたはその一部をコードする内因性配列）を含んでもよいし、このような配列の改変体を含んでもよい。Ra12ポリヌクレオチド改変体は、1以上の置換、付加、欠失および/または挿入を含み得、その結果、コードされた融合ポリペプチドの生物学的活性が、ネイティブなRa12ポリペプチドを含む融合ポリペプチドと比較して、実質的に減少していない。好ましくは、改変体は、ネイティブなRa12ポリペプチドまたはその一部をコードするポリヌクレオチド配列に、少なくとも約70%の同一性、より好ましくは少なくとも約80%の同一性、そして最も好ましくは少なくとも約90%の同一性を示す。

【0074】

好ましい他の実施形態において、免疫学的融合パートナーは、グラム陰性の細菌 *Haemophilus influenzae* Bの表面タンパク質である、プロテインD（WO 91/18926）に由来する。好ましくは、プロテインD誘導体は、このタンパク質のほぼ3分の1（例えば、最初のN末端100~110アミノ酸）を含み、そしてプロテインD誘導体は、脂質化（lipidated）され得る。特定の好ましい実施形態にお

いて、リボプロテインD融合パートナーの最初の109残基は、さらなる外因性T細胞エピトープを有するポリペプチドを提供するように、そしてE. coli中の発現レベルを増加するように、N末端に含まれる(従って、発現エンハンサーとして機能する)。脂質テールは、抗原提示細胞への抗原の最適な提示を保証する。他の融合パートナーは、インフルエンザウイルス由来の非構造的タンパク質、NS1(血球凝集素)を含む。代表的に、N末端の81アミノ酸が用いられるが、Tヘルパーエピトープを含む異なるフラグメントが使用され得る。

【0075】

別の実施形態において、免疫学的融合パートナーは、LYTAとして公知のタンパク質、またはその部分(好ましくはC末端部分)である。LYTAは、アミダーゼLYTA(LytA遺伝子によりコードされる; Gene 43:265~292, 1986)として公知のN-アセチル-L-アラニンアミダーゼを合成するStreptococcus pneumoniae由来である。LYTAは、ペプチドグリカン骨格中の特定の結合を特異的に分解する自己溶解素である。LYTAタンパク質のC末端ドメインは、コリンまたはいくつかのコリンアナログ(例えば、DEAE)に対する親和性を担う。この性質は、融合タンパク質の発現のために有用なE. coli C-LYTA発現プラスミドの開発のために利用されてきた。アミノ末端でC-LYTAフラグメントを含むハイブリッドタンパク質の精製が、記載されている(Biotechnology 10:795~798, 1992を参照のこと)。好ましい実施形態において、LYTAの反復部分は、融合ポリペプチドに組み込まれ得る。反復部分は、残基178で開始するC末端領域中に見出される。特に好ましい反復部分は、残基188~305を組み込む。

10

20

【0076】

なお別の例示的な実施形態は、融合ポリペプチド、およびそれらをコードするポリヌクレオチドを含み、ここでこの融合パートナーは、米国特許第5,633,234号に記載のようにポリペプチドをエンドソーム/リソソームコンパートメントへ指向させ得る標的シグナルを含む。本発明の免疫原性ポリペプチドは、この標的シグナルと融合する場合、より効率的にMHCクラスII分子と結合し、これによってこのポリペプチドに特異的なCD4⁺T細胞のインビボでの増強された刺激が提供される。

【0077】

本発明のポリペプチドは、周知の種々の合成技術および/または組換え技術のいずれかを使用して調製される。これらの技術の後者を以下でさらに記載する。一般的に約150アミノ酸よりも少ないポリペプチド、部分および他の改変体は、当業者に周知の技術を使用して、合成手段により作製され得る。例示的な1つの例において、このようなポリペプチドは、市販の固相技術のいずれか(例えば、Merrifield固相合成方法)を使用して合成され、ここでアミノ酸は、成長しているアミノ酸鎖に連続的に付加される。Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963を参照のこと。ポリペプチドの自動化された合成のための機器が、Perkin Elmer/Applied Biosystems Division(Foster City, CA)などの供給業者から市販されており、そして製造者の指示に従って操作され得る。

30

40

【0078】

一般に、本発明のポリペプチド組成物(融合ポリペプチドを含む)が単離される。「単離された」ポリペプチドは、その元来の環境から取り出されたものである。例えば、天然に存在するタンパク質またはポリペプチドは、それが天然の系中で共存する物質のいくつかまたは全てから分離されている場合、単離されている。好ましくは、このようなポリペプチドはまた、精製され、例えば、少なくとも約90%純粋、より好ましくは少なくとも約95%純粋、そして最も好ましくは少なくとも約99%純粋である。

【0079】

(ポリヌクレオチド組成物)

他の局面において、本発明は、ポリヌクレオチド組成物を提供する。用語「DNA」およ

50

び「ポリヌクレオチド」は、本明細書中で実質的に交換可能に使用され、特定の種の全ゲノムDNAを含まない単離されたDNA分子をいう。本明細書中で使用される場合、「単離された」は、ポリヌクレオチドが、他のコード配列から実質的に分離されており、そしてDNA分子が、無関係のコードDNAの大部分（例えば、大きな染色体フラグメントまたは他の機能的遺伝子またはポリペプチドコード領域）を含まないことを意味する。当然のことながら、これは、もともと単離されたDNA分子をいい、後で人工的にセグメントに付加された遺伝子またはコード領域を除外しない。

【0080】

当業者に理解されるように、本発明のポリヌクレオチド組成物は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現するか、または発現し得るように適応されたゲノム配列、ゲノム外配列およびプラスミドにコードされる配列、ならびにより小さな操作された遺伝子セグメントを含み得る。このようなセグメントは、自然に単離され得るか、または人の手によって合成的に改変され得る。

10

【0081】

当業者に認識されるように、本発明のポリヌクレオチドは、一本鎖（コードもしくはアンチセンス）または二本鎖であり得、そしてDNA分子（ゲノム、cDNAもしくは合成）またはRNA分子であり得る。RNA分子は、hnRNA分子（これはイントロンを含み、そしてDNA分子に1対1の様式で対応する）、およびmRNA分子（これは、イントロンを含まない）を含み得る。さらなるコード配列または非コード配列は、本発明のポリヌクレオチド内に存在し得るがその必要はなく、そしてポリヌクレオチドは、他の分子および/または支持材料に連結され得るがその必要はない。

20

【0082】

ポリヌクレオチドは、ネイティブの配列（すなわち、本発明のポリペプチド/タンパク質、またはその部分をコードする内因性配列）を含み得るか、あるいはこのような配列の改変体または誘導体、そして好ましくは免疫原性改変体または誘導体をコードする配列を含み得る。

【0083】

従って、本発明の別の局面に従い、配列番号1~2234のいずれか1つに示されるポリヌクレオチド配列、配列番号1~2234のいずれか1つに示されるポリヌクレオチド配列の相補体、ならびに配列番号1~2234のいずれか1つに示されるポリヌクレオチド配列の縮重改変体のうちいくつかまたは全てを含むポリヌクレオチド組成物が提供される。特定の好ましい実施形態において、本明細書中に示されるポリヌクレオチド配列は、上記のような免疫原性ポリペプチドをコードする。

30

【0084】

他の関連する実施形態において、本発明は、本明細書中で配列番号1~2234に開示される配列に実質的な同一性を有するポリヌクレオチド改変体を提供する。例えば、これらは、本明細書中で記載の方法（例えば、以下に記載のような標準的なパラメーターを使用するBLAST分析）を使用して本発明のポリヌクレオチド配列と比較して、少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%より高い配列同一性を含む。当業者は、これらの値が、コドンの縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレームの位置付けなどを考慮することによって、2つのヌクレオチド配列にコードされるタンパク質の対応する同一性を決定するように、適切に調整され得ることを理解する。

40

【0085】

代表的には、ポリヌクレオチド改変体は、1つ以上の置換、付加、欠失および/または挿入を含み、好ましくは、その結果、改変体ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの免疫原性が、本明細書中に具体的に示されるポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドに対して実質的に減少されない。用語「改変体」はまた、異種起源の相同遺伝子を包含することが理解されるべきである。

【0086】

50

さらなる実施形態において、本発明は、本明細書中に開示される配列の1つ以上に同一であるかまたは相補的な配列の種々の長さの連続したストレッチを含むか、またはこれらからなるポリヌクレオチドフラグメントを提供する。例えば、本明細書中に開示される配列の1つ以上の、少なくとも約10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500または1000以上連続したヌクレオチド、ならびにその間の全ての中間の長さの連続したヌクレオチドを含むか、あるいはこれらからなるポリヌクレオチドが、本発明によって提供される。この状況において、「中間の長さ」が、示された値の間の任意の長さ(例えば、16、17、18、19など; 21、22、23など; 30、31、32など; 50、51、52、53など; 100、101、102、103など; 150、151、152、153など; 200~500; 500~1,000などの間の全ての整数を含む)を意味することが容易に理解される。本明細書中に記載されるポリヌクレオチドは、天然の配列には見出されないヌクレオチドの付加によって、片方または両方の末端で伸長され得る。さらなる配列は、開示された配列のいずれかの末端で、または開示された配列の両方の末端で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチドからなり得る。

10

【0087】

本発明の別の実施形態において、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントまたはその相補的な配列に対して、中程度~高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチド組成物が提供される。ハイブリダイゼーション技術は、分子生物学の当該分野において周知である。例示の目的であるが、他のポリヌクレオチドと本発明のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するために適切な中程度にストリンジェントな条件は、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 、 1.0mM EDTA (pH 8.0)の溶液中の事前洗浄; $50 \sim 60$ 、 $5 \times \text{SSC}$ での、一晚のハイブリダイゼーション; 続いて、 $0.1\% \text{SDS}$ を含有する $2 \times$ 、 $0.5 \times$ および $0.2 \times \text{SSC}$ のそれぞれを用いた、 65 で20分間の2回の洗浄を含む。当業者は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが、例えば、ハイブリダイゼーション溶液の塩含量および/またはハイブリダイゼーションが実施される温度を変更することによって、容易に操作され得ることを理解する。例えば、別の実施形態において、適切な高いストリンジェントのハイブリダイゼーション条件としては、ハイブリダイゼーションの温度が、例えば、 $60 \sim 65$ または $65 \sim 70$ に増大される点を除いて、上記の条件が挙げられる。

20

30

【0088】

特定の好ましい実施形態において、上記のポリヌクレオチド(例えば、ポリヌクレオチド改変体、フラグメント、およびハイブリダイズする配列)は、本明細書中に具体的に示されるポリペプチド配列と免疫学的に交差反応するポリペプチドをコードする。他の好ましい実施形態において、このようなポリヌクレオチドは、本明細書中に具体的に示されるポリペプチド配列の免疫原性活性の、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%、そしてより好ましくは少なくとも約90%の免疫原性活性レベルを有するポリペプチドをコードする。

40

【0089】

本発明のポリヌクレオチド、またはそのフラグメントは、そのコード配列自体の長さに関わらず、他のDNA配列(例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、マルチクロニング部位、他のコードセグメントなど)と組み合わせられ得、その結果、その全体の長さは、相当変化し得る。従って、ほとんどいずれの長さの核酸フラグメントをも使用し得ることが意図され、その全長は、好ましくは意図した組換えDNAプロトコルにおける調製および使用の容易さによって制限される。例えば、約10,000、約5000、約3000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、約50塩基対長など(全ての中間の長さを含む)の全長を有する例示的なポリヌクレオチドセグメントが、本発明の多くの実行において有用であることが意図される。

50

【0090】

ポリヌクレオチド配列を比較する場合、2つの配列におけるヌクレオチドの配列が、以下に記載されるように最大一致について整列されるのと同じ場合に、2つの配列が「同一」であるといわれる。2つの配列の間の比較は、代表的には、配列類似性の局部領域を同定および比較するために、比較ウィンドウにわたって配列を比較することによって行われる。本明細書中で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20、通常は30～約75、40～約50連続した位置のセグメントをいい、ここで、2つの配列が最適に整列された後に、配列は、連続した位置の同じ数の参照配列と比較され得る。

【0091】

比較のための配列の最適な整列は、生命情報科学ソフトウェアのLasergeneシリーズにおけるMegalignプログラム(DNA STAR, Inc., Madison, WI)を使用して、デフォルトパラメータを用いて行われ得る。このプログラムは、以下の参考文献に記載のいくつかの整列スキームを統合する: Dayhoff, M. O. (編) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, 補遺3, 345-358頁におけるDayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships.; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis 626-645頁 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. および Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5: 151-153; Myers, E. W. および Muller W. (1988) CABIOS 4: 11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11: 105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P. H. A. および Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. および Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80: 726-730.

【0092】

あるいは、比較のための配列の最適な整列は、SmithおよびWaterman(1981) Add. APL Math 2: 482の局部同定アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch(1970) J. Mol. Biol. 48: 443の同一性整列アルゴリズムによって、PearsonおよびLipman(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化した実行(Wisconsin Genetic Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA)によって、または検査によって行われ得る。

【0093】

配列同一性および配列類似性の割合を決定するために適切なアルゴリズムの1つの好ましい例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Altschulら(1977) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402およびAltschulら(1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410に記載される。BLASTおよびBLAST2.0は、本発明のポリヌクレオチドについての配列同一性の割合を決定するために、例えば、本明細書中に記載のパラメータを用

いて使用され得る。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通して公に利用可能である。1つの例示的な例において、累積スコアは、ヌクレオチド配列について、パラメーターM（一致する残基の対についての報酬スコア（reward score）；常に > 0 ）およびN（ミスマッチ残基についてのペナルティスコア；常に < 0 ）を使用して算出され得る。各指示におけるワードヒットの拡大は、以下の場合に停止する：累積整列スコアが、その最大到達値から量Xだけ低下した場合；累積スコアが、1以上の負のスコアの残基整列の累積に起因してゼロ以下になった場合；またはいずれかの配列の末端に到達した場合。このBLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、整列の感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列について）は、ワード長さ（W）11、および期待値（E）10をデフォルトとして、そしてBLOSUM62スコアリングマトリックス（HenikoffおよびHenikoff（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照のこと）アラインメントは、（B）50、期待値（E）10、M = 5、N = -4、および両方の鎖の比較を使用する。

10

20

30

40

50

【0094】

好ましくは、「配列同一性のパーセンテージ」は、少なくとも20の位置の比較ウィンドウにわたる2つの最適に整列した配列を比較することによって決定され、ここで比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列の一部は、参照配列（これは、付加または欠失を含まない）と比較して、2つの配列の最適な整列について20パーセント以下、通常は5～15パーセント、または10～12パーセントの付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。このパーセンテージは、両方の配列で同一の核酸塩基が生じる位置の数を決定して一致する位置の数を得、この一致する位置の数を参照配列中の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除算し、そしてこの結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。

【0095】

遺伝コードの縮重の結果として、本明細書中に記載されるようなポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列が存在することが、当業者に理解される。これらのポリヌクレオチドのうちいくつかは、任意のネイティブな遺伝子のヌクレオチド配列に対して最小の相同性を有する。それにもかかわらず、コドンの用法における差異に起因して変化するポリヌクレオチドは、本発明によって具体的に意図される。さらに、本明細書中に提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、1以上の変異（例えば、ヌクレオチドの欠失、付加および/または置換）の結果として変化する内因性遺伝子である。得られたmRNAおよびタンパク質は、変化した構造または機能を有し得るが、有する必要はない。対立遺伝子は、標準的な技術（例えば、ハイブリダイゼーション、増幅および/またはデータベース配列比較）を用いて、同定され得る。

【0096】

従って、本発明の別の実施形態において、変異誘発アプローチ（例えば、部位特異的変異誘発）は、本明細書中に記載のポリペプチドの免疫原性改変体および/または誘導体の調製のために使用される。このアプローチによって、ポリペプチド配列における特定の改変が、これらをコードする、基礎となるポリヌクレオチドの変異誘発を介してなされ得る。これらの技術は、例えば、ポリヌクレオチド中に1つ以上のヌクレオチド配列変化を導入することによって先の考慮の1つ以上を組み込む、配列改変体を調製および試験するための直接的なアプローチを提供する。

【0097】

部位特異的変異誘発は、所望の変異のDNA配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列ならびに十分な数の隣接ヌクレオチドの使用を介して変異体の生成を可能にし、相対する欠失連結部の両側に安定な二重鎖を形成するために、十分なサイズおよび配列複雑性のプライマー配列を提供する。変異は、ポリヌクレオチド自体の特性を改善するか、変更

するか、減少させるか、改変するか、さもなくば変化させるため、そして/またはコードされたポリペプチドの特性、活性、組成、安定性または一次配列を変更するために、選択されたポリヌクレオチド配列において使用され得る。

【0098】

本発明の特定の実施形態において、本発明者らは、コードされたポリペプチドの1つ以上の特性(例えば、ポリペプチドワクチンの免疫原性)を変更するために、開示されたポリヌクレオチド配列の変異誘発を意図する。部位特異的変異誘発の技術は、当該分野に周知であり、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの両方の改変体を作製するために広範に使用される。例えば、部位特異的変異誘発は、しばしば、DNA分子の特定部分を変更するために使用される。このような実施形態において、代表的に約14ヌクレオチド長~約25ヌクレオチド長程度の長さを含むプライマーが使用され、配列の連結部の両側にある、約5残基~約10残基が変更される。

10

【0099】

当業者によって理解されるように、部位特異的変異誘発技術は、しばしば、一本鎖形態および二本鎖形態の両方で存在するファージベクターを使用してきた。部位特異的変異誘発において有用である代表的なベクターとしては、M13ファージのようなベクターが挙げられる。これらのファージは、容易に商業的に入手可能であり、そしてそれらの使用は、一般的に当業者に周知である。二本鎖プラスミドもまた、目的の遺伝子をプラスミドからファージに転移する工程を除去する部位特異的変異誘発において慣用的に使用される。

【0100】

一般的に、本明細書に従う部位特異的変異誘発は、所望のペプチドをコードするDNA配列をその配列中に含む一本鎖ベクターを最初に入手する工程、またはこの配列を含む二本鎖ベクターの2本の鎖を融解して分ける工程によって実行される。所望の変異配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般的に、合成的に調製される。次いで、このプライマーは、一本鎖ベクターとともにアニーリングされ、そして変異を保有する鎖の合成を完了するために、DNA重合酵素(例えば、E. coliポリメラーゼI Klenowフラグメント)に供される。このようにヘテロ二重鎖が形成され、ここで一方の鎖が変異を有さないもとの配列をコードし、そして2つめの鎖は所望の変異を保有する。次いで、このヘテロ二重鎖ベクターは、適切な細胞(例えば、E. coli細胞)を形質転換するために使用され、そして、変異した配列配置を保有する組換えベクターを含むクローンが選択される。

20

30

【0101】

部位特異的変異誘発を使用する、選択されたペプチドコードDNAセグメントの配列改変体の調製は、潜在的に有用な種を産生する手段を提供し、そしてこれは、限定を意味するものではない。なぜなら、ペプチドの配列改変体およびそれらをコードするDNA配列を入手し得る他の方法が存在するからである。例えば、所望のペプチド配列をコードする組換えベクターは、変異誘発剤(例えば、ヒドロキシルアミン)で処理されて、配列改変体を入手し得る。これらの方法およびプロトコルに関する具体的な詳細は、Malloyら、1994; Segal、1976; ProkopおよびBajpai、1991; Kubby、1994; およびManiatisら、1982(各々がその目的のために本明細書中に参考として援用される)の教示において見出され得る。

40

【0102】

本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド特異的変異誘発手順」とは、テンプレート依存的プロセスおよびベクター媒介性増殖をいい、これは、その初期の濃度と比較して、特定の核酸分子の濃度の増加を生じるか、または検出可能なシグナルの濃度の増加(例えば、増幅)を生じる。本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド特異的変異誘発手順」は、プライマー分子のテンプレート依存的な伸長を含むプロセスをいうことが意図される。用語、テンプレート依存的プロセスとは、新規に合成された核酸の鎖の配列が、相補的塩基対形成の周知の規則によって指示されるRNA分子またはDNA分子の核酸合成をいう(例えば、Watson、1987を参照のこと)。代表的に

50

は、ベクター媒介性の方法論は、DNAまたはRNAベクターへの核酸フラグメントの導入、ベクターのクローン性増幅、および増幅した核酸フラグメントの回収を包含する。このような方法論の例は、その全体が具体的に参考として本明細書中に援用される、米国特許第4,237,224号によって提供される。

【0103】

本発明のポリペプチド改変体の生成のための別のアプローチにおいて、米国特許第5,837,458号に記載のような、再帰的な配列組換えが使用され得る。このアプローチにおいて、組換えおよびスクリーニングまたは選択の反復性のサイクルが実施されて、例えば、増強された免疫原性活性を有する本発明の個々のポリヌクレオチド改変体を「展開させる」。

10

【0104】

本発明の他の実施形態において、本明細書中に提供されるポリヌクレオチド配列は、核酸ハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして、有利に使用され得る。このように、本明細書中に開示される15ヌクレオチド長の連続配列と同じ配列か、またはこれに相補的な配列を有する、少なくとも約15ヌクレオチド長の連続配列の配列領域を含むかまたはこれらからなる核酸セグメントが特定の有用性を見出すことが、意図される。例えば、約20、30、40、50、100、200、500、1000（全ての中間的な長さのものを含む）およびまさに全長配列までの、より長い連続した同一配列または相補的な配列がまた、特定の実施形態において使用される。

【0105】

このような核酸プローブが目的の配列に特異的にハイブリダイズする能力は、所定のサンプル中の相補的配列の存在を検出する際にこれらが使用されることを可能にする。しかし、他の用途（例えば、変異種プライマーまたは他の遺伝的構築物の調製の際の使用のためのプライマーを調製するための配列情報の使用）がまた意図される。

20

【0106】

10~14、15~20、30、50、または100~200ヌクレオチド程度（同様に中間的な長さを含む）の連続したヌクレオチドストレッチからなる配列領域を有し、本明細書中に開示されるポリヌクレオチド配列に同一または相補的なポリヌクレオチド分子は、例えばサザンブロットングまたはノーザンブロットングにおける使用のためのハイブリダイゼーションプローブとして特に意図される。これは、遺伝子産物またはそのフラグメントの、多様な細胞型およびまた種々の細菌細胞の両方における分析を可能とする。フラグメントの全サイズ、ならびに相補的ストレッチのサイズは、究極的には、特定の核酸セグメントの意図される用途または適用に依存する。より小さなフラグメントは、一般にハイブリダイゼーション実施形態における用途を見出し、ここで連続した相補領域の長さが変化され得る（例えば、約15ヌクレオチドと約100ヌクレオチドとの間）が、検出を望む相補配列の長さに従って、より長い連続した相補ストレッチが使用され得る。

30

【0107】

約15~25ヌクレオチド長のハイブリダイゼーションプローブの使用は、安定で選択的の両方である二重鎖分子の形成を可能にする。しかし、15塩基長より長いストレッチの連続した相補配列を有する分子が、ハイブリッドの安定性および選択性を増加するために一般に好ましく、それによって、得られる特異的ハイブリッド分子の質および程度が改善される。15~25の連続したヌクレオチド、または望まれる場合にはより長い遺伝子相補的ストレッチを有する核酸分子を設計するのが一般には好ましい。

40

【0108】

ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に開示される配列のいずれかの、任意の部分から選択され得る。必要とされることの全ては、本明細書中に記載の配列、あるいはプローブまたはプライマーとしての利用を望む場合は、約15~25ヌクレオチド長から全長配列まで、および全長配列を含む配列の任意の連続した部分までを再検討することである。プローブおよびプライマー配列の選択は、種々の要因によって支配され得る。例えば、全配列の末端に向かってプライマーを使用することが望まれ得る。

50

【0109】

小さなポリヌクレオチドセグメントまたはフラグメントは、通常は自動オリゴヌクレオチド合成機を使用して行われるので、例えば化学的手段によってフラグメントを直接合成することによって、容易に調製され得る。また、フラグメントは、核酸複製技術（例えば、米国特許第4,683,202号（本明細書中に参考として援用される）のPCRTM技術）の適用によって、組換え産生のために選択配列を組換えベクターに導入することによって、および一般に分子生物学の分野の当業者に公知の他の組換えDNA技術によって、得られ得る。

【0110】

本発明のヌクレオチド配列は、目的の完全遺伝子または遺伝子フラグメントの相補的ストレッチを有する二重鎖分子を選択的に形成するその能力のために使用され得る。想定される適用に依存して、代表的には、標的配列に対するプローブの選択性の種々の程度を達成するために、ハイブリダイゼーションの種々の条件を使用することが望ましい。高い選択性を必要とする適用について、代表的には、ハイブリッドを形成するための比較的ストリンジентな条件（例えば、比較的低濃度の塩、および/または高温の条件（例えば、約50 ~ 約70 の温度で、約0.02 M ~ 約0.15 Mの塩の塩濃度によって提供されるような）を使用することが望ましい。このような選択条件は、存在する場合、プローブとテンプレートまたは標的鎖との間のミスマッチにわずかに許容性であり、そして関連する配列の単離のために特に適切である。

【0111】

当然のことながら、いくつかの適用（例えば、潜在的なテンプレートにハイブリダイズする変異体プライマー鎖を使用する、変異体の調製が望ましい場合）について、低ストリンジент（減少したストリンジエンシー）のハイブリダイゼーション条件は、ヘテロ二重鎖を形成するために代表的に必要とされる。これらの状況において、約20 ~ 約55 の温度範囲で約0.15 M ~ 約0.9 Mの塩の条件のような塩条件を使用することが望ましくあり得る。これによって、交差ハイブリダイズ種は、コントロールハイブリダイゼーションに関して、陽性ハイブリダイズシグナルとして容易に同定され得る。任意の場合において、ホルムアミド（これは、増加した温度と同じ様式で、ハイブリッド二重鎖を不安定化するように作用する）の増加した量の添加によって、条件がよりストリンジентになり得ることが一般に理解される。従って、ハイブリダイゼーション条件は、容易に操作され得、従って、一般に、所望の結果に依存する最良の方法である。

【0112】

本発明の別の実施形態に従って、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物が、提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質合成の効果的かつ標識化インヒビターであることが実証され、疾患が、疾患に寄与するタンパク質の合成を阻害することによって処置され得る治療的なアプローチを結果的に提供する。タンパク質合成を阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの効力は、よく確立されている。例えば、ポリガラクタウロナーゼ（polygalacturonase）の合成およびムスカリン2型アセチルコリンレセプターは、そのそれぞれのmRNA配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される（米国特許第5,739,119号および米国特許第5,759,829号）。さらに、アンチセンス阻害の例が、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子（MDG1）、ICAM-1、E-セレクチン、STK-1、線条体GABA_AレセプターおよびヒトEGFを用いて示されている（Jaskulskiら、Science 1988 Jun 10; 240(4858): 1544-6; VasanthakumarおよびAhmed、Cancer Commun. 1989; 1(4): 225-32; Perisら、Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15; 57(2)310-20; 米国特許第5,801,154号; 同第5,789,573号; 同第5,718,709号および同第5,610,288号）。種々の異常な細胞増殖（例えば、癌）を阻害しそして処置するために使用され得る、アンチセンス構築物もまた、記載されている（米国特許第5,747

10

20

30

40

50

、470号；同第5,591,317号および同第5,783,683号)。

【0113】

従って、特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるポリヌクレオチド配列に特異的に結合し得る任意の配列もしくはその相補体のすべてまたは一部を含む、オリゴヌクレオチド配列を提供する。1つの実施形態において、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、そのオリゴヌクレオチドは、RNAまたはその誘導体を含む。第3の実施形態において、そのオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート改変骨格を含む、改変DNAである。第4の実施形態において、そのオリゴヌクレオチド配列は、ペプチド核酸またはその誘導体を含む。各場合において、好ましい組成物は、本明細書中に開示されるポリヌクレオチドのうちの1つ以上の部分に相補的な、より好ましくは実質的に相補的な、そしてさらにより好ましくは完全に相補的な、配列領域を含む。所定の遺伝子配列に特異的なアンチセンス組成物の選択は、選択された標的配列の分析に基き、そして二次構造、 T_m 、結合エネルギー、および相対的安定性の決定に基く。アンチセンス組成物は、二量体、ヘアピン、または宿主細胞において標的mRNAへの特異的結合を減少または妨げる他の二次構造をそれらが形成できない相対的能力に基づいて選択され得る。mRNAの非常に好ましい標的領域は、AUG翻訳開始コドンの領域またはその付近の領域、およびmRNAの5'領域と実質的に相補的な配列である。これらの二次構造分析および標的部選択の考慮は、例えば、OLIGOプライマー分析ソフトウェアのv.4および/またはBLASTN 2.0.5アルゴリズムソフトウェア(Altschulら、Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402)を使用して実施され得る。

【0114】

短いペプチドベクター(MPG(27残基)と称する)を使用するアンチセンス送達法の使用もまた意図される。このMPGペプチドは、HIV gp41の融合配列由来の疎水性ドメインと、SV40 T抗原の核局在化配列由来の親水性ドメインとを含む(Morrisら、Nucleic Acids Res. 1997 Jul 15; 25(14):2730-6)。このMPGペプチドのいくつかの分子がアンチセンスオリゴヌクレオチドをコートし、そして比較的高効率(90%)で1時間未満で培養哺乳動物細胞へと送達され得ることが示された。さらに、MPGとの相互作用は、ヌクレアーゼに対するそのオリゴヌクレオチドの安定性および形質膜を横切る能力の両方を強力に増加させる。

【0115】

本発明の別の実施形態に従って、本明細書中に記載されるポリヌクレオチド組成物は、腫瘍細胞における腫瘍ポリヌクレオチドおよび本発明のタンパク質の発現を阻害するためのリボザイム分子の設計および調製に使用される。リボザイムは、部位特異的様式で核酸を切断するRNA-タンパク質複合体である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を保有する特定の触媒ドメインを有する(KimおよびCech、Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec; 84(24):8788-92; ForsterおよびSymons、Cell. 1987 Apr 24; 49(2):211-20)。例えば、多数のリボザイムが、高い程度の特異性でホスホエステル転移反応を促進し、しばしば、オリゴヌクレオチド基質中の数個のホスホエステルのうちの1つだけを切断する(Cechら、Cell. 1981 Dec; 27(3 Pt 2):487-96; MichelおよびWesthof、J Mol Biol. 1990 Dec 5; 216(3):585-610; Reinhold-HurekおよびShub、Nature. 1992 May 14; 357(6374):173-6)。この特異性は、この基質が、化学反応の前にリボザイムの内部ガイド配列(「IGS」)との特異的塩基対形成相互作用を介して結合するという要件に帰せられている。

【0116】

天然に存在する酵素的RNAの6つの基本的変種が、現在公知である。各々が、生理学的条件下で、トランスで、RNAホスホジエステル結合の加水分解を触媒し得る(従って、他のRNA分子を切断し得る)。一般に、酵素的核酸は、まず、標的RNAへの結合によ

って作用する。このような結合は、標的RNAを切断するように作用する分子の酵素的部分に近接して保持される、酵素的核酸の標的結合部分を介して生じる。従って、その酵素的核酸はまず、標的RNAを認識し、次いで相補的塩基対形成を介してその標的RNAに結合し、そして一旦正確な部位に結合すると、その標的RNAを酵素的に切断するように作用する。このような標的RNAの戦略的切断は、コードされるタンパク質を直接合成する標的RNAの能力を破壊する。酵素的核酸がそのRNA標的に結合しそして切断した後、その酵素的核酸は、別の標的を探索するためにそのRNAから離れ、そして繰り返し、新しい標的に結合しそして切断し得る。

【0117】

リボザイムの酵素特性は、多くの技術（例えば、アンチセンス技術（ここで、核酸分子は、翻訳を阻害するために核酸標的に簡単に結合する））に対して有利である。なぜなら、治療的処置に影響を与えるのに必要であるリボザイムの濃度は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度よりも低いからである。この利点は、酵素学的に作用するリボザイムの能力を反映する。従って、単一のリボザイム分子は、標的RNAの多くの分子を切断し得る。さらに、このリボザイムは、高度に選択的なインヒビターであり、この阻害の特異性は、標的RNAに結合する塩基対形成の機構に依存するだけでなく、標的RNAの切断の機構にも依存する。切断部位付近の1個のミスマッチまたは塩基置換により、リボザイムの触媒活性が完全になくなり得る。アンチセンス分子内の同様のミスマッチでは、それらの作用は妨げられない（Woolfら、Proc Natl Acad Sci U S A . 1992 Aug 15 ; 89 (16) : 7305 - 9）。従って、リボザイムの作用の特異性は、同じRNA部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの作用の特異性よりも高い。

【0118】

この酵素学的核酸分子は、ハンマーヘッド（hammer head）モチーフ、ヘアピンモチーフ、型肝炎ウイルスモチーフ、I群イントロンモチーフまたはRNase P RNAモチーフ（RNA誘導配列に関連する）あるいはNeurospora VS RNAモチーフに形成され得る。ハンマーヘッドモチーフの例は、Rossiら、Nucleic Acids Res . 1992 Sep 11 ; 20 (17) : 4559 - 65に記載される。ヘアピンモチーフの例は、Hampelら（欧州特許出願公開番号EP 0360257）、HampelおよびTritz（Biochemistry 1989 Jun 13 ; 28 (12) : 4929 - 33）、Hampelら、Nucleic Acids Res . 1990 Jan 25 ; 18 (2) : 299 - 304および米国特許第5,631,359号に記載される。型肝炎ウイルスモチーフの例は、PerrottaおよびBeen, Biochemistry . 1992 Dec 1 ; 31 (47) : 11843 - 52に記載される；RNase Pモチーフの例は、Guerrier-Takadaら、Cell . 1983 Dec ; 35 (3 Pt 2) : 849 - 57に記載される；Neurospora VS RNAリボザイムモチーフは、Collins（SavilleおよびCollins, Cell . 1990 May 18 ; 61 (4) : 685 - 96；SavilleおよびCollins, Proc Natl Acad Sci U S A . 1991 Oct 1 ; 88 (19) : 8826 - 30；CollinsおよびOlive, Biochemistry . 1993 Mar 23 ; 32 (11) : 2795 - 9）に記載される；そしてI群イントロンの例は、米国特許第4,987,071号に記載される。本発明の酵素学的核酸分子において重要であることは、1以上の標的遺伝子RNA領域に相補的である特異的基質結合部位を有すること、およびこの分子にRNA切断活性を付与する、基質結合部位内のヌクレオチド配列またはこの基質結合部位の周囲のヌクレオチド配列を有することだけである。従って、リボザイム構築物は、本明細書中に記載される特定のモチーフに限定する必要はない。

【0119】

リボザイムは、国際特許出願公開番号WO 93 / 23569および国際特許出願公開番号WO 94 / 02595（各々は、本明細書中で参考として詳細に援用される）に記載

されるように設計され得、そして記載されるようにインビトロおよびインビボにおいて試験するために合成され得る。このようなりボザイムはまた、送達するために最適化され得る。特定の例が提供されるが、当業者は、他の種において等価なRNA標的が、必要な場合に利用され得ることを理解する。

【0120】

リボザイムの活性は、リボザイムの結合アームの長さを変更することにより、または血清リボヌクレアーゼによる分解を防ぐ改変（例えば、国際特許出願番号WO 92/07065；国際特許公開番号WO 93/15187；国際特許出願公開番号WO 91/03162；欧州特許出願公開番号92110298.4；米国特許第5,334,711号、および国際特許出願公開番号WO 94/13688（これには、酵素学的RNA分子の糖部分に対して成され得る、種々の化学的修飾が記載される）を参照のこと）、細胞中でのリボザイムの有効性を増強する改変、ならびにRNAの合成時間を短縮および化学的必要性を低下させるための幹（stem）II塩基を除去して、リボザイムを化学的に合成することによって最適化され得る。

10

【0121】

Sullivanら（国際特許出願公開番号WO 94/02595）は、酵素学的RNA分子の送達のための一般的な方法を記載する。リボザイムは、当業者に公知の種々の方法によって細胞に投与され得、これらには、リボソームへのカプセル化、イオン泳動法、あるいは、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセルおよび生体接着性マイクロスフィアのような他のビヒクルへの取り込みによるもの、が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの徴候のために、リボザイムは、エキソビボで細胞または組織に、上記のビヒクルを使用してか、または使用せずに直接送達され得る。あるいは、RNA/ビヒクルの組合せは、直接的な吸入、直接的な注射、またはカテーテル、注入ポンプまたはステントの使用により、局所的に送達され得る。他の送達経路としては、血管内注射、筋内注射、皮下注射または関節注射、エアロゾル吸入、経口送達（錠形態または丸薬形態）、局所送達、全身送達、眼送達、腹腔内送達および/またはくも膜下腔内送達が挙げられるが、これらに限定されない。リボザイム送達および投与のより詳細な記載は、国際特許出願公開番号WO 94/02595および国際特許出願公開番号WO 93/23569（各々は、本明細書中で参考として詳細に援用される）に提供される。

20

【0122】

高濃度のリボザイムを細胞内に蓄積する別の手段は、リボザイムコード配列をDNA発現ベクターに組み込むことである。リボザイム配列の転写は、真核生物RNAポリメラーゼI（pol I）、RNAポリメラーゼII（pol II）、またはRNAポリメラーゼIII（pol III）のためのプロモーターにより駆動される。pol IIプロモーターまたはpol IIIプロモーターからの転写物は、全ての細胞内で高レベルで発現される；所定の細胞型における所定のpol IIプロモーターのレベルは、近くに存在する遺伝子調節配列（エンハンサー、サイレンサーなど）の性質に依存する。原核生物のRNAポリメラーゼプロモーターもまた使用され得るが、但し、原核生物RNAポリメラーゼ酵素は、適切な細胞において発現される。このようなプロモーターから発現するリボザイムは、哺乳動物細胞において機能することが示されている。このような転写ユニットは、哺乳動物細胞内への導入のための種々のベクター（プラスミドDNAベクター、ウイルスDNAベクター（例えば、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ベクター）、またはウイルスRNAベクター（例えば、レトロウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター）が挙げられるがこれらに限定されない）に組み込まれ得る。

30

40

【0123】

本発明の別の実施形態において、ペプチド核酸（PNA）組成物が提供される。PNAは、DNA模倣物であり、核酸塩基は、偽ペプチド骨格に結合される（GoodおよびNielsen、Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997 7(4)431~37）。PNAは、RNAまたはDNAを伝統的に使用した多く

50

の方法において利用され得る。しばしば、PNA配列は、対応するRNA配列またはDNA配列よりも技術的により良く機能し、そしてRNAにもDNAにも固有でない有用性を有する。産生方法、特徴、および使用方法を含むPNAの総説は、Corey (Trends Biotechnol 1997 6月; 15(6): 224~9)によって提供される。このように、特定の実施形態において、ACE mRNA配列の1以上の部分に相補的であるPNA配列を調製し得、そしてこのようなPNA組成物は、ACE-特異的mRNAの翻訳を調節、変更、減少、または低下させるために使用され得、これにより、このようなPNA組成物が投与された宿主細胞におけるACE活性のレベルを変更する。

【0124】

PNAは、DNAの正常なホスホジエステル骨格を置換する2-アミノエチル-グリシン連結を有する(Nielsenら、Science 1991 12月6; 254(5037): 1497~500; Hanveyら、Science 1992 11月27; 258(5087): 1481~5; HrupおよびNielsen, Bioorg Med Chem 1996 1月; 4(1): 5~23)。この化学は、3つの重要な結果を有する。第1に、DNAまたはホスホロチオエートオリゴヌクレオチドとは対照的に、PNAは、中性の分子であり; 第2に、PNAは、アキラル(立体選択的な合成を開発する必要を避ける)であり; そして第3に、PNA合成は、標準的なBocプロトコルまたはFmocプロトコルを、固相ペプチド合成に使用する。一方、改良型Merri field法を含む他の方法が使用されている。

【0125】

PNAモノマーまたは既製のオリゴマーは、PerSeptive Biosystems (Framingham, MA)から市販されている。BocプロトコルまたはFmocプロトコルのいずれかによるPNAの合成は、手動プロトコルまたは自動プロトコルを使用して簡単に実施される(Nortonら、Bioorg Med Chem 1995 4月; 3(4): 437~45)。この手動プロトコルは、それ自体で、化学的に修飾されたPNAの産生または密接に関係するPNAのファミリーの同時合成を導く。

【0126】

ペプチドの合成に関して、特定のPNA合成の成功は、選択した配列の特性に依存する。例えば、理論上、PNAは、ヌクレオチド塩基の任意の組合せを取り込み得るが、隣接するプリンの存在は、産物中に1以上の残基の欠失を導き得る。この困難性を見込みにおいて、隣接するプリンを有するPNAを産生する際に、付加されているようである残基の連結を非効率的に繰り返すべきであることを示唆される。この後、ペプチド合成の間に観測されるのと類似する産物の収率および純度を提供する逆相高圧液体クロマトグラフィーによってPNAを精製すべきである。

【0127】

所与の適用のためのPNAの修飾が、固相合成の間にアミノ酸を連結することによって、または露出されたN末端アミンにカルボン酸基を含む化合物を付加することによって達成され得る。あるいは、PNAは、導入されたリジンまたはシステインに連結することによって合成した後に修飾され得る。PNAが修飾され得る簡便さにより、より良い溶解度または特定の機能的必要条件の最適化を容易にする。一旦合成されると、PNAおよびそれらの誘導体の同定は、質量分析法によって確認され得る。いくつかの研究が、PNAの修飾物を作製および利用した(例えば、Nortonら、Bioorg Med Chem 1995 4月; 3(4): 437~45; Petersenら、J Pept Sci 1995 5~6月; 1(3) 175~83; Orumら、Biotechniques 1995 9月; 19(3): 472~80; Footerら、Biochemistry 1996 8月 20; 35(33): 10673~9; Griffithsら、Nucleic Acid Res 1995 8月 11; 23(15): 3003~8; Pardridgeら、Proc Natl Acad Sci USA 1995 6月 6; 92(12): 5592~6; Boffaら、Proc Natl Acad Sci USA 1995 3月 14; 92(6): 1901~5; Gamba

c o r t i - P a s s e r i n i ら、B l o o d、1 9 9 6 8 月 1 5 ; 8 8 (4) : 1 4 1 1 ~ 7 ; A r m i t a g e ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A、1 9 9 7 1 1 月 1 1 ; 9 4 (2 3) : 1 2 3 2 0 ~ 5 ; S e e g e r ら、B i o t e c h n i q u e s、1 9 9 7 9 月 ; 2 3 (3) : 5 1 2 ~ 7)。米国特許第 5, 7 0 0, 9 2 2 号は、P N A - D N A - P N A キメラ分子および診断におけるその分子の使用、生物体におけるタンパク質の調節、ならびに治療に対して影響を受け易い状態の処置について議論する。

【 0 1 2 8 】

P N A の アンチセンス結合特性を特徴づけする方法は、R o s e (A n a l C h e m、1 9 9 3 1 2 月 1 5 ; 6 5 (2 4) : 3 5 4 5 ~ 9) および J e n s e n ら (B i o c h e m i s t r y、1 9 9 7 4 月 2 2 ; 3 6 (1 6) : 5 0 7 2 ~ 7) において議論される。R o s e は、キャピラリーゲル電気泳動を使用して、相対的な結合速度論および化学量論を測定することで、P N A のそれらの相補的オリゴヌクレオチドに対する結合を決定する。同様のタイプの測定が、B I A c o r e ^{T M} 技術を使用して J e n s e n らによってなされた。

10

【 0 1 2 9 】

記載され、そして当業者に明らかである P N A の他の適用には、D N A 鎖の侵入、アンチセンス阻害、変異分析、転写のエンハンサー、核酸の精製、転写活性遺伝子の単離、転写因子結合の阻害、ゲノムの切断、バイオセンサー、インサイチュハイブリダイゼーションなどにおける使用が挙げられる。

20

【 0 1 3 0 】

(ポリヌクレオチドの同定、特徴づけおよび発現)

本発明のポリヌクレオチド組成物は、種々の十分に確立された技術のいずれかを使用して、同定、調製および/または操作され得る(一般に、S a m b r o o k ら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r i e s、C o l d S p r i n g H a r b o r、N Y、1 9 8 9、および他の類似の参考文献を参照のこと)。例えば、ポリヌクレオチドは、以下により詳細に記載されるように、c D N A のマイクロアレイを腫瘍に関連する発現(すなわち、本明細書中で提供される代表的なアッセイを使用して決定する場合、正常な組織における発現よりも、少なくとも2倍高い腫瘍での発現)についてスクリー

30

【 0 1 3 1 】

多数のテンプレート依存性プロセスが、サンプル中に存在する目的の標的配列を増幅するために利用可能である。最もよく知られた増幅方法の1つは、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R ^{T M}) であり、これは、米国特許第 4, 6 8 3, 1 9 5 号、同第 4, 6 8 3, 2 0 2 号、および同第 4, 8 0 0, 1 5 9 号に詳細に記載され、これらの各々はその全体が本明細書中に参考として援用される。手短に言えば、P C R ^{T M} においては、標的配列の向かい合った相補鎖上の領域に対して相補的な2つのプライマー配列が調製される。過剰のデオキシヌクレオチド三リン酸を、D N A ポリメラーゼ(例えば、T a q ポリメラーゼ)とともに反応混合液に添加する。標的配列がサンプル中に存在する場合、プライマーはその標的に結合し、そしてポリメラーゼは、ヌクレオチドを付加することによって標的配列に沿ってプライマーを伸長させる。反応混合液の温度を上昇および下降させることによって、伸長したプライマーは、標的から解離して反応生成物を形成し、過剰のプライマーは標

40

50

的および反応生成物に結合し、そしてこのプロセスが反復される。好ましくは、逆転写およびPCR^{T M}増幅手順が、増幅されたmRNAの量を定量するために実行され得る。ポリメラーゼ連鎖反応方法は、当該分野で周知である。

【0132】

多くの他のテンプレート依存性プロセスのいずれか（この多くは、PCR^{T M}増幅技術のバリエーションである）は、当該分野で容易に知られており、利用可能である。例示として、いくつかのこのような方法としては、リガーゼ連鎖反応（LCRともいわれる）（例えば、欧州特許出願公開番号320,308号、米国特許第4,883,750号において記載される）；Qレプリカーゼ（PCT国際特許出願公開番号PCT/US87/00880に記載される）；鎖置換増幅（Strand Displacement Amplification）（SDA）および修復鎖反応（Repair Chain Reaction）（RCR）が挙げられる。なお他の増幅法は、英国特許出願番号2202328号およびPCT国際特許出願公開番号PCT/US89/01025において記載される。他の核酸増幅手順には、転写に基づく増幅系（TAS）（PCT国際特許出願公開番号WO88/10315）が挙げられ、これには、核酸配列に基づく増幅（NASBA）および3SRが含まれる。欧州特許出願公開番号329,822は、一本鎖RNA（「ssRNA」）、ssDNA、および二本鎖DNA（dsDNA）をサイクル的に合成する工程を包含する核酸増殖プロセスを記載する。PCT国際特許出願公開番号WO89/06700は、プロモーター/プライマー配列の標的一本鎖DNA（「ssDNA」）へのハイブリダイゼーションに基づく核酸配列増幅スキーム、引き続くこの配列の多くのRNAコピーの転写を記載する。「RACE」（Frohman、1990）および「片側（one-sided）PCR」（Ohara、1989）のような他の増幅方法もまた、当業者に周知である。

【0133】

本発明のポリヌクレオチドの増幅した部分を使用して、適切なライブラリー（例えば、腫瘍cDNAライブラリー）から周知の技術を使用して全長遺伝子を単離し得る。このような技術において、増幅に適した1以上のポリヌクレオチドプローブまたはプライマーを使用して、ライブラリー（cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリー）をスクリーニングする。好ましくは、ライブラリーはより大きな分子を含むようにサイズが選択される。ランダムプライムしたライブラリー（random primed library）もまた、遺伝子の5'領域および上流領域の同定ために好ましくあり得る。ゲノムライブラリーは、イントロンを入手することおよび5'配列を伸長させることについて好ましい。

【0134】

ハイブリダイゼーション技術に関して、部分配列は、周知の技術を使用して標識（例えば、ニックトランスレーションまたは³²Pでの末端標識）され得る。次いで、細菌ライブラリーまたはバクテリオファージライブラリーは、一般に、標識プローブと、変性した細菌コロニー（またはファージプラークを含む菌叢）を含むフィルターとをハイブリダイズすることによってスクリーニングされる（Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照のこと）。ハイブリダイズするコロニーまたはプラークを選択し、そして増殖させる。そしてそのDNAをさらなる分析のために単離する。cDNAクローンを、付加配列の量を決定するために、例えば、部分配列由来のプライマーおよびそのベクター由来のプライマーを使用するPCRによって分析し得る。制限酵素地図および部分配列を作成して、1以上の重複クローンを同定し得る。次いで、標準的な技術（これは、一連の欠失クローンを作製することを包含し得る）を使用して完全配列を決定し得る。次いで、得られた重複配列を1つの連続配列中に構築し得る。周知の技術を使用して、適切なフラグメントを連結することにより全長cDNA分子を生成し得る。

【0135】

あるいは、上記のような増幅技術は、部分的な cDNA 配列から全長コード配列を得るために有用であり得る。このような増幅技術の 1 つは、逆 PCR である (Trigliaら, Nucl. Acids Res. 16: 8186, 1988 を参照のこと)。この技術は、制限酵素を使用して、その遺伝子の既知の領域内にフラグメントを生成する。次いで、このフラグメントを分子内連結により環化し、そして既知の領域に由来する多岐したプライマーを用いた PCR のためのテンプレートとして使用する。代替のアプローチにおいて、部分配列に隣接した配列を、リンカー配列に対するプライマーおよび既知の領域に特異的なプライマーを使用する増幅により取り出し得る。この増幅した配列を、代表的に、同じリンカープライマーおよび既知の領域に特異的な第 2 のプライマーを使用する 2 回目の増幅に供する。既知の配列から反対方向に伸長を開始する 2 つのプライマーを使用するこの手順についての改変は、WO 96/38591 に記載される。そのような別の技術は、「迅速な cDNA 末端の増幅」または RACE として公知である。この技術は、公知配列の 5' および 3' である配列を同定するために、内部プライマーおよび外部プライマー (これらは、ポリ A 領域またはベクター配列にハイブリダイズする) の使用を含む。さらなる技術としては、キャプチャー PCR (Langerstromら, PCR Methods Applic. 1: 111-19, 1991) およびウオーキング PCR (Parkerら, Nucl. Acids Res. 19: 3055-60, 1991) が挙げられる。増幅を利用する他の方法もまた使用して、全長 cDNA 配列を入手し得る。

10

【0136】

特定の場合において、発現配列タグ (EST) データベース (例えば、GenBank より利用可能のもの) に提供される配列の分析により、全長 cDNA 配列を入手することが可能である。重複 EST の検索は、一般に、周知のプログラム (例えば、NCBI BLAST 検索) を使用して行われ得、そしてこのような EST を使用して連続した全長配列を生成し得る。全長 DNA 配列はまた、ゲノムフラグメントの分析により入手され得る。

20

【0137】

本発明の他の実施形態において、本発明のポリペプチドまたはその融合タンパク質もしくは機能的等価物をコードするポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントは、適切な宿主細胞におけるポリペプチドの発現を指向するように組換え DNA 分子において使用され得る。遺伝コードの固有の縮重に起因して、実質的に同じか、または機能的に等価なアミノ酸配列をコードする他の DNA 配列が産生され得、そしてこれらの配列を使用して所定のポリペプチドをクローン化し、そして発現させ得る。

30

【0138】

当業者によって理解されるように、いくつかの場合において、天然に存在しないコドンをもつポリペプチドコードヌクレオチド配列を作製することが有利であり得る。例えば、特定の原核生物宿主または真核生物宿主に好まれるコドンは、タンパク質発現の速度を増加させるためか、または所望の特性 (例えば、天然に存在する配列から生成される転写物の半減期よりも長い半減期) を有する組換え RNA 転写物を産生するように選択され得る。

【0139】

さらに、本発明のポリヌクレオチド配列は、種々の理由 (遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を変更する改変が挙げられるが、それらに限定されない) のためにポリペプチドコード配列を変更するために、当該分野において一般的に公知の方法を使用して操作され得る。例えば、無作為断片化による DNA シャッフリングならびに遺伝子フラグメントおよび合成オリゴヌクレオチドの PCR 再アセンブリを使用して、ヌクレオチド配列を操作し得る。さらに、部位特異的変異誘発を使用して、新たな制限部位を挿入し得るか、グリコシル化パターンを改変し得るか、コドンの優先度 (preference) を変化させ得るか、スプライス改変体を作製し得るか、または変異の導入などを行い得る。

40

【0140】

本発明の別の実施形態において、天然の核酸配列、改変された核酸配列、または組換え核

50

酸配列は、融合タンパク質をコードする異種配列に連結され得る。例えば、ポリペプチド活性のインヒビターについてペプチドライブラリーをスクリーニングするために、市販の抗体により認識され得るキメラタンパク質をコードすることが有用であり得る。融合タンパク質はまた、ポリペプチドコード配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように操作され得、その結果そのポリペプチドは、切断されて、そして異種部分から精製されて取り出され得る。

【0141】

所望のポリペプチドをコードする配列が、当該分野において周知の化学的方法を使用して、全体または部分的に合成され得る (Caruthers, M. H. ら、(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215~223、Horn, T. ら、(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225~232を参照のこと)。あるいは、タンパク質自体は、ポリペプチドのアミノ酸配列またはその一部を合成するための化学的方法を使用して産生され得る。例えば、ペプチド合成は、種々の固相技術を使用して実施され得 (Roberge, J. Y. ら、(1995) Science 269:202~204)、そして自動化合成は、例えば、ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Palo Alto, CA) を使用して達成され得る。

10

【0142】

新たに合成されたペプチドは、分取用高速液体クロマトグラフィー (例えば、Creighton, T. (1983) Proteins, Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, N. Y.) または当該分野において利用可能な他の同等技術により実質的に精製され得る。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定 (例えば、エドマン分解手順) により確認され得る。さらに、ポリペプチドのアミノ酸配列またはその任意の部分は、直接合成の間改変されて、そして/または化学的方法を使用して、他のタンパク質もしくはその任意の部分に由来する配列と組み合わせられて、改変体ポリペプチドを産生し得る。

20

【0143】

所望のポリペプチドを発現させるために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列または機能的等価物は、適切な発現ベクター (すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含むベクター) 内に挿入され得る。当業者に周知である方法を使用して、目的のポリペプチドをコードする配列および適切な転写制御エレメントおよび翻訳制御エレメントを含む発現ベクターを構築し得る。これらの方法としては、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えが挙げられる。そのような技術は、例えば、Sambrook, J. ら、(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., および Ausubel, F. M. ら、(1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y. に記載される。

30

40

【0144】

種々の発現ベクター/宿主系が、ポリヌクレオチド配列を含み、そして発現させるように利用され得る。これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 微生物 (例えば、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌); 酵母発現ベクターで形質転換した酵母; ウイルス発現ベクター (例えば、バキュロウイルス) で感染させた昆虫細胞系; ウイルス発現ベクター (例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV) または細菌発現ベクター (例えば、TiもしくはpBR322プラスミド) で形質転換した植物細胞系; あるいは動物細胞系。

【0145】

50

発現ベクター内に存在する「制御エレメント」または「調節配列」は、転写および翻訳を実行するように宿主細胞タンパク質と相互作用する、それらのベクターの非翻訳領域（エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域）である。そのようなエレメントは、その長さおよび特異性を変更し得る。利用されるベクター系および宿主に依存して、多数の適切な転写エレメントおよび翻訳エレメント（構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターを含む）が使用され得る。例えば、細菌系においてクローニングする場合、誘導性プロモーター（例えば、pBLUESCRIPTファージミド（Stratagene, La Jolla, Calif.）またはpSPORT1プラスミド（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）などのハイブリッドlacZプロモーター）が使用され得る。哺乳動物細胞系において、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターが、一般的に好ましい。ポリペプチドをコードする配列の複数のコピーを含む細胞株を生成することが必要とされる場合、SV40またはEBVベースのベクターが、適切な選択マーカーと共に有利に使用され得る。

【0146】

細菌系において、多数の発現ベクターのいずれかが、発現されるポリペプチドに対して意図される使用に依存して選択され得る。例えば、大量に必要とされる場合（例えば、抗体の誘導のために）、容易に精製される融合タンパク質の高レベルの発現を指向するベクターが使用され得る。そのようなベクターとしては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：多機能性E. coliクローニングベクターおよび発現ベクター（例えば、pBLUESCRIPT（Stratagene）、ここでは目的のポリペプチドをコードする配列が、 λ -ガラクトシダーゼのアミノ末端Metおよびそれに引続く7残基についての配列とインフレームでベクター内に連結され得、その結果、ハイブリッドタンパク質が産生される）；pINベクター（Van Heeke, G. およびS. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264: 5503-5509）など。pGEXベクター（Promega, Madison, Wis.）もまた、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般的に、そのような融合タンパク質は、可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズに吸着させ、次に遊離のグルタチオンの存在下において溶出させることによって、溶解した細胞から容易に精製され得る。そのような系において作製されたタンパク質は、ヘパリン、トロンピン、または第XA因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され得、その結果、クローニングされた目的のポリペプチドが、随意にGST部分から放出され得る。

【0147】

酵母（Saccharomyces cerevisiae）において、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター（例えば、 α 因子、アルコールオキシダーゼおよびPGH）を含む多数のベクターが使用され得る。概説については、Ausubelら、（前出）およびGrantら、（1987）Methods Enzymol. 153: 516-544を参照のこと。

【0148】

植物発現ベクターを使用する場合において、ポリペプチドをコードする配列の発現は、任意の多数のプロモーターにより駆動され得る。例えば、ウイルスプロモーター（例えば、CaMVの35Sプロモーターおよび19Sプロモーター）は、単独でか、またはTMVに由来するリーダー配列と組み合わせて使用され得る（Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6: 307-311）。あるいは、植物プロモーター（例えば、RUBISCOの小サブユニットまたは熱ショックプロモーター）を使用し得る（Coruzzi, G.ら、（1984）EMBO J. 3: 1671-1680；Broglie, R.ら、（1984）Science 224: 838-843；およびWinter, J.ら、（1991）Results Probl. Cell Differ. 17: 85-105）。これらの構築物は、直接的DNA形質転換または病原体媒介性トランスフェクションによって植物細胞内に導入され得る。そのような技術は、多数の一般的に入

手可能な概説に記載されている(例えば、Hobbs, S. または Murry, L. E., McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N. Y.; 191 - 196 頁を参照のこと)。

【0149】

昆虫系はまた、目的のポリペプチドを発現させるために使用され得る。例えば、そのような1つの系において、オートグラフィカリフォルニア核発汗病ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) (AcNPV) は、Spodoptera frugiperda 細胞または Trichoplusia larvae において外来遺伝子を発現させるベクターとして使用される。ポリペプチドをコードする配列は、ウイルスの非必須領域内(例えば、ポリヘドリン (polyhedrin) 遺伝子) にクローニングされ得て、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置かれ得る。ポリペプチドコード配列の首尾良い挿入は、ポリヘドリン遺伝子を不活性化し、そしてコートタンパク質を欠損している組換えウイルスを産生する。次いで、この組換えウイルスを使用して、例えば、目的のポリペプチドが発現され得る、S. frugiperda 細胞または Trichoplusia larvae に感染させ得る (Engelhard, E. K. ら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3224 - 3227)。

10

【0150】

哺乳動物宿主細胞において、多数のウイルスベースの発現系が一般的に利用可能である。例えば、アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合において、目的のポリペプチドをコードする配列は、後期プロモーターおよび3部からなるリーダー配列から構成されるアデノウイルス転写/翻訳複体内に連結され得る。ウイルスゲノムの非必須 E1 または E3 領域における挿入を使用して、感染した宿主細胞においてポリペプチドを発現し得る、生存可能ウイルスを入手し得る (Logan, J. および Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3655 - 3659)。さらに、転写エンハンサー(例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサー) を使用して、哺乳動物宿主細胞における発現を増加させ得る。

20

【0151】

特定の開始シグナルはまた、目的のポリペプチドをコードする配列のより効率的な翻訳を達成するために使用され得る。そのようなシグナルとしては、ATG 開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。ポリペプチドをコードする配列、その開始コドンおよび上流配列が適切な発現ベクター内に挿入される場合において、さらなる転写制御シグナルまたは翻訳制御シグナルは必要とされなくとも良い。しかし、コード配列のみ、またはその一部のみが挿入される場合、ATG 開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが提供されるべきである。さらに、開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために、正確なリーディングフレーム内にあるべきである。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンは、種々の起源(天然および合成の両方)に由来し得る。発現の効率は、使用される特定の細胞系に適切なエンハンサー(例えば、文献 (Scharf, D. ら、(1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 125 - 162) に記載されるエンハンサー) の封入によって増大され得る。

30

40

【0152】

さらに、宿主細胞株は、挿入された配列の発現を調節するか、または所望の様式において発現されたタンパク質をプロセッシングするその能力について選択され得る。ポリペプチドのそのような改変としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、リビデーション (lipidation) およびアシル化が挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」形態を切断する翻訳後プロセッシングはまた、正確な挿入、折り畳みおよび/または機能を促進させるために使用され得る。異なる宿主細胞(例えば、CHO、COS、HeLa、MDCK、HEK293 および WI38) (これらは、そのような翻訳後活性についての特定の細胞機構 (machinery) および特徴的

50

機構 (mechanisms) を有する) は、正確な改変および外来タンパク質のプロセッシングを確実にするように選択され得る。

【0153】

長期間の組換えタンパク質の高収率の産生のために、安定な発現が一般的に好ましい。例えば、目的のポリヌクレオチドを安定に発現する細胞株が、ウイルス複製起点および/または内因性発現エレメントならびに同じかもしくは別個のベクター上の選択マーカー遺伝子を含み得る、発現ベクターを使用して形質転換され得る。そのベクターの導入後、細胞は、それらが選択培地に切換えられる前に、富化 (enriched) 培地において1~2日間の増殖が可能とされ得る。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を与えることであり、そしてその存在は、導入された配列を首尾良く発現する細胞の増殖および回収を可能とする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適切な組織培養技術を使用して、増殖され得る。

10

【0154】

多数の選択系を使用して、形質転換細胞株を回収し得る。これらの選択系としては、それぞれ、tk.sup.-細胞またはaprt.sup.-細胞において使用され得る、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (Wigler, M.ら、(1977) Cell 11: 223-32) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy, I.ら、(1990) Cell 22: 817-23) 遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。また、代謝拮抗剤耐性、抗生物質耐性または除草剤耐性は、選択のための基礎として使用され得る; 例えば、dhfr (これは、メトトレキセートに対する耐性を与える (Wigler, M.ら、(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567-70); npt (これは、アミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を与える (Colbere-Garapin, F.ら、(1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14)); ならびにalsまたはpat (これらは、それぞれ、クロルスルフロンおよびホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を与える (Murry, 前出))。さらなる選択遺伝子が記載されている。例えば、trpB (これは、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にする) またはhisD (これは、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする) (Hartman, S.C. およびR.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8047-51)。アントシアニン、-グルクロニダーゼおよびその基質のGUS、ならびにルシフェラーゼおよびその基質のルシフェリンのようなマーカーを用いる、可視マーカーの使用の人気の高くなっており、形質転換体を同定するためのみならず、特定のベクター系に起因し得る一過性のタンパク質発現または安定なタンパク質発現の量を定量するためにもまた広範に使用されている (Rhodes, C.A.ら、(1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-131)。

20

30

【0155】

マーカー遺伝子発現の存在/非存在は、目的の遺伝子もまた存在するということを示唆しているが、その存在および発現は、確認されることを必要とし得る。例えば、ポリペプチドをコードする配列が、マーカー遺伝子配列内に挿入される場合、配列を含む組換え細胞は、マーカー遺伝子機能の非存在により同定され得る。あるいは、マーカー遺伝子は、1つのプロモーターの制御下にポリペプチドコード配列と直列に配置され得る。誘導または選択に応じてのマーカー遺伝子の発現は、通常、その直列遺伝子の発現も同様に示す。

40

【0156】

あるいは、所望のポリヌクレオチド配列を含み、かつ発現する宿主細胞は、当業者に公知の種々の手順によって同定され得る。これらの手順としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 核酸またはタンパク質の検出および/または定量化のための、例えば、膜ベースの技術、溶液ベースの技術、またはチップベースの技術を含む、DNA-DNAハイブリダイゼーション技術もしくはDNA-RNAハイブリダイゼーション技術およびタンパク質バイオアッセイ技術またはイムノアッセイ技術。

50

【0157】

ポリヌクレオチドコード化産物に特異的なポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体のいずれかを使用して、ポリヌクレオチドコード化産物の発現を検出および測定するための種々のプロトコルは、当該分野において公知である。例としては、酵素結合免疫測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) および蛍光活性化セルソーティング (FACS) が挙げられる。所定のポリペプチド上の2つの非干渉性エピトープに対して反応性であるモノクローナル抗体を利用する2つの部位の、モノクローナルベースのイムノアッセイが、いくつかの適用のために好まれ得るが、競合的結合アッセイもまた、利用され得る。これらのアッセイおよび他のアッセイは、とりわけ Hampton, R. ら、(1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn.) および Maddox, D. E. ら、(1983; J. Exp. Med. 158: 1211-1216) に記載される。

【0158】

広範に種々の標識技術および結合技術は、当業者に公知であり、そして種々の核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにおいて使用され得る。ポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識されたハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを作製するための手段としては、オリゴ標識 (oligo labeling)、ニックトランスレーション、末端標識または標識されたヌクレオチドを使用するPCR増幅が挙げられる。あるいは、mRNAプローブの産生のために、配列またはその任意の部分が、ベクター内にクローニングされ得る。そのようなベクターは、当該分野において公知であり、市販されており、そして適切なRNAポリメラーゼ (例えば、T7、T3、またはSP6) および標識されたヌクレオチドを添加することにより、RNAプローブをインビトロで合成するために使用され得る。これらの手順は、種々の市販キットを使用して実施され得る。使用され得る適切なレポーター分子または標識としては、放射性核種、酵素、蛍光、化学発光、または色素形成剤ならびに基質、コファクター (補因子)、インヒビター、磁気粒子などが挙げられる。

【0159】

目的のポリヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、タンパク質の発現および細胞培養物からの回収に適した条件下において培養され得る。組換え細胞により産生されたタンパク質は、使用された配列および/またはベクターに依存して、細胞内に分泌され得るかまたは含まれ得る。当業者によって理解されるように、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜または真核細胞膜を介して、コードされたポリペプチドの分泌を指向するシグナル配列を含むように設計され得る。他の組換え構築物を使用して、目的のポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に結合させ得る。そのような精製促進ドメインとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：固定された金属上での精製を可能にする金属キレート化ペプチド (例えば、ヒスチジン-トリプトファンモジュール)、固定された免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAG伸長/アフィニティー精製システム (ImmuneX Corp., Seattle, Wash.) において利用されるドメイン。精製ドメインとコードされるポリペプチドとの間への、切断可能なリンカー配列 (例えば、第XA因子またはエンテロキナーゼに対して特異的な配列 (Invitrogen, San Diego, Calif.)) の封入を使用して、精製を促進させ得る。そのような発現ベクターの1つは、目的のポリペプチドを含む融合タンパク質およびチオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位の前に6つのヒスチジン残基をコードする核酸の発現を提供する。ヒスチジン残基は、Porath, J. ら、(1992, Prot. Exp. Purif. 3: 263-281) に記載されるように、IMIAc (固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー) 上での精製を促進する一方で、エンテロキナーゼ切断部位は、融合タンパク質から所望のポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターの考察は、

Kroll, D. J. ら、(1993; DNA Cell Boil. 12: 441-453)において提供される。

【0160】

組換え産生方法に加えて、本発明のポリペプチドおよびそのフラグメントは、固相技術(Merrifield J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154)を使用する、直接的ペプチド合成によって産生され得る。タンパク質合成は、手動技術を使用するか、または自動化によって実施され得る。自動化合成は、例えば、Applied Biosystems 431Aペプチド合成装置(Perkin Elmer)を使用して、達成され得る。あるいは、種々のフラグメントは、別々に化学的に合成されて、そして全長分子を産生するために化学的方法を使用して組み合わされ得る。

【0161】

(抗体組成物、そのフラグメントおよび他の結合因子)

別の局面によると、本発明はさらに、本明細書中で開示される腫瘍ポリペプチドに対して、または一部の改変体または誘導体に対して免疫学的結合を示す結合因子(例えば、抗体およびその抗原結合フラグメント)を提供する。抗体、またはその抗原結合フラグメントとは、本発明のポリペプチドに対して、「特異的に結合する」こと、「免疫学的に結合する」ことを言い、そして/または、それが(例えば、ELISAアッセイにおいて)検出可能なレベルでそのポリペプチドと反応し、かつ類似の条件下で非関連ポリペプチドと検出可能に反応しない場合、「免疫学的に反応性」とであると言う。

【0162】

この文脈で使用される場合、免疫学的結合は、一般に、免疫グロブリン分子と、この免疫グロブリンが特異的な抗原との間で起こるタイプの非共有結合的な相互作用をいう。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数(K_d)の観点から表現され得、ここで、より小さい K_d は、より大きな親和性を示す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当該分野で周知の方法を使用して、定量され得る。1つのこのような方法は、抗原結合部位/抗原複合体形成および解離の速度を測定する工程を必要とし、ここで、これらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方の方向における速度に等しく影響を与える幾何学的パラメータに依存する。従って、「会合速度定数(on rate constant)」(K_{on})および「解離速度定数(off rate constant)」(K_{off})の両方が、濃度ならびに会合および解離の実際の速度を計算することによって決定され得る。 K_{off}/K_{on} の比は、親和性に関係しない全てのパラメータの排除を可能にし、そして従って、解離定数 K_d に等しい。一般的には、Daviesら(1990) Annual Rev. Biochem. 59: 439-473を参照のこと。

【0163】

抗体の「抗原結合部位」または「結合部分」は、抗原結合に関係する免疫グロブリン分子の部分を用いる。この抗原結合部位は、重鎖(「H」)および軽鎖(「L」)のN末端可変(「V」)領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に分岐したストレッチが、「超可変領域」といわれ、これは、「フレームワーク領域」または「FR」として公知のより保存された隣接ストレッチの間に挿入される。従って、用語「FR」は、免疫グロブリンの超可変領域の間で、それに隣接して天然に見出されるアミノ酸配列をいう。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域が、3次元空間において互いに相対的に配置されて、抗原結合表面を形成する。この抗原結合表面は、結合した抗原の3次元表面に相補的であり、そして重鎖および軽鎖の各々の3つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」といわれる。

【0164】

結合剤は、本明細書中に提供される代表的なアッセイを使用して、癌(例えば、結腸癌)を有する患者と有さない患者との間をさらに区別し得る。例えば、腫瘍タンパク質に結合する抗体または他の結合剤は、好ましくは、この疾患を有する患者の少なくとも約20%

、より好ましくは患者の少なくとも約30%において、癌の存在を示すシグナルを生成する。あるいは、または加えて、この抗体は、癌を有さない個体の少なくとも約90%において、この疾患の非存在を示す陰性シグナルを生成する。結合剤が、この要求を満たすか否かを決定するために、癌（標準的な臨床試験によって決定されるような）を有する患者および有さない患者からの生物学的サンプル（例えば、血液、血清、痰、尿および/または腫瘍生検）が、この結合剤に結合するポリペプチドの存在について、本明細書に記載されるようにアッセイされ得る。好ましくは、疾患を有するサンプルおよび有さないサンプルの統計的に有意な数が、アッセイされる。各結合剤は、上記の基準を満足すべきである；しかし、当業者は、結合剤が、組合せて使用されて、感度を改善し得ることを認識する。

10

【0165】

上記の要求を満足する任意の薬剤は、結合剤であり得る。例えば、結合剤は、ペプチド成分を含むか含まないリポソーム、RNA分子またはポリペプチドであり得る。好ましい実施形態において、結合剤は、抗体またはその抗原結合フラグメントである。抗体は、当業者に公知の種々の技術のいずれかによって、調製され得る。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと。一般に、抗体は、細胞培養技術（本明細書に記載されるようなモノクローナル抗体の生成を含む）によって、または組換え抗体の生成を可能にするために、適切な細菌細胞宿主または哺乳動物細胞宿主への抗体遺伝子のトランスフェクションを介して、生成され得る。1つの技術において、このポリペプチドを含む免疫原が、最初に、広範な種々の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジまたはヤギ）のいずれかに注射される。この工程において、本発明のポリペプチドは、改変を有さない免疫原として機能し得る。あるいは、特に、比較的短いポリペプチドについて、優れた免疫応答が、このポリペプチドがキャリアタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニン）に結合される場合に、惹起され得る。この免疫原は、好ましくは、1回以上のブースト免疫を組み込む所定のスケジュールに従って、動物宿主に注射され、そしてこれらの動物が、定期的に採血される。このポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、次いで、例えば、適切な固体支持体に結合されたポリペプチドを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって、このような抗血清から精製され得る。

20

30

【0166】

目的の抗原性ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体が、例えば、KohlerおよびMilstein, Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976の技術およびその改善物を使用して、調製され得る。簡潔には、これらの方法は、所望の特異性（すなわち、目的のポリペプチドとの反応性）を有する抗体を生成し得る不死細胞株の調製を含む。このような細胞株は、例えば、上記のように免疫された動物から得られる脾臓細胞から生成され得る。次いで、この脾臓細胞が、例えば、骨髄腫細胞融合パートナー、好ましくは、免疫された動物と同系であるものとの融合によって不死化される。種々の融合技術が使用され得る。例えば、脾臓細胞および骨髄腫細胞は、数分間、非イオン性界面活性剤と組合せられ、次いで、ハイブリッド細胞の増殖は支持するが、骨髄腫細胞の増殖は支持しない選択培地に低密度でプレートされ得る。好ましい選択技術は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を使用する。十分な時間の後、通常、約1~2週間の後、ハイブリッドのコロニーが観察される。単一コロニーを選択し、そしてそれらの培養上清を、このポリペプチドに対する結合活性について試験する。高い反応性および特異性を有するハイブリドーマが好ましい。

40

【0167】

モノクローナル抗体は、増殖ハイブリドーマコロニーの上清から単離され得る。さらに、種々の技術が、収量を増加させるために使用され得、この技術は、例えば、適切な脊椎動物宿主（例えば、マウス）の腹腔へのハイブリドーマ細胞株の注入である。次いで、モノクローナル抗体が、腹水または血液から回収され得る。混入物が、従来技術（例えば、

50

クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈澱、および抽出)によって抗体から除去され得る。本発明のポリペプチドは、例えば、アフィニティークロマトグラフィー工程における精製プロセスにおいて使用され得る。

【0168】

抗体分子の免疫学的結合特性を示し得る抗原結合部位を含む多くの治療的に有効な分子が、当該分野で公知である。このタンパク質分解性酵素パパインは、優先的に、IgG分子を切断して、いくつかのフラグメントを生じさせ、これら(「F(ab)フラグメント」)のうちの2つの各々は、インタクトな抗原結合部位を含む共有結合ヘテロダイマーを含む。酵素ペプシンは、IgG分子を切断して、いくつかのフラグメント(両方の抗原結合部位を含む「F(ab')₂」フラグメントを含む)を提供し得る。「Fv」フラグメントは、IgM、および稀な場合にはIgGまたはIgA免疫グロブリン分子の優先的なタンパク質分解的切断によって生成され得る。しかし、Fvフラグメントは、当該分野で公知の組換え技術を使用して、より一般的に誘導される。Fvフラグメントは、非共有結合的なV_H : : V_Lヘテロダイマーを含み、このヘテロダイマーは、ネイティブな抗体分子の抗原認識および結合能力のほとんどを保持する抗原結合部位を含む。Inbarら(1972)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochmanら(1976)Biochem 15:2706-2710; および Ehrlichら(1980)Biochem 19:4091-4096。

10

【0169】

単鎖Fv(「sFv」)ポリペプチドは、共有結合されたV_H : : V_Lヘテロダイマーであり、このヘテロダイマーは、ペプチドをコードするリンカーによって連結されたV_Hをコードする遺伝子およびV_Lをコードする遺伝子を含む遺伝子融合物から発現される。Hustonら(1988)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883。抗体V領域からの自然に凝集する(化学的には分離された)ポリペプチド軽鎖および重鎖を、sFv分子に転換するための化学構造を識別するための多くの方法が記述され、このsFvは、抗原結合部位の構造に実質的に類似する3次元構造に折り畳まれる。例えば、米国特許第5,091,513号および同第5,132,405号(Hustonら); ならびに米国特許第4,946,778号(Ladnerら)を参照のこと。

20

【0170】

上記分子の各々は、重鎖および軽鎖CDRセットを含み、各々は、CDRSへの支持を提供し、そして互いに対してCDRの空間的關係を規定する重鎖および軽鎖FRセットの間に挿入される。本明細書中で使用される場合、用語「CDRセット」は、重鎖または軽鎖V領域の3つの超可変領域をいう。重鎖または軽鎖のN末端から進んで、これらの領域は、各々、「CDR1」、「CDR2」および「CDR3」と表記される。従って、抗原結合部位は、6つのCDRを含み、この6つのCDRは、重鎖および軽鎖V領域の各々からのCDRセットを含む。単一CDR(例えば、CDR1、CDR2、またはCDR3)を含むポリペプチドは、本明細書中で「分子認識ユニット」といわれる。多くの抗原-抗体複合体の結晶学的分析により、CDRのアミノ酸残基は、結合した抗原との広範な接触を形成することが立証され、ここで、最も広範な抗原接触は、重鎖CDR3とである。従って、分子認識ユニットは、主に、抗原結合部位の特異性の原因である。

30

40

【0171】

本明細書中で使用される場合、用語「FRセット」は、重鎖または軽鎖のV領域のCDRセットのCDRを構成する、4つの隣接アミノ酸配列をいう。いくつかのFR残基は、結合抗原と接触し得る;しかし、FRは、主に、V領域を抗原結合部位、特にCDRSに直接隣接するFR残基に折り畳む原因である。FRにおいて、特定のアミノ酸残基および特定の構造特徴が、非常に高度に保存される。この点において、全てのV領域配列は、約90アミノ酸残基の内部ジスルフィドループを含む。V領域が、結合部位に折り畳まれる場合、このCDRは、抗原結合表面を形成する突出したループモチーフとして表示される。正確なCDRアミノ酸配列に関わらず、特定の「正準」構造に折り畳まれたCDRループ

50

の形状に影響するFRの保存された構造領域が存在することが一般的に認識される。さらに、特定のFR残基は、抗体重鎖および軽鎖の相互作用を安定化する非共有結合的なドメイン間接触に関係することが知られている。

【0172】

非ヒト免疫グロブリン由来の抗原結合部位を含む、多くの「ヒト化」抗体分子が記載され、この抗体分子には、げっ歯類V領域およびヒト定常領域に融合されたそれらの会合CDR (Winterら(1991) Nature 349:293-299; Lobuglioら(1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224; Shawら(1987) J Immunol. 138:4534-4538; およびBrownら(1987) Cancer Res. 47:3577-3583)、適切なヒト抗体定常ドメインとの融合の前に、ヒト支持FRにグラフトされたげっ歯類CDR (Riechmannら(1988) Nature 332:323-327; Verhoevenら(1988) Science 239:1534-1536; およびJonesら(1986) Nature 321:522-525)、ならびに組換えベニアリングされた(recombinantly veneered)げっ歯類FRによって支持されるげっ歯類CDR(欧州特許公開番号519,596(1992年12月23日公開)を含むキメラ抗体が挙げられる。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントにおけるこれらの部分の治療的適用の持続期間および有効性を制限するげっ歯類抗ヒト抗体分子に対する所望されない免疫学的応答を最小化するように設計される。

10

【0173】

本明細書中で使用される場合、用語「ベニアリングされたFR」および「組換えベニアリングされたFR」は、ネイティブのFRポリペプチド折り畳み構造の実質的に全てを保持する抗原結合部位を含む異種分子を提供するために、例えば、げっ歯類重鎖または軽鎖のV領域からのFR残基のヒトFR残基での選択的置換をいう。ベニアリング技術は、抗原結合部位のリガンド結合特徴が、主に抗原結合表面内の重鎖および軽鎖のCDRセットの構造および相対的な配置によって決定されるという理解に基づく。Daviesら(1990) Ann. Rev. Biochem. 59:439-473。従って、抗原結合特異性は、CDR構造、互いとのそれらの相互作用、およびV領域ドメインの残りとのそれらの相互作用が注意深く維持されるヒト化抗体のみにおいて保存され得る。ベニアリング技術を使用することによって、外部(例えば、溶媒がアクセス可能な)FR残基(これは、免疫系に容易に遭遇する)は、ヒト残基と選択的に置換されて、弱い免疫原性ベニアリング表面または実質的に非免疫原性のベニアリング表面のいずれかを含むハイブリッド分子を提供する。

20

30

【0174】

ベニアリングのプロセスは、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版(U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1987)において、Kabatraによって編集されたヒト抗体可変ドメインについての利用可能な配列データを使用し、Kabataデータベースに更新され、そして他の米国および海外のアクセス可能なデータベース(核酸およびタンパク質の両方)を使用する。V領域アミノ酸の溶媒アクセス可能性は、ヒトおよびマウス抗体フラグメントについての既知の3次元構造から推定され得る。マウス抗原結合部位をベニアリングする際に2つの一般的な工程が存在する。最初に、目的の抗体分子の可変ドメインのFRが、上記の供給源から得られたヒト可変ドメインの対応するFR配列と比較される。次いで、最も相同的なヒトV領域が、対応するマウスアミノ酸と、残基ごとに比較される。ヒト対応物とは異なるマウスFRにおける残基は、当該分野において周知の組換え技術を使用して、ヒト部分に存在する残基によって置換される。残基スイッチングは、少なくとも部分的に露出した(溶媒アクセス可能である)部分を用いて実施されるのみであり、そしてV領域ドメインの三次構造に対する有意な効果を有し得るアミノ酸残基(例えば、プロリン、グリシンおよび荷電したアミノ酸)の置換において、注意がなされる

40

50

。

【0175】

この様式において、得られた「ベニアリングされた」マウス抗原結合部位は、従って、マウスCDR残基、CDRに実質的に隣接する残基、埋没したかほとんど埋没した（溶媒のアクセスが不可能）として同定された残基、重鎖ドメインと軽鎖ドメインとの間の非共有結合的な（例えば、静電的および疎水的）接触に関係すると考えられる残基、およびCDRループの「正準」三次構造に影響を与えると考えられるFRの保存された構造領域からの残基を保持するように設計される。次いで、これらの設計基準は、ヒト様FRへのマウス抗原結合部位の軽鎖および重鎖の両方のCDRを組合せる組換えヌクレオチド配列を調製するために使用され、このヒト様FRは、マウス抗体分子の抗原特異性を示す組換えヒト抗体の発現のために哺乳動物細胞をトランスフェクトするために使用され得る。

【0176】

本発明の別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、1つ以上の治療剤に結合され得る。この点に関して、適切な薬剤としては、放射性核種、分化インデューサー、薬物、毒素、およびその誘導体が挙げられる。好ましい放射性核種としては、 ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At および ^{212}Bi が挙げられる。好ましい薬物としては、メトトレキサート、ならびにピリミジンおよびプリンアナログが挙げられる。好ましい分化インデューサーとしては、ホルボールエステルおよび酪酸が挙げられる。好ましい毒素としては、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン、*Pseudomonas* 体外毒素、*Shigella* 毒素、およびアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質が挙げられる。

【0177】

治療剤は、適切なモノクローナル抗体に直接的または間接的に（例えば、リンカー基を介して）にのいずれかで結合（例えば、共有結合）され得る。薬剤と抗体との間の直接的な反応は、各々が他のものと反応し得る置換基を有する場合に可能である。例えば、一方の上の求核基（例えば、アミノ基またはスルフヒドリル基）は、他方のカルボニル含有基（例えば、酸無水物または酸ハロゲン化物）または良好な脱離基（例えば、ハロゲン化物）を含むアルキル基と反応し得る。

【0178】

あるいは、リンカー基を介して治療剤と抗体とを結合させることが所望され得る。リンカー基は、結合の可能性を妨げることを回避するために、抗体を薬剤から隔てるためのスペーサーとして機能し得る。リンカー基はまた、薬剤または抗体上の置換基の化学的反応性を増加させるために働き得、従って結合効率を増大させる。化学的反応性の増大はまた、薬剤または薬剤上の官能基の使用を促進し得る（さもなければ、可能ではない）。

【0179】

種々の二官能性または多官能性試薬、ホモ官能性とヘテロ官能性との両方（例えば、*Pierce Chemical Co.*、*Rockford*、*IL*のカタログ中に記載されるもの）が、リンカー基として使用され得ることが当業者には明らかである。結合は、例えば、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、または酸化された炭水化物残基を介してもたらされ得る。このような方法論を記載する多数の参考文献（例えば、*Rodwell*らに対する米国特許第4,671,958号）が存在する。

【0180】

本発明の免疫結合体の抗体部分がないときに治療剤がより強力である場合、細胞中へのインターナリゼーションの間に、またはその際に切断可能なリンカー基を使用することが望ましくあり得る。多数の異なる切断可能なリンカー基が記載されている。これらのリンカー基からの薬剤の細胞内放出についての機構は、ジスルフィド結合の還元（例えば、*Spitler*への米国特許第4,489,710号）、感光性結合の照射（例えば、*Senter*らへの米国特許第4,625,014号）、誘導体化されたアミノ酸側鎖の加水分解（例えば、*Kohn*らへの米国特許第4,638,045号）、血清補体媒介性加水分解（例えば、*Rodwell*らへの米国特許第4,671,958号）、および酸触媒加

水分解（例えば、Blattlerらへの米国特許第4,569,789号）による切断を含む。

【0181】

1つより多い薬剤を抗体に結合させることが望ましくあり得る。1つの実施形態において、薬剤の複数の分子が1つの抗体分子に結合される。別の実施形態において、1つより多い型の薬剤が1つの抗体に結合され得る。特定の実施形態に関わらず、1つより多い薬剤を有する免疫結合体は、種々の方法で調製され得る。例えば、1つより多い薬剤が、抗体分子に直接的に結合され得るか、または付着のための複数の部位を提供するリンカーが使用され得る。あるいは、キャリアが使用され得る。

【0182】

キャリアは、種々の方法（直接的にかまたはリンカー基を介するかのいずれかの共有結合を含む）で薬剤を保有し得る。適切なキャリアとしては、アルブミンのようなタンパク質（例えば、Katoらへの米国特許第4,507,234号）、ペプチド、およびアミノデキストランのような多糖類（例えば、Shihらへの米国特許第4,699,784号）が挙げられる。キャリアはまた、例えばリポソーム小胞内に、非共有結合によってかまたはカプセル化によって、薬剤を保有し得る（例えば、米国特許第4,429,008号および同第4,873,088号）。放射性核種薬剤に特異的なキャリアは、放射性ハロゲン化低分子およびキレート化合物を含む。例えば、米国特許第4,735,792号は、代表的な放射性ハロゲン化低分子およびそれらの合成を開示する。放射性核種キレートは、金属、または金属酸化物、放射性核種を結合するためのドナー原子として窒素原子および硫黄原子を含むものを含むキレート化合物から形成され得る。例えば、Davisonらへの米国特許第4,673,562号は、代表的なキレート化合物およびそれらの合成を開示する。

【0183】

（T細胞組成物）

別の局面において、本発明は、本明細書中に開示される腫瘍ポリペプチドに特異的なT細胞、または本明細書中に開示される腫瘍ポリペプチドの改変体もしくは誘導体に特異的なT細胞を提供する。このような細胞は、一般的に標準的手順を使用して、インビトロまたはエキソビボで調製され得る。例えば、T細胞は、市販の細胞分離システム（例えば、IsoplexTMシステム（Nexell Therapeutics, Inc.（Irvine, CA；米国特許第5,240,856号；米国特許第5,215,926号；WO89/06280；WO91/16116およびWO92/07243もまた参照のこと）から入手可能）を使用して、患者の骨髄、末梢血あるいは骨髄または末梢血の画分から単離され得る。あるいは、T細胞は、関連または無関連のヒト、非ヒト動物、細胞株または培養物から誘導され得る。

【0184】

T細胞は、ポリペプチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/またはそのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞（APC）を用いて刺激され得る。このような刺激は、目的のポリペプチドに特異的であるT細胞の生成を可能にする条件下および十分な時間、行われる。好ましくは、本発明の腫瘍ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、送達ビヒクル（例えば、ミクロスフェア）中に存在して、特定のT細胞の生成を容易にする。

【0185】

T細胞は、このT細胞が、特異的に増殖するか、サイトカインを分泌するか、または本発明のポリペプチドで被覆されるか、もしくはこのポリペプチドをコードする遺伝子が発現する標的細胞を殺傷する場合に、本発明のポリペプチドに特異的であるとみなされる。T細胞特異性は、種々の標準的技術のいずれかを使用して評価され得る。例えば、クロム放出アッセイまたは増殖アッセイにおいて、ネガティブコントロールと比較して、溶解および/または増殖における2倍を超える増加の刺激指標は、T細胞特異性を示す。このようなアッセイは、例えば、Chenら、Cancer Res. 54:1065-1070

10

20

30

40

50

、1994に記載されるように、実行され得る。あるいは、T細胞の増殖の検出は、種々の公知の技術によって達成され得る。例えば、T細胞増殖は、DNA合成の速度の増加を測定することによって検出され得る（例えば、トリチウム化チミジンでT細胞の培養物をパルス標識し、そしてDNAに取り込まれたトリチウム化チミジンの量を測定することによって）。3～7日間の腫瘍ポリペプチド（100 ng/ml～100 μg/ml、好ましくは、200 ng/ml～25 μg/ml）との接触は、代表的に、T細胞の増殖において少なくとも2倍の増加を生じる。2～3時間の上記のような接触は、標準的なサイトカインアッセイを使用して測定されるように（ここで、サイトカイン（例えば、TNFまたはIFN-）放出のレベルの2倍の増加が、T細胞の活性化を示す）、T細胞の活性化を生じるはずである（Coliganら、Current Protocols in Immunology, 第1巻、Wiley Interscience (Greene 1998)を参照のこと）。腫瘍ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド発現APCに応答して活性化されたT細胞は、CD4⁺および/またはCD8⁺であり得る。腫瘍ポリペプチド特異的T細胞は、標準的な技術を使用して拡大され得る。好ましい実施形態において、T細胞は、患者、関連するドナーまたは無関連のドナーに由来し、そして刺激および拡大後にその患者に投与される。

10

【0186】

治療目的で、腫瘍ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはAPCに応答して増殖するCD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞は、インビトロまたはインビボのいずれかで大量に拡大され得る。このようなT細胞のインビトロでの増殖は、種々の方法で達成され得る。例えば、T細胞は、T細胞増殖因子（例えば、インターロイキン-2）の添加を伴うか、または伴わずに、腫瘍ポリペプチド、またはこのようなポリペプチドの免疫原性部分に対応する短いペプチドに対して再曝露され得、そして/または腫瘍ポリペプチドを合成する刺激細胞に対して再曝露され得る。あるいは、腫瘍ポリペプチドの存在下で増殖する1つ以上のT細胞は、クローニングによって数の上で拡大され得る。細胞をクローニングするための方法は、当該分野で周知であり、そしてこれらとしては、限界希釈が挙げられる。

20

【0187】

(T細胞レセプター組成物)

T細胞レセプター(TCR)は、ジスルフィド結合によって連結されている、2つの異なる、非常に可変性のポリペプチド鎖(T細胞レセプターの鎖および鎖と呼ばれる)からなる(Janeway, Travers, Walport. Immunobiology. 第4版、148～159. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. 1999)。このヘテロダイマー(異種二量体)は、細胞膜で不変のCD3鎖と複合体化する。この複合体は、MHC分子に結合した特定の抗原性ペプチドを認識する。TCR特異性の膨大な多様性は、体細胞遺伝子再配列により、まるで免疫グロブリンの多様性のよう生成される。この鎖遺伝子は、50を超える可変性領域(V)、2つの多様性領域(D)、10を超える連結セグメント(J)、および2つの定常領域セグメント(C)を含む。鎖遺伝子は、70を超えるVセグメント、および60を超えるJセグメントを含むが、Dセグメントを含まず、そして1つのCセグメントを含む。胸腺におけるT細胞発達の間、鎖のD～J遺伝子再配列が生じ、続いて、V遺伝子セグメントのDJへの再配列が生じる。この機能的VDJエキソンは、転写され、そしてスプライシングされてCに連結される。鎖に関しては、V遺伝子セグメントは、J遺伝子セグメントに再配列して、機能的エキソンを形成し、これが次に転写され、Cにスプライシングされる。多様性は、鎖のVセグメントと、Dセグメントと、Jセグメントとの間、そして鎖のVセグメントと、Jセグメントとの間のPおよびN-ヌクレオチドの無作為な付加によって、組み換えプロセスの間にさらに増大する(Janeway, Travers, Walport. Immunobiology. 第4版、98および150. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. 1999)。

30

40

【0188】

50

本発明は、別の局面において、本明細書に開示の結腸腫瘍ポリペプチド、またはその改変体もしくは誘導体に特異的なTCRを提供する。本発明に従って、本明細書に記載の腫瘍ポリペプチドを認識する、T細胞レセプターの鎖および鎖について、V-JもしくはV-D-J接合領域、またはその部分について、ポリヌクレオチドおよびアミノ酸の配列が提供される。一般に、本発明のこの局面は、MHCの文脈において提示される腫瘍ポリペプチドを認識するか、またはそれに結合するT細胞レセプターに関する。好ましい実施形態において、T細胞レセプターによって認識される腫瘍抗原は、本発明のポリペプチドを含む。例えば、結腸腫瘍ペプチドに特異的なTCRをコードするcDNAは、標準的な分子生物学技術および組み換えDNA技術を用いて、腫瘍ポリペプチドに特異的なT細胞から単離され得る。

10

【0189】

本発明はさらに、腫瘍ポリペプチドを認識するか、またはそれに結合する、本発明のT細胞レセプターと実質的に同じ機能または活性を有する、T細胞レセプターまたはそのアナログを包含する。このようなレセプターとしては、本明細書に提供されるT細胞レセプターの、レセプターフラグメント、または本明細書に提供されるT細胞レセプターの、置換、付加、もしくは欠失の変異体が挙げられるがこれらに限定されない。本発明はまた、本明細書に提供されるT細胞レセプターに実質的に相同であるか、または実質的に同じ活性を保持する、ポリペプチドまたはペプチドを包含する。用語「アナログ」とは、本明細書に提供されるT細胞レセプターと実質的に同一のアミノ酸残基配列（ここで、1つ以上の残基、好ましくは5残基以下、より好ましくは、25残基以下が、機能的に類似の残基で保存的に置換されている）を有し、そして本明細書に記載のようなT細胞レセプターの機能的局面を示す、任意のタンパク質またはポリペプチドを含む。

20

【0190】

本発明はさらに、適切な哺乳動物宿主細胞であって、本明細書に記載のポリペプチドに特異的なTCRをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされている（これによって、この宿主細胞はこのポリペプチドに特異的にされる）、適切な哺乳動物宿主細胞、例えば、非特異的T細胞を提供する。TCRの鎖および鎖は、別々の発現ベクターに含まれ得るか、または単一の発現ベクター（これはまた、リボソーム内侵入部位（IRES）の下流の遺伝子のcap依存性翻訳のためのIRESを含む）に含まれ得る。このポリペプチドに特異的なTCRを発現するこの宿主細胞は、例えば、以下にさらに考察されるような結腸癌の養子免疫療法のために、用いられ得る。

30

【0191】

本発明のさらなる局面において、本明細書に挙げたポリペプチドに特異的なクローニングされたTCRは、結腸癌の診断のためのキットに用いられ得る。例えば、結腸腫瘍特異的TCRの核酸配列またはその一部は、生物学的サンプル中で、特定のTCRをコードする再配列された遺伝子の発現を検出するためのプローブまたはプライマーとして用いられ得る。従って、本発明はさらに、ポリペプチドに特異的なTCRをコードするメッセンジャーRNAまたはDNAを検出するためのアッセイを提供する。

【0192】

（薬学的組成物）

さらなる実施形態において、本発明は、細胞または動物への投与のための、単独でかまたは治療の1つ以上の他の様相と合わせてかのいずれかでの、薬学的に受容可能なキャリア中の本明細書中に開示される1つ以上のポリヌクレオチド、ポリペプチド、T細胞、TCR、および/または抗体組成物の処方物に関する。

40

【0193】

所望される場合、本明細書中に開示される組成物が、他の薬剤（例えば、他のタンパク質もしくはポリペプチドまたは種々の薬学的に活性な薬剤など）と組み合わせても同様に投与され得ることが、理解される。事実、さらなる薬剤が標的細胞または宿主細胞と接触した際に有意な有害な影響をもたらさないとすれば、さらに含まれ得る他の成分に実質的に制限はない。従って、この組成物は、特定の例において必要とされる種々の他の薬剤と共に

50

送達され得る。このような組成物は、宿主細胞または他の生物学的供給源から精製され得るか、あるいは、本明細書中に記載されるように化学的に合成され得る。同様に、このような組成物はさらに、置換または誘導体化されたRNA組成物またはDNA組成物を含み得る。

【0194】

従って、本発明の別の局面において、生理学的に受容可能なキャリアと組合わせた、本明細書中に記載される1つ以上のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、TCR、および/またはT細胞組成物を含む薬学的組成物が、提供される。特定の好ましい実施形態において、本発明の薬学的組成物は、予防ワクチン適用および治療ワクチン適用における使用のための、本発明の免疫原性ポリヌクレオチド組成物および/または免疫原性ポリペプチド組成物を含む。ワクチン調製物は、一般的に、例えば、M. F. PowellおよびM. J. Newman編、「Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)」、Plenum Press (NY, 1995)に記載される。一般的にこのような組成物は、1つ以上の免疫刺激剤と組合わせた、本発明のポリヌクレオチド組成物および/またはポリペプチド組成物の1つ以上を含む。

10

【0195】

本明細書中に記載される任意の薬学的組成物が、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学的に受容可能な塩を含み得ることは、明らかである。このような塩は、例えば、薬学的に受容可能な非毒性の塩基（有機塩基（例えば、一級アミン、二級アミンおよび三級アミンならびに塩基性アミノ酸の塩）および無機塩基（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩）を含む）から調製され得る。

20

【0196】

別の実施形態において、本発明の例示的な免疫原性組成物（例えば、ワクチン組成物）は、上記のようなポリペプチドの1つ以上をコードするDNAを含み、その結果このポリペプチドは、インサイチュで生成される。上記のように、ポリヌクレオチドは、当業者に公知の種々の送達系の内のいずれかで投与され得る。実際、多数の遺伝子送達技術（例えば、Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15: 143-198, 1998およびこの中に引用される参考文献に記載される遺伝子送達技術）が、当該分野で周知である。当然、適切なポリヌクレオチド発現系は、患者における発現のための必要な調節性のDNA調節配列（例えば、適切なプロモーターおよび終結シグナル）を含む。あるいは、細菌送達系は、その細胞表面上にポリペプチドの免疫原性部分を発現するか、またはエピトープなどを分泌する細菌（例えば、Bacillus-Calmette-Guerrin）の投与を含み得る。

30

【0197】

従って、特定の実施形態において、本明細書中に記載される免疫原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、多数の公知のウイルスに基づく系のうちのいずれかを用いて、発現のための適切な哺乳動物宿主細胞に導入される。1つの例示的な実施形態において、レトロウイルスが、遺伝子送達系のための簡便かつ有効な基盤を提供する。本発明のポリペプチドをコードする選択されたヌクレオチド配列は、当該分野で公知の技術を用いて、ベクターに挿入され得、そしてレトロウイルス粒子にパッケージングされ得る。次いで、組換えウイルスが、単離され、そして被験体に送達され得る。多数の例示的なレトロウイルス系が、記載されている（例えば、米国特許第5,219,740号；MillerおよびRosman (1989) BioTechniques 7: 980-990；Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1: 5-14；Scarpaら (1991) Virology 180: 849-852；Burnsら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8033-8037；ならびにBoris-LawrieおよびTemin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3: 102-109）。

40

50

【0198】

さらに、多数の例示的なアデノウイルスに基づく系もまた、記載されている。宿主ゲノムに組込むレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、染色体外に残り、このようにして、挿入変異誘発に関連する危険性を最小化する (Haj-Ahmad および Graham (1986) *J. Virol.* 57: 267-274; Bettr (1993) *J. Virol.* 67: 5911-5921; Mittereder (1994) *Human Gene Therapy* 5: 717-729; Seth (1994) *J. Virol.* 68: 933-940; Barr (1994) *Gene Therapy* 1: 51-58; Berkner, K. L. (1988) *BioTechniques* 6: 616-629; ならびに Rich (1993) *Human Gene Therapy* 4: 461-476)。

【0199】

種々のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター系もまた、ポリヌクレオチド送達に関して開発されている。AAVベクターは、当該分野で周知の技術を用いて容易に構築され得る。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号; 国際公開番号WO 92/01070およびWO 93/03769; Lebkowski (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8: 3988-3996; Vincent (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3: 533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158: 97-129; Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5: 793-801; Shelling および Smith (1994) *Gene Therapy* 1: 165-169; ならびに Zhou (1994) *J. Exp. Med.* 179: 1867-1875を参照のこと。

【0200】

遺伝子移入による、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送達するのに有用なさらなるウイルスベクターとしては、ポックスウイルスのファミリー (例えば、ワクシニアウイルスおよび鳥類ポックスウイルス) から誘導されるものが挙げられる。例として、新規分子を発現するワクシニアウイルスの組換え体は、以下のように構築され得る。ポリペプチドをコードするDNAを最初に、ワクシニアプロモーターおよび隣接ワクシニアDNA配列 (例えば、チミジンキナーゼ (TK) をコードする配列) に隣接するように、適切なベクターに挿入する。次いで、このベクターを使用して、ワクシニアで同時に感染させる細胞にトランスフェクトする。相同組換えによって、ワクシニアプロモーターおよび目的のポリペプチドをコードする遺伝子を、ウイルスゲノムに挿入する。生じるTK^{sup} (-)組換え体を、5-プロモデオキシウリジンの存在下でこの細胞を培養し、そして5-プロモデオキシウリジンに耐性のウイルスプラークをピックアップすることによって、選択し得る。

【0201】

ワクシニアに基づく感染/トランスフェクション系は、生物の宿主細胞における、本明細書中に記載される1つ以上のポリペプチドの誘導可能な一過性発現または同時発現を提供するために、好都合に使用され得る。この特定の系において、細胞を最初に、インビトロで、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルスの組換え体で感染させる。このポリメラーゼは、それがT7プロモーターを保有するテンプレートのみを転写する点で、鋭敏な特異性を示す。感染後、細胞を、T7プロモーターによって駆動される目的のポリヌクレオチドでトランスフェクトさせる。ワクシニアウイルスの組換え体から細胞質中で発現されるポリメラーゼは、トランスフェクトされたDNAをRNAに転写し、このRNAは次いで、宿主翻訳機構によってポリペプチドに翻訳される。この方法は、大量のRNAおよびその翻訳産物の、高レベルで一過性の細胞質産生を提供する。例えば、Elroy-Stein および Moss, *Proc. Natl. Aca*

d . S c i . U S A (1 9 9 0) 8 7 : 6 7 4 3 - 6 7 4 7 ; F u e r s t ら、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 8 6) 8 3 : 8 1 2 2 - 8 1 2 6 を参照のこと。

【 0 2 0 2 】

あるいは、アビポックスウイルス (a v i p o x v i r u s) (例 えば、鶏痘ウイルスおよびカナリア痘ウイルス) もまた使用されて、目的のコード配列を送達し得る。哺乳動物病原体由来の免疫原を発現する組換えアビポックスウイルスは、非鳥類種に投与された場合に、防御免疫を与えることが公知である。アビポックスベクターの使用は、ヒトおよび他の哺乳動物種において特に望ましい。なぜなら、アビポックス属のメンバーは、感受性の鳥類種においてのみ生産的に複製し得、故に、哺乳動物細胞において感染性ではないからである。組換えアビポックスウイルスを産生するための方法は、当該分野で公知であり、そしてワクシニアウイルスの産生に関して上記に記載されるように、遺伝子組換えを使用する。例えば、W O 9 1 / 1 2 8 8 2 ; W O 8 9 / 0 3 4 2 9 ; および W O 9 2 / 0 3 5 4 5 を参照のこと。

10

【 0 2 0 3 】

任意の多数のアルファウイルスベクターもまた、本発明のポリヌクレオチド組成物の送達のために使用され得、これらとしては、米国特許第 5 , 8 4 3 , 7 2 3 号 ; 同第 6 , 0 1 5 , 6 8 6 号 ; 同第 6 , 0 0 8 , 0 3 5 号 および 同第 6 , 0 1 5 , 6 9 4 号 に記載されるベクターが挙げられる。ベネズエラウマ脳脊髄炎 (V E E) に基づく特定のベクターもまた、使用され得、この例示的な例は、米国特許第 5 , 5 0 5 , 9 4 7 号 および 同第 5 , 6 4 3 , 5 7 6 号 に見出され得る。

20

【 0 2 0 4 】

さらに、分子結合体化ベクター (例 えば、M i c h a e l ら、J . B i o l . C h e m . (1 9 9 3) 2 6 8 : 6 8 6 6 ~ 6 8 6 9 および W a g n e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 9 2) 8 9 : 6 0 9 9 ~ 6 1 0 3 に記載のアデノウイルスキメラベクター) もまた、本発明における遺伝子送達に用いられ得る。

【 0 2 0 5 】

これらおよび他の公知のウイルスベースの送達系に対するさらなる例示的情報は、例えば、以下に見出され得る : F i s h e r - H o c h ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 3 1 7 ~ 3 2 1、1 9 8 9 ; F l e x n e r ら、A n n . N . Y . A c a d . S c i . 5 6 9 : 8 6 ~ 1 0 3、1 9 8 9 ; F l e x n e r ら、V a c c i n e 8 : 1 7 ~ 2 1、1 9 9 0 ; 米国特許第 4 , 6 0 3 , 1 1 2 号、同第 4 , 7 6 9 , 3 3 0 号 および 同第 5 , 0 1 7 , 4 8 7 号 ; W O 8 9 / 0 1 9 7 3 ; 米国特許第 4 , 7 7 7 , 1 2 7 号 ; G B 2 , 2 0 0 , 6 5 1 : E P 0 , 3 4 5 , 2 4 2 号 ; W O 9 1 / 0 2 8 0 5 ; B e r k n e r、B i o t e c h n i q u e s 6 : 6 1 6 ~ 6 2 7、1 9 8 8 ; R o s e n f e l d ら、S c i e n c e 2 5 2 : 4 3 1 ~ 4 3 4、1 9 9 1 ; K o l l s ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 1 : 2 1 5 ~ 2 1 9、1 9 9 4 ; K a s s - E i s l e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 1 1 4 9 8 ~ 1 1 5 0 2、1 9 9 3 ; G u z m a n ら、C i r c u l a t i o n 8 8 : 2 8 3 8 ~ 2 8 4 8、1 9 9 3 ; ならびに G u z m a n ら、C i r . R e s . 7 3 : 1 2 0 2 ~ 1 2 0 7、1 9 9 3。

30

40

【 0 2 0 6 】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドを標的細胞のゲノムに組み込み得る。この組み込みは、相同組み換え (遺伝子置換) を介して特定の位置および方向であり得るか、または無作為な非特異的位置に組み込まれ得る (遺伝子増大)。なおさらなる実施形態において、ポリヌクレオチドは DNA の別のエピソームセグメントとして細胞において安定に維持され得る。このようなポリヌクレオチドセグメントすなわち「エピソーム」は、宿主細胞の周期に独立してまたは同調して維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物が細胞に送達され、そしてこの細胞中にこのポリヌクレオチドが残る様式は、使用される発現構築物のタイプに依存する。

50

【0207】

本発明の別の実施形態において、例えば、Ulmerら、Science 259:1745~1749、1993に記載され、そしてCohen、Science 259:1691~1692、1993によって概説されるように、ポリヌクレオチドは、「裸の」DNAとして投与/送達される。裸のDNAの取り込みは、生分解性ビーズ（これは、細胞に効率的に輸送される）上にそのDNAをコーティングすることによって増加され得る。

【0208】

なお別の実施形態において、本発明の組成物は、微粒子銃アプローチ（その多くが記載されている）を介して送達され得る。1つの代表的な例において、ガス駆動粒子加速（gas-driven acceleration）は、Powderject Pharmaceuticals PLC（Oxford, UK）およびPowderject Vaccines Inc.（Madison, WI）によって製造されたデバイスのようなデバイスで達成され得る。そのいくつかの例は、米国特許第5,846,796号；同第6,010,478号；同第5,865,796号；同第5,584,807号；および欧州特許番号第0500799号に記載されている。このアプローチは、注射針のない（無注射針）（ニードルフリー）送達アプローチを提供する。ここでは、微視的な粒子（例えば、ポリヌクレオチド粒子、またはポリペプチド粒子）の乾燥粉末処方物を、手持ちデバイスによって生成されたヘリウムガスジェット内で高速に加速し、目的の標的組織内へ粒子を噴射する。

【0209】

関連の実施形態において、本発明の組成物のガス駆動注射針なし注入に有用であり得る他のデバイスおよび方法は、Bioject, Inc.（Portland, OR）によって提供されるものが挙げられ、そのいくつかの例は、米国特許第4,790,824号；同第5,064,413号；同第5,312,335号；同第5,383,851号；同第5,399,163号；同第5,520,639号；および同第5,993,412号に記載されている。

【0210】

別の実施形態に従って、本明細書に記載される薬学的組成物は、本発明の免疫原性ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、T細胞、TCR、および/またはAPCの組成物に加えて、1つ以上の免疫賦活剤（免疫刺激因子）を含む。免疫賦活剤とは、本質的に、外因性抗原に対する免疫応答（抗体および/または細胞媒介）を増大または増強する任意の物質をいう。免疫賦活剤の1つの好ましい型は、アジュバントを含む。多くのアジュバントは、迅速な異化作用から抗原を保護するように設計された物質（例えば、水酸化アルミニウムまたは鉱油）および免疫応答の刺激物質（例えば、脂質A、Bordetella pertussisまたはMycobacterium tuberculosis誘導化タンパク質）を含む。特定のアジュバント、例えば、フロイント不完全アジュバントおよびフロイント完全アジュバント（Difco Laboratories, Detroit, MI）；Merck Adjuvant 65（Merck and Company, Inc., Rahway, NJ）；AS-2（SmithKline Beecham, Philadelphia, PA）；アルミニウム塩（例えば、水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウム）；カルシウム、鉄または亜鉛の塩；アシル化チロシンの不溶性懸濁液；アセチル化糖；カチオンの誘導化多糖またはアニオンの誘導化多糖；ポリフォスファゼン（polyphosphazene）；生分解性ミクロスフェア；モノホスホリル脂質Aおよびモノホスホリルクイル（quill）Aとして、市販されている。サイトカイン（例えば、GM-CSF、インターロイキン-2、インターロイキン-7、インターロイキン-12および成長因子のような他のもの）はまた、アジュバントとして使用され得る。

【0211】

本発明の特定の実施形態において、アジュバント組成物は、Th1型の免疫応答を優勢に

10

20

30

40

50

誘導するものが好ましい。高レベルのTh1型サイトカイン（例えば、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2およびIL-12）は、投与される抗原に対する細胞媒介性応答の誘導を支持する傾向がある。対照的に、高レベルのTh2型サイトカイン（例えば、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10）は、体液性免疫応答の誘導を支持する傾向がある。本明細書中に提供されるようなワクチンの適用の後、患者は、Th1型応答およびTh2型応答を含む免疫応答を支持する。応答が優勢にTh1型である好ましい実施形態において、Th1型サイトカインのレベルは、Th2型サイトカインのレベルより高い程度まで増加する。これらのサイトカインのレベルは、標準的アッセイを使用して容易に評価され得る。サイトカインのファミリーの概説については、MosmannおよびCoffman、Ann. Rev. Immunol. 7: 145~173、1989を参照のこと。

10

【0212】

Th1型優勢の応答を誘発するための特定の好ましいアジュバントは、例えば、モノホスホリルリピドA、好ましくは3-de-O-アシル化モノホスホリルリピドAとアルミニウム塩との組み合わせを含む。MPL（登録商標）アジュバントは、Corixa Corporation（Seattle, WA；例えば、米国特許第4,436,727号；同第4,877,611号；同第4,866,034号および同第4,912,094号を参照のこと）から入手可能である。CpG含有オリゴヌクレオチド（ここで、CpGジヌクレオチドはメチル化されていない）はまた、Th1優勢の応答を誘導する。このようなオリゴヌクレオチドは周知であり、そして例えばWO96/02555、WO99/33488ならびに米国特許第6,008,200号および同第5,856,462号に記載される。免疫賦活剤DNA配列がまた、例えば、Satoら、Science 273: 352, 1996によって記載される。別の好ましいアジュバントは、サポニン（例えば、Quil A）、またはその誘導體（QS21およびQS7（Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA）を含む）；Escin；Digitonin（ジギトニン）；またはGypsophilaもしくはChenopodium quinoaサポニンを含む。他の好ましい処方物としては、本発明のアジュバントの組み合わせ、例えば、QS21、QS7、Quil A、 α -エスシン、またはジギトニンを含む以下の軍のうち少なくとも2つの組み合わせ、において1つより多いサポニンを含む。

20

【0213】

あるいは、このサポニン処方物は、キトサン、または他のポリカチオン性ポリマーからなるワクチンビヒクル、ポリラクチドおよびポリラクチド-co-グリコリド粒子、ポリ-N-アセチルグルコサミンベースのポリマーマトリックス、ポリサッカライドまたは化学的に改変されたポリサッカライドからなる粒子、リポソームおよび脂質ベースの粒子、グリセロールモノエステルからなる粒子、などと組み合わせられ得る。サポニンはまた、コレステロールの存在下で処方されて、リポソームまたはISCOMのような粒子構造を形成し得る。さらに、サポニンは、非粒子的溶液もしくは懸濁液で、または小数層リポソームもしくはISCOMのような粒子状構造のいずれかで、ポリオキシエチレンエーテルまたはエステルと一緒に処方され得る。サポニンはまた、Carbopol（登録商標）のような賦形剤と一緒に処方されて、粘度を増大され得るか、またはラクトースのような粉末賦形剤とともに乾燥粉末形態に処方され得る。

30

40

【0214】

1つの好ましい実施形態において、アジュバント系は、モノホスホリルリピドAとサポニン誘導體との組み合わせ（例えば、WO94/00153に記載されるような、QS21と3D-MPL（登録商標）アジュバントとの組み合わせ、またはWO96/33739に記載されるような、QS21がコレステロールでクエンチ（quench）される、あまり反応発生的（reactogenic）でない組成物）を含む。他の好ましい処方物は、水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含む。水中油型エマルジョン中のQS21、3D-MPL（登録商標）アジュバントおよびトコフェロールを使用する、別の特に好ましいアジュバント処方物は、WO95/17210に記載されている。

50

【0215】

別の強化されたアジュバント系は、CpG含有オリゴヌクレオチドとサポニン誘導体の組み合わせを含み、特にCpGとQS21の組み合わせがWO00/09159に開示されている。好ましくは、この処方物は、さらに、水中油型エマルジョンおよびトコフェノールを含む。

【0216】

本発明の薬学的組成物における使用のためのさらなる代表的アジュバントとしては、Montanide ISA 720 (Seppic, France)、SAF (Chiron, California, United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、アジュバントのSBASシリーズ (例えば、SBAS-2 またはSBAS-4 (SmithKline Beecham, Rixensart, Belgiumから入手可能)、Detox (Enhanzyn (登録商標)) (Corixa, Hamilton, MT)、RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) および他のアミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート (AGP) (例えば、係属中の米国出願登録番号08/853,826および09/074,720 (これらの開示は、その全体が本明細書中に参考として援用される) に記載されるアジュバント)、ならびにWO 99/52549A1に記載のポリオキシエチレンエーテルアジュバントのようなアジュバントが挙げられる。

【0217】

他の好ましいアジュバントは、一般式：



のアジュバント分子を含み、

ここで、nは、1~50であり、Aは、単結合または-C(O)-であり、Rは、C₁₋₅₀アルキルまたはフェニルC₁₋₅₀アルキルである。

【0218】

本発明の1つの実施形態は、一般式(I)のポリオキシエチレンエーテルを含むワクチン処方物からなり、ここで、nは、1と50との間、好ましくは4~24、最も好ましくは9であり、このR成分は、C₁₋₅₀、好ましくはC₄~C₂₀アルキル、そして最も好ましくはC₁₂アルキルであり、そしてAは、結合である。ポリオキシエチレンエーテルの濃度は、0.1~20%の範囲、好ましくは0.1~10%、そして最も好ましくは0.1~1%の範囲にあるべきである。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウロイルエーテル、ポリオキシエチレン-9-ステアリル (stearyl) エーテル、ポリオキシエチレン-8-ステアリル (stearyl) エーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。ポリオキシエチレンラウリルエーテルのようなポリオキシエチレンエーテルは、Merck インデックス (第12版、7717項目) に記載される。これらのアジュバント分子は、WO99/52549に記載される。

【0219】

上記の一般式(I)に従うポリオキシエチレンエーテルは、所望の場合、別のアジュバントと組み合わせられ得る。例えば、好ましいアジュバントの組み合わせは、好ましくは、係属中の英国特許出願第GB9820956.2号に記載されるようなCpGとの組み合わせである。

【0220】

本発明の別の実施形態に従って、本明細書に記載される免疫原性組成物は、抗原提示細胞 (APC) (例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球、および有効なAPCであるように操作され得る他の細胞) を介して宿主に送達される。このような細胞は、抗原を提示する能力を増大するように、T細胞応答の活性化および/または維持を改良するように、それ自体で抗腫瘍効果を有するように、そして/あるいは受け手と免疫学的に適合性 (すなわち、一致するHLAハプロタイプ) であるように遺伝学的に改変されてもよい

が、改変される必要はない。APCは、一般に、種々の生物学的な流体および器官（腫瘍および腫瘍周辺組織を含む）のいずれかから単離されてもよいし、そして自己細胞、同種異系細胞、同系細胞、または異種細胞であってもよい。

【0221】

本発明の特定の好ましい実施形態は、抗原提示細胞として、樹状細胞またはその前駆細胞を使用する。樹状細胞は、高度に強力なAPCであり（BancheureauおよびSteinman、Nature 392:245-251、1998）、そして予防的または治療的な抗腫瘍免疫性を誘発するための生理学的アジュバントとして有効であることが示されてきた（TimmermanおよびLevy、Ann. Rev. Med. 50:507-529、1999を参照のこと）。一般に、樹状細胞は、それらの代表的な形状（インサイチュでは星状、インピトロでは目に見える顕著な細胞質プロセス（樹状突起）を有する）、高い効率で抗原を取り込み、プロセッシングし、そして提示するそれらの能力、およびナイーブな（naive）T細胞応答を活性化するそれらの能力に基づいて同定され得る。もちろん樹状細胞は、インピボまたはエキソピボで樹状細胞上に通常見出されない特定の細胞表面レセプターまたはリガンドを発現するように操作され得、このような改変樹状細胞は本発明によって意図される。樹状細胞の代替として、分泌小胞抗原装荷樹状細胞（secreted vesicles antigen-loaded dendritic cell）（エキソソーム（exosome）と呼ばれる）がワクチン内で使用され得る（Zitvogelら、Nature Med. 4:594-600、1998を参照のこと）。

10

20

【0222】

樹状細胞および前駆細胞は、末梢血、骨髄、腫瘍浸潤細胞、腫瘍周辺組織浸潤細胞、リンパ節、脾臓、皮膚、臍帯血、または他の任意の適切な組織もしくは流体から得られ得る。例えば、樹状細胞は、末梢血から収集された単球の培養物に、GM-CSF、IL-4、IL-13および/またはTNFのようなサイトカインの組み合わせを添加することによってエキソピボで分化され得る。あるいは、末梢血、臍帯血または骨髄から収集されたCD34陽性細胞は、培養培地にGM-CSF、IL-3、TNF、CD40リガンド、LPS、flt3リガンドおよび/または樹状細胞の分化、成熟、および増殖を誘導する他の化合物の組み合わせを添加することによって、樹状細胞に分化され得る。

30

【0223】

樹状細胞は、「未熟」細胞および「成熟」細胞として都合良く分類され、このことは、2つの充分に特徴付けられた表現型の間を単純な方法で区別するのを可能にする。しかしこの命名は、あらゆる可能な分化の中間段階を排除すると解釈されるべきではない。未熟な樹状細胞は、抗原の取り込みおよびプロセッシングの高い能力を有するAPCとして特徴付けられ、この能力は、Fcレセプターおよびマンノースレセプターの高度な発現と相関する。成熟表現型は、代表的に、クラスIおよびクラスII MHC、接着分子（例えば、CD54およびCD11）ならびに同時刺激性分子（例えば、CD40、CD80、CD86および4-1BB）のようなT細胞活性化を担う細胞表面分子の高度な発現ではなく、これらのマーカーのより低い発現によって特徴付けられる。

40

【0224】

APCは、一般に、本発明のポリヌクレオチド（またはその部分もしくは他の改変体）を用いてトランスフェクトされ得、その結果、このコードされたポリペプチドまたはその免疫原性部分が細胞表面上に発現される。このようなトランスフェクションはエキソピボで生じ得、次いでこのようなトランスフェクトされた細胞を含む薬学的組成物は、本明細書中に記載されるように、治療目的のために使用され得る。あるいは、樹状細胞または他の抗原提示細胞を標的とする遺伝子送達ビヒクルが、患者に投与され得、インピボで起こるトランスフェクションを生じる。樹状細胞のインピボおよびエキソピボでのトランスフェクションは、例えば、WO97/24447に記載される方法、またはMahviら、Immunology and Cell Biology 75:456-460、1997によって記載される遺伝子銃アプローチのような当該分野で公知の任意の方法を使用

50

して一般に実施され得る。樹状細胞の抗原ローディングは、樹状細胞または前駆細胞を、腫瘍ポリペプチド、DNA（裸のもしくはプラスミドベクター中の）またはRNA；あるいは抗原発現性組換え細菌またはウイルス（例えば、牛痘、鶏痘、アデノウイルスまたはレンチウイルスのベクター）とインキュベートすることによって達成され得る。ローディングの前に、ポリペプチドは、T細胞補助を提供する免疫学的パートナー（例えば、キャリア分子）に共有結合され得る。あるいは、樹状細胞は、別々にまたはポリペプチドの存在下で、結合していない免疫学的パートナーでパルスされ得る。

【0225】

当業者に公知の任意の適切なキャリアが、本発明の薬学的組成物において使用され得るが、このタイプのキャリアは、代表的に投与の様式に依存して変化する。本発明の組成物は、投与の任意の適切な様式、例えば、局所投与、経口投与、経鼻投与、粘膜投与、静脈投与、頭蓋内投与、腹腔内投与、皮下投与、および筋肉内投与を含む様式のために処方され得る。

10

【0226】

このような薬学的組成物内での使用のためのキャリアは、生体適合性であり、そしてまた生分解性であり得る。特定の実施形態において、好ましくは、この処方物は比較的一定レベルの活性成分の放出を提供する。しかし、他の実施形態において、投与直後のより迅速な放出速度が所望され得る。このような組成物の処方十分に、公知の技術を使用する当業者のレベル内である。この点に関して有用な例示的なキャリアとしては、ポリ（ラクチド-c o -グリコリド）、ポリアクリレート、ラテックス、デンプン、セルロース、デキストランなどの微粒子が挙げられる。他の例示的な徐放性キャリアとしては、非液性（non-liquid）親水性コア（例えば、架橋ポリサッカリドまたはオリゴサッカリド）を含む超分子バイオベクター、ならびに必要に応じて、両親媒性化合物を含む外部層（例えば、リン脂質）（例えば、米国特許第5,151,254号およびPCT出願WO94/20078、WO/94/23701およびWO96/06638を参照のこと）を含む超分子バイオベクターが挙げられる。徐放性処方物内に含まれる活性な化合物の量は、移植の部位、放出の速度および予期される持続期間、ならびに処置または予防されるべき状態の性質に依存する。

20

【0227】

別の例示的な実施形態において、生分解性マイクロスフェア（例えば、ポリ乳酸ポリグリコレート）は、本発明の組成物のためのキャリアとして使用される。適切な生分解性マイクロスフェアは、例えば、米国特許第4,897,268号；同第5,075,109号；同第5,928,647号；同第5,811,128号；同第5,820,883号；同第5,853,763号；同第5,814,344号；同第5,407,609号および同第5,942,252号に開示される。改変B型肝炎コアタンパク質キャリア系（例えば、WO/99 40934およびそこで引用される参考文献に記載されるような系）もまた、多くの用途に有用である。別の例示的なキャリア/送達系は、キャリア含有粒子-タンパク質複合体（例えば、米国特許第5,928,647号に記載される複合体）を使用し、これは、宿主においてクラスI拘束細胞傷害性Tリンパ球応答を誘導し得る。

30

【0228】

別の例示的な実施形態において、リン酸カルシウムコア粒子が、キャリア、ワクチンアジュバントとして、または本発明の組成物のための徐放性マトリクスとして使用される。例示的なリン酸カルシウム粒子は、例えば、公開特許出願WO/0046147に開示されている。

40

【0229】

本発明の薬学的組成物はしばしば、1つ以上の、緩衝剤（例えば、中性の緩衝化生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水）；糖質（例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン）；マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはアミノ酸（例えば、グリシン）；抗酸化剤；静菌剤；キレート剤（例えば、EDTAまたはグルタチオン）；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；処方物をレシピエントの血液に対

50

して等張性、低張性または弱く高張性にする溶質；懸濁剤；濃化剤および／または保存剤をさらに含む。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として処方され得る。

【0230】

本明細書中に記載される薬学的組成物は、単回用量容器または多用量容器（例えば、密閉アンプルまたはバイアル）中に存在し得る。このような容器は、代表的に、使用まで処方物の無菌性および安定性を維持するような様式で、密封される。一般に、処方物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクル中の、懸濁液、溶液またはエマルジョンとして保存され得る。あるいは、薬学的組成物は、使用の直前に無菌水性キャリアの添加のみを必要とする、凍結乾燥状態で保存され得る。

【0231】

様々な処置レジメンにおいて本明細書中で記載される特定の組成物を使用するための適切な投薬レジメンおよび処置レジメン（例えば、経口、非経口、静脈内、鼻腔内、および筋肉内の投与および処方を含む）の開発は、当該分野で周知であり、これらのいくつかは、一般的な例示目的のために以下で簡単に考察される。

【0232】

特定の用途において、本明細書中で開示される薬学的組成物は、経口投与によって動物に送達され得る。このように、これらの組成物は、不活性希釈剤と共にかまたは同化可能食用キャリアと共に処方され得るか、あるいはこれらの組成物は、硬質または軟質殻ゼラチンカプセルに入れられ得るか、あるいはこれらの組成物は錠剤に圧縮され得るか、あるいはこれらの組成物は食餌の食品に直接組み込まれ得る。

【0233】

活性化合物は、さらに賦形剤と共に組み込まれ得、そして経口摂取錠剤、経頬粘膜錠剤、トローチ、カプセル剤、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハなどの形態で使用される（例えば、Mathiowitzら、Nature 1997 Mar 27; 386 (6623): 410-4; Hwangら、Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1998; 15(3): 243-84; 米国特許第5,641,515号; 米国特許第5,580,579号および米国特許第5,792,451号を参照のこと）。錠剤、トローチ、丸剤、カプセル剤などはまた、任意の種々のさらなる成分を含み得、例えば、結合剤（例えば、トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、リン酸二カルシウム）；崩壊剤（例えば、コーンスターチ、ポテトデンプン、アルギン酸など）；潤沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム）；および甘味料（例えば、スクロース、ラクトースまたはサッカリン）または香料（例えば、ペパーミント、ウインターグリーン油、またはチェリー香料）が添加され得る。投薬量単位形態がカプセル剤である場合、これは上記のタイプの材料に加えて液体キャリアを含み得る。様々な他の材料が、コーティングとして存在し得るか、またはそうでなければ投薬単位の物理的形態を改変し得る。例えば、錠剤、丸剤またはカプセル剤は、セラック、糖またはその両方でコーティングされ得る。もちろん、任意の投薬単位形態を調製する際に使用される任意の材料は、薬学的に純粋でありかつ用いられる量で実質的に非毒性でなければならない。さらに、活性化合物が、持続性放出調製物および処方物に組み込まれ得る。

【0234】

代表的に、これらの処方物は、少なくとも約0.1%またはそれよりも多い活性化合物を含むが、活性成分の割合は、もちろん、変化し得、そして好都合に、全処方物の重量または体積の約1または2%と、約60%または70%以上のとの間であり得る。当然、治療的に有用な組成物の各々の中の活性化合物の量は、適切な投薬量が、化合物の任意の所定の単位用量において得られるような様式で、調製され得る。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与の経路、製品の有効期限のような因子、および他の薬理的考慮が、このような薬学的処方物を調製する分野の当業者によって意図され、そして、種々の投薬量および処置レジメンはそれ自体が、所望され得る。

【0235】

10

20

30

40

50

あるいは、経口投与について、本発明の組成物は、うがい薬、歯みがき剤、バツカル錠、経口スプレー、または舌下経口投与処方物の形態で、1つ以上の賦形剤と混合され得る。あるいは、活性成分は、経口溶液（例えば、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび炭酸水素カリウムを含む溶液）に組み込まれ得るか、または歯みがき剤に分散され得るか、または治療的有効量で、水、結合剤、研磨剤、香料、発泡剤、および湿潤剤を含み得る組成物に添加され得る。あるいは、これらの組成物は、舌下に置かれ得るか、そうでなければ口の中で溶解され得る錠剤形態または溶液形態に成形され得る。

【0236】

特定の状況において、本明細書中で開示される薬学的組成物を、非経口送達、静脈内送達、筋肉内送達またはさらに腹腔内送達することが所望される。このようなアプローチは、当業者に周知であり、これらのいくつかは例えば、例えば、米国特許第5,543,158号；米国特許第5,641,515号および米国特許第5,399,363号にさらに記載される。特定の実施形態において、遊離塩基または薬学的に受容可能な塩としての活性化化合物の溶液は、界面活性剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース）と適切に混合された水中で調製され得る。分散物もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、ならびにオイル中で調製され得る。保存および使用の通常条件下で、これらの調製物は一般に、微生物の増殖を防止するために、防腐剤を含む。

【0237】

注入用途のために適切な例示的な薬学的形態として、滅菌水性液剤または分散物および滅菌注射用液剤または分散物の即時調製のための滅菌散剤が挙げられる（例えば、米国特許第5,466,468号を参照のこと）。全ての場合において、その形態は、滅菌でなければならない、そして容易に注射することができる程度に、流動性でなければならない。それは、製造および保存の条件下で安定でなければならない、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保存されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および/もしくは植物油を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散物の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、そして/または界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン（paraben）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）によって促進され得る。多くの場合において、等張剤（例えば、糖または塩化ナトリウム）を含めることが、望ましい。注射可能な組成物の長期にわたる吸収は、組成物中での吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の使用によって、もたらされ得る。

【0238】

一実施形態において、水溶液の非経口投与のために、必要ならばその溶液は、適切に緩衝化されるべきであり、そして液体希釈剤が、最初に、十分な生理食塩水またはグルコースで等張にされる。これらの特定の水溶液は、特に、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、および腹腔内投与に適切である。これに関連して、使用され得る滅菌水性媒体は、本開示の観点から当業者に公知である。例えば、一投与量は、1mlの等張性NaCl溶液に溶解され得、そして1000mlの皮下注入流体に添加され得るか、または注入予定部位で注入され得るかのいずれかである（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第15版、1035~1038頁および1570~1580頁を参照のこと）。投薬量におけるいくらかの変化が、処置される被験体の状態に依存して、必然的に生じる。さらに、ヒト投与について、調製物は、もちろん、FDA Office of Biologics standardsによって要求されるような、無菌性、発熱性、ならびに一般的な安全性標準および純度標準を好ましく満たす。

【0239】

本発明の別の実施形態において、本明細書中で開示される組成物は、中性形態または塩形

態で処方され得る。例示的な薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基とともに形成される）が挙げられ、そしてこれらの塩は、無機酸（例えば、塩酸またはリン酸）、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸とともに形成される。遊離カルボキシル基とともに形成される塩もまた、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化鉄）、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導され得る。処方の際に、溶液は、投薬処方物と適合する様式でかつ治療的に有効な量で投与される。

【0240】

キャリアは、任意および全ての溶媒、分散媒体、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収を遅延させる薬剤、緩衝液、キャリア溶液、懸濁液、コロイドなどをさらに含み得る。薬学的活性物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来媒体または薬剤が、活性成分と不適合である場合を除いては、治療組成物におけるその使用が、企図される。補助的活性成分もまた、これらの組成物に組み込まれ得る。句「薬学的に受容可能な」とは、ヒトに投与される場合に、アレルギー反応または類似の厄介な反応を生じない分子実体および組成物をいう。

10

【0241】

特定の実施形態において、薬学的組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および/または他のエアロゾル送達ビヒクルによって送達され得る。遺伝子、核酸およびペプチド組成物を、経鼻エアロゾルスプレーを介して肺に直接送達するための方法は、例えば、米国特許第5,756,353号および米国特許第5,804,212号に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂（Takenagaら、*J Controlled Release* 1998 Mar 2; 52(1-2): 81-7）およびリゾホスファチジル-グリセロール化合物（米国特許第5,725,871号）を使用する薬物の送達はまた、薬学分野で周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態での例示的な経粘膜薬物送達は、米国特許第5,780,045号に記載される。

20

【0242】

特定の実施形態において、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、脂質粒子、小胞などを、適切な宿主細胞/生物への本発明の組成物の導入のために使用する。特に、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフィア、またはナノ粒子などのいずれかにカプセル化して送達するために処方され得る。あるいは、本発明の組成物は、このようなキャリアビヒクルの表面に、共有結合的または非共有結合的のいずれかで結合され得る。

30

【0243】

潜在的な薬物キャリアとしてのリポソームおよびリポソーム様調製物の形成および使用は一般に、当業者に公知である（例えば、*Lasic, Trends Biotechnol* 1998 Jul; 16(7): 307-21; *Takakura, Nippon Rinsho* 1998 Mar; 56(3): 691-5; *Chandranら, Indian J Exp Biol*. 1997 Aug; 35(8): 801-9; *Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1995; 12(2-3): 233-61; 米国特許第5,567,434号; 米国特許第5,552,157号; 米国特許第5,565,213号; 米国特許第5,738,868号および米国特許第5,795,587号（これらの各々は、その全体が本明細書中で参考として詳細に援用される）を参照のこと）。

40

【0244】

リポソームは、T細胞懸濁液、初代肝細胞培養物およびPC12細胞を含む他の手順によるトランスフェクションが通常困難である多くの細胞型とともに、首尾よく使用されている（*Renneisenら, J Biol Chem*. 1990 Sep 25; 265(27): 16337-42; *Mullerら, DNA Cell Biol*. 1990 Apr; 9(3): 221-9）。さらに、リポソームは、ウイルスベースの送達系に

50

典型的なDNA長の制限がない。リポソームは、遺伝子、種々の薬物、放射線治療剤、酵素、ウイルス、転写因子およびアロステリックエフェクターなどを、種々の培養細胞株および動物に導入するために効果的に使用されている。さらに、リポソームの使用は、全身送達後の、自己免疫応答にも受容不可能な毒性にも関連しないようである。

【0245】

特定の実施形態において、リポソームは、水性媒体中に分散したリン脂質から形成され、そして多層同心性二重層小胞（多層小胞（MLV）とも呼ばれる）を自発的に形成する。

【0246】

あるいは、他の実施形態において、本発明は、本発明の組成物の薬学的に受容可能なナノカプセル処方物を提供する。ナノカプセルは一般に、化合物を安定かつ再現可能な様式で捕獲し得る（例えば、Quintanar-Guerreroら、Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec; 24(12): 1113-28を参照のこと）。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を回避するために、このような超微粒子（約0.1 μmのサイズ）は、インピボで分解され得るポリマーを使用して設計され得る。このような粒子は、例えば、Couvreurら、Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988; 5(1): 1-20; zur Muhlenら、Eur J Pharm Biopharm. 1998 Mar; 45(2): 149-55; Zambauxら、J Controlled Release. 1998 Jan 2; 50(1-3): 31-40; および米国特許第5,145,684号に記載されるようにして作製され得る。

【0247】

（癌治療法）

癌治療への免疫学的アプローチは、癌細胞が、異常な細胞および分子または外来の細胞および分子に対する人体の防御をしばしば回避し得、そしてこれらの防御が、失った基盤（ground）を取り戻すために免疫的に刺激され得るという認識に基づく（例えば、Klein、Immunology (Wiley-Interscience, New York, 1982)、623~648頁）。種々の免疫エフェクターが腫瘍の増殖を直接的または間接的に阻害し得るという多数の最近の知見は、癌治療に対するアプローチにおける更新された関心を導いた（例えば、Jagerら、Oncology 2001; 60(1): 1-7; Rennerら、Ann Hematol 2000 Dec; 79(12): 651-9）。

【0248】

抗腫瘍細胞の免疫および人体からの腫瘍細胞の除去に関連する機能を有する4つの基本的な細胞型は、以下の通りである：i) 非自己侵入細胞を認識および標識するために免疫グロブリンを血漿に分泌するB-リンパ球；ii) 免疫グロブリンでコーティングされた標的侵入細胞の溶解および処理を担う補体タンパク質を分泌する単球；iii) 腫瘍細胞の破壊、抗体依存性細胞傷害およびナチュラルキリング（natural killing）のための2種類の機構を有するナチュラルキラーリンパ球；ならびにiv) 抗原特異的レセプターを保持し、そして相補的マーカー分子を保有する腫瘍細胞を認識する能力を有するT-リンパ球（Schreiber, H., 1989, Fundamental Immunology (編)、W.E. Paul、923~955頁）。

【0249】

癌の免疫治療は、一般に、体液性免疫応答、細胞性免疫応答、またはそれらの両方を誘導することに焦点が当てられている。さらに、CD4⁺Tヘルパー細胞の誘導は、抗体または細胞傷害性CD8⁺T細胞のいずれかを二次的に誘導するために必要であることが十分に確立されている。癌細胞、特に、結腸癌細胞に対して選択的であるか、または理想的には特異的であるポリペプチド抗原は、結腸癌に対する免疫応答を誘導するための強力なアプローチを提供し、そして本発明の重要な局面である。

【0250】

従って、本発明のさらなる局面において、本明細書に記載される薬学的組成物は、癌に対

10

20

30

40

50

する免疫応答を刺激するため、特に、結腸癌の免疫治療のために使用され得る。このような方法において、本明細書中に記載される薬学的組成物は、患者、代表的には、温血動物、好ましくはヒトに投与される。患者は、癌に罹患していてもしていなくてもよい。薬学的組成物およびワクチンは、原発性腫瘍の外科的除去および/または放射線治療剤もしくは従来の化学療法剤の投与のような処置の前、あるいはその後のいずれかに投与され得る。上記のように、薬学的組成物の投与は、任意の適切な方法（静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内、皮内、肛門、膺、局所的および経口経路による投与を含む）によってであり得る。

【0251】

特定の実施形態において、免疫療法は、能動的免疫療法であり得、この療法における処置は、免疫応答改変剤（例えば、本明細書中で提供されるポリペプチドおよびポリヌクレオチド）の投与を用いる、腫瘍に対して反応する内因性宿主免疫系のインビボ刺激に依存する。

10

【0252】

他の実施形態において、免疫療法は、受動的免疫療法であり得、この療法における処置は、確立された腫瘍免疫反応性を有する因子（例えば、エフェクター細胞または抗体）（これらは、抗腫瘍効果を直接的または間接的に媒介し得、そして必ずしもインタクトな宿主免疫系に依存しない）の送達を含む。エフェクター細胞の例としては、上記のようなT細胞、本明細書中に提供されるポリペプチドを発現するTリンパ球（例えば、CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球およびCD4⁺Tヘルパー腫瘍浸潤性リンパ球）、キラー細胞（例えば、ナチュラルキラー細胞およびリンホカイン活性化キラー細胞）、B細胞および抗原提示細胞（例えば、樹状細胞およびマクロファージ）が挙げられる。本明細書中に列挙されるポリペプチドに特異的なT細胞レセプターおよび抗体レセプターは、養子免疫療法のために他のベクターまたはエフェクター細胞中にクローニングされ、発現され、そして移入され得る。本明細書に提供されるポリペプチドはまた、受動免疫療法のための抗体または抗イディオタイプ抗体（上記および米国特許第4,918,164号に記載される）を生成するために用いられ得る。

20

【0253】

モノクローナル抗体は、検出、診断アッセイまたは治療適用において、所望される選択的な利用のために、任意の種々の標識で標識され得る（米国特許第6,090,365号；同第6,015,542号；同第5,843,398号；同第5,595,721号；および同第4,708,930号（各々が個々に援用されるかのように、本明細書中でこれらの全体が参考として援用されている）に記載されている）。各々の場合において、抗原の決定部位への標識されたモノクローナル抗体の結合は、特定の治療剤の検出または異常な細胞上の抗原決定部位への特定の治療剤の送達を示す。本発明のさらなる目的は、このようなモノクローナル抗体の所望される選択的な利用を達成するために適切に標識される、特定のモノクローナル抗体を提供することである。

30

【0254】

エフェクター細胞は、一般に、本明細書中に記載されるように、インビトロでの増殖により養子免疫治療のために十分な量で得られ得る。単一の抗原特異的エフェクター細胞を、インビボでの抗原認識を保持しながら数十億まで増殖させるための培養条件は当該分野で周知である。このようなインビトロの培養条件は代表的に、しばしばサイトカイン（例えば、IL-2）および分裂しない支持細胞の存在下で、抗原での間欠刺激を用いる。上で述べたように、本明細書中で提供される免疫反応性ポリペプチドは、抗原特異的T細胞培養物を急速に増殖するために用いられ、免疫治療に十分な数の細胞を生成し得る。詳細には、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージ、単球、繊維芽細胞、および/またはB細胞）は、当該分野で周知の標準的技術を用いて、免疫反応性ポリペプチドでパルスされ得るか、または1つ以上のポリヌクレオチドでトランスフェクトされ得る。例えば、抗原提示細胞は、組換えウイルスまたは他の発現系における発現を増大するのに適切なプロモーターを有するポリヌクレオチドでトランスフェクトされ得る。治療において使用

40

50

するための培養されたエフェクター細胞は、インビボで増殖されかつ広範に分散され得、そして長期間生存し得なければならない。培養されたエフェクター細胞が、インビボで増殖し、そしてIL-2を補充された抗原での反復刺激によって、長期間、多数生存するように誘導され得ることが研究で示されている（例えば、Cheeverら、Immunological Reviews 157:177、1997を参照のこと）。

【0255】

あるいは、本明細書において列挙されるポリペプチドを発現するベクターは、患者から得られた抗原提示細胞に導入され得、そして同じ患者に戻す移植のためにエキソビボでクロニ的に増殖され得る。トランスフェクトされた細胞は、当該分野で公知の任意の手段（好ましくは、静脈投与、腔内投与、腹腔内投与、または腫瘍内投与による滅菌形態）を用いて患者に再導入され得る。

10

【0256】

本明細書中に記載される治療的組成物の投与の経路および頻度、ならびに投薬量は、個々人で異なり、そして標準的技術を用いて容易に確立され得る。概して、薬学的組成物およびワクチンは、注射（例えば、皮内、筋肉内、静脈内、または皮下）により、経鼻的に（例えば、吸引により）または経口的に、投与され得る。好ましくは、52週間にわたって1~10用量の間が投与され得る。好ましくは、1ヶ月の間隔で6用量が投与され、そしてブースター（追加）ワクチン接種がその後定期的に与えられ得る。交互のプロトコールが個々の患者に適切であり得る。適切な用量は、上記のように投与された場合、抗腫瘍免疫応答を促進し得、そして基底（すなわち、未処置）レベルより少なくとも10~50%上である、化合物の量である。このような応答は、患者内の抗腫瘍抗体を測定することによってか、または患者の腫瘍細胞をインビトロで殺傷し得る細胞溶解性エフェクター細胞のワクチン依存性の生成によってモニターされ得る。このようなワクチンはまた、ワクチン接種されていない患者と比較すると、ワクチン接種された患者において、改善された臨床的結果（例えば、より頻繁な寛解、完全もしくは部分的に疾患を有さないか、またはより長く疾患を有さない生存）を導く免疫応答を生じ得るはずである。一般に、1つ以上のポリペプチドを含む薬学的組成物およびワクチンについて、用量中に存在する各ポリペプチドの量は、宿主の体重（kg）あたり、約25 μ g~5mgの範囲である。適切な用量サイズは、患者の大きさで変化するが、代表的には約0.1mL~約5mLの範囲である。

20

30

【0257】

一般に、適切な投薬量および処置レジメンは、治療的および/または予防的利点を提供するのに十分な量の活性化化合物を提供する。このような応答は、処置されていない患者と比較して、処置された患者において、改善された臨床的結果（例えば、より頻繁な寛解、完全なまたは部分的な、あるいはより長い疾患なしでの生存）を確立することによってモニターされ得る。腫瘍タンパク質に対する既存の免疫応答における増加は、一般的に、改善された臨床的結果と関連する。このような免疫応答は、一般的に、標準的な増殖アッセイ、細胞障害性アッセイまたはサイトカインアッセイを使用して評価され得、これは、処置の前または後に患者から得られるサンプルを使用して行われ得る。

【0258】

（癌の検出および診断組成物、方法およびキット）

一般的に、癌は、患者から得られた生物学的サンプル（例えば、血液、血清、痰、尿、および/または腫瘍生検）における1つ以上の結腸腫瘍タンパク質および/またはこのようなタンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在に基づいて患者において検出され得る。言い換えると、このようなタンパク質は、結腸癌のような癌の存在または非存在を示すためのマーカーとして使用され得る。さらに、このようなタンパク質は、他の癌の検出のために有用であり得る。本明細書中で提供される結合剤は、一般に、生物学的サンプル中で、この薬剤に結合する抗原のレベルの検出を可能にする。

40

【0259】

ポリヌクレオチドプライマーおよびプローブは、癌の存在または非存在もまた示す、腫瘍

50

タンパク質をコードする mRNA のレベルを検出するために使用され得る。一般に、腫瘍の配列は、腫瘍が発生するのと同じの型の正常な組織よりも、腫瘍組織において、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、そしてより好ましくは 5 倍以上のレベルで存在するはずである。この腫瘍が発生するのとは異なる細胞型の特定の腫瘍配列の発現レベルは、特定の診断実施形態において不適切である。なぜならば、この腫瘍細胞の存在は、同一の型の正常組織における発現レベルに対する、腫瘍組織において予め決定された異なる発現レベル（例えば、2 倍、5 倍など）の観測により確認され得るからである。

【0260】

他の異なる発現パターンが、診断目的のために有利に利用され得る。例えば、本発明の 1 つの局面において、同一の型だが他の正常組織の型ではない、腫瘍組織および正常組織（例えば、P B M C）における腫瘍配列の過剰発現は、診断的に開発され得る。この場合において、例えば、循環組織部位または腫瘍が発生する組織部位とは異なるいくつかの組織部位から採取されたサンプル中における転移性腫瘍細胞の存在は、例えば、P T - P C R 分析を使用して、このサンプル中の腫瘍配列の発現を検出することによって同定および/または確認され得る。多くの場合において、目的のサンプル中の腫瘍細胞（例えば、P B M C）を、細胞捕獲（c e l l c a p t u r e）技術または他の類似の技術を使用して、富化することが所望される。

10

【0261】

サンプル中のポリペプチドマーカを検出するために結合剤を使用するための、当業者に公知の種々のアッセイ型式が存在する。例えば、H a r l o w および L a n e、A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , 1 9 8 8 を参照のこと。一般的に、患者における癌の存在または非存在は、(a) 患者から得られた生物学的サンプルを結合剤と接触させる工程；(b) 結合剤に結合するポリペプチドのレベルをサンプルにおいて検出する工程；および(c) ポリペプチドのレベルと所定のカットオフ値とを比較する工程によって決定され得る。

20

【0262】

好ましい実施形態において、このアッセイは、ポリペプチドに結合するためおよびサンプルの残りからポリペプチドを除くために固体支持体上に固定化された結合剤の使用を含む。次いで、結合されたポリペプチドは、レポーター基を含み、結合剤/ポリペプチド複合体に特異的に結合する検出試薬を使用して検出され得る。このような検出試薬は、例えば、ポリペプチドまたは抗体に特異的に結合する結合剤あるいは結合剤に特異的に結合する他の薬剤（例えば、抗免疫グロブリン、プロテイン G、プロテイン A またはレクチン）を含み得る。あるいは、競合アッセイが、使用され得、ここで、ポリペプチドは、レポーター基で標識され、そしてサンプルと結合剤のインキュベーション後にその固定された結合剤に結合される。サンプルの成分が、標識ポリペプチドの結合剤への結合を阻害する程度は、サンプルの固定された結合剤との反応性を示す。このようなアッセイにおける使用に適切なポリペプチドは、上記のような、全長結腸腫瘍タンパク質および結合剤が結合するそのポリペプチド部分を含む。

30

【0263】

固体支持体は、腫瘍タンパク質が付着され得る当業者に公知の任意の材料であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタプレートにおける試験ウェルあるいはニトロセルロースまたは他の適切な膜であり得る。あるいは、その支持体は、ビーズまたはディスク（例えば、ガラス）、ファイバークラス、ラテックス、またはプラスチック物質（例えば、ポリスチレン、またはポリ塩化ビニル）であり得る。その支持体はまた、磁気粒子または光ファイバーセンサー（例えば、米国特許第 5, 3 5 9, 6 8 1 号に記載のような）であり得る。この結合剤は、当業者に公知の種々の技術を使用して固体支持体上に固定化され得、これらは特許および科学文献に十分に記載されている。本発明の状況において、用語「固定化」とは、非共有結合的な会合（例えば、吸着）および共有結合的な付着（これは、薬剤と支持体上の官能基との間で直接結合され得るかまたは架橋剤を用いる結合であ

40

50

り得る)の両方をいう。マイクロタイタープレートのウェル、または膜への吸着による固定化は好ましい。このような場合、吸着は、適切な緩衝液中で固体支持体を用いて適切な時間量で結合剤に接触させることによって達成され得る。接触時間は、温度によって変化するが、代表的には、約1時間から約1日の間である。一般的には、約10ng~約10μg、そして好ましくは約100ng~約1μgの範囲の量の結合剤とプラスチックマイクロタイタープレート(例えば、ポリスチレンまたはポリ塩化ビニル)のウェルを接触させることは、適切な量の結合剤を固定化するのに十分である。

【0264】

固体支持体への結合剤の共有結合的付着は、一般に、支持体および結合剤上の官能基(例えば、水酸基またはアミノ基)の両方と反応する二官能性試薬と支持体を最初に反応させることによって達成され得る。例えば、この結合剤は、ベンゾキノンをを用いるかまたは結合パートナー上のアミンおよび活性水素と支持体上のアルデヒド基との縮合によって、適切なポリマーコーティングを有する支持体に、共有結合的に付着され得る(例えば、Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook、1991、A12-A13を参照のこと)。

10

【0265】

特定の実施形態において、このアッセイは、2抗体サンドイッチアッセイである。本アッセイは、最初に、固体支持体(一般に、マイクロタイタープレートのウェル)上で固定化されている抗体をサンプルに接触させて、その結果、サンプル内のポリペプチドを固定された抗体に結合させることによって実施され得る。次いで、非結合サンプルは固定されたポリペプチド-抗体複合体から除去され、そして検出試薬(好ましくは、そのポリペプチド上の異なる部位に結合し得る第2の抗体(レポーター基を含む))が添加される。次いで、固体支持体に結合したままである検出試薬の量が、特定のレポーター基に関して適切な方法を用いて決定される。

20

【0266】

より詳細には、一旦抗体が上記のように支持体上に固定化されると、支持体上の残りのタンパク質結合部位は、典型的にはブロックされる。任意の適切なブロック剤(例えば、ウシ血清アルブミンまたはTween 20TM(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO))は、当業者に公知である。固定された抗体は次いで、サンプルとインキュベートされ、そしてポリペプチドをこの抗体に結合させる。インキュベーションの前に、このサンプルは適切な希釈液(例えば、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS))で希釈され得る。概して、適切な接触時間(すなわち、インキュベーション時間)は、結合ポリペプチドと非結合ポリペプチドとの間の平衡で達成されるものの少なくとも約95%で、結腸癌を有する個体から得られたサンプル内のポリペプチドの存在を検出するのに十分な時間である。当業者は、ある時間にわたって起こる結合レベルをアッセイすることによって、平衡に達するまでに必要な時間が容易に決定され得ることを認識する。室温では、一般に、約30分間のインキュベーション時間で十分である。

30

【0267】

次いで、非結合サンプルが、適切な緩衝液(例えば、0.1% Tween 20TMを含むPBS)を用いて固体支持体を洗浄することによって除去される。レポーター基を含む第2の抗体が次いで、固体支持体に添加され得る。好ましいレポーター基は、上記の基を含む。

40

【0268】

次いで、検出試薬が、結合されたポリペプチドを検出するのに十分な量の時間、固定された抗体-ポリペプチド複合体とインキュベートされる。適切な量の時間は、一般に、ある時間にわたって起こる結合のレベルをアッセイすることによって決定され得る。次いで、非結合の検出試薬は除去され、そして結合した検出試薬は、レポーター基を用いて検出される。レポーター基を検出するために使用される方法は、レポーター基の性質に依存する。放射性基について、一般的には、シンチレーション計数法またはオートラジオグラフィ法が適切である。分光法は、色素、発光基および蛍光基を検出するために使用され得る

50

。ピチオンは、異なるレポーター基（一般に、放射性もしくは蛍光基または酵素）に結合されたアビジンを使用して検出され得る。酵素レポーター基は、一般に、基質の添加（一般には、特定の時間の間）、続いて反応産物の分光分析または他の分析により検出され得る。

【0269】

癌（例えば、結腸癌）の存在または非存在を決定するために、固体支持体に結合したままのレポーター基から検出されるシグナルが、一般に、所定のカットオフ値と対応するシグナルと比較される。1つの好ましい実施形態において、癌の検出のためのカットオフ値は、固定された抗体を、癌を有さない患者由来のサンプルとインキュベートした際に得られる平均シグナル値である。概して、所定のカットオフ値を3標準偏差上回るシグナルを生じるサンプルが、癌に対して陽性とみなされる。代替の好ましい実施形態において、このカットオフ値は、Sackettら、*Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, 106~7頁の方法に従って、レシーバーオペレーターカーブ (Receiver Operator Curve) を使用して決定される。簡単に言うと、本実施形態において、このカットオフ値は、診断試験結果についての各可能なカットオフ値に対応する真の陽性割合（すなわち、感度）および偽陽性割合（100% - 特異性）の対のプロットから決定され得る。プロット上の上方左手角に最も近いカットオフ値（すなわち、最大領域を囲む値）が、最も正確なカットオフ値であり、そして本方法によって決定されたカットオフ値より高いシグナルを生ずるサンプルが陽性に見なされ得る。あるいは、カットオフ値は、偽陽性割合を最小にするためにプロットに沿って左へシフトされ得るか、または偽陰性割合を最小にするために右へシフトされ得る。概して、本方法によって決定されたカットオフ値より高いシグナルを生ずるサンプルが、癌に対して陽性に見なされる。

【0270】

関連の実施形態において、このアッセイは、フロースルー試験形式またはストリップ試験形式で実施される（ここで、結合剤は、ニトロセルロースのような膜上で固定化される）。フロースルー試験では、サンプル内のポリペプチドは、サンプルが膜を通過するにつれて固定された結合剤に結合する。次いで、第2の標識化された結合剤が、この第2の結合剤を含む溶液がその膜を介して流れるにつれて、結合剤 - ポリペプチド複合体と結合する。次いで、結合した第2の結合剤の検出は、上記のように実行され得る。ストリップ試験形式では、結合剤が結合される膜の一端を、サンプルを含む溶液中に浸す。このサンプルは、膜に沿って、第2の結合剤を含む領域を通して、そして固定された結合剤の領域まで移動する。固定された抗体の領域での第2の結合剤の濃度が、癌の存在を示す。代表的には、その部位での第2の結合剤の濃度は、視覚的に読みとられ得るパターン（例えば、線）を生成する。このようなパターンを示さないことは陰性の結果を示す。概して、この膜上に固定化される結合剤の量は、生物学的サンプルが、上記の形式において、2抗体サンドイッチアッセイにおいて陽性シグナルを生じるのに十分であるレベルのポリペプチドを含む場合、視覚的に識別可能なパターンを生じるように選択される。このようなアッセイにおける使用に好ましい結合剤は、抗体およびその抗原結合フラグメントである。好ましくは、膜上に固定される抗体の量は、約25 ng ~ 約1 μgの範囲であり、そしてより好ましくは、約50 ng ~ 約500 ngの範囲である。このような試験は、代表的には、非常に少ない量の生物学的サンプルを用いて実施され得る。

【0271】

もちろん、本発明の腫瘍タンパク質または結合剤との使用に適する多数の他のアッセイプロトコルが存在する。上記の記載は、例示であることを意図するにすぎない。例えば、上記プロトコルが、腫瘍ポリペプチドを使用するために容易に改変され得て、生物学的サンプル内でこのようなポリペプチドに結合する抗体を検出し得ることが当業者に明かである。このような腫瘍タンパク質特異的抗体の検出は、癌の存在と関連し得る。

【0272】

癌もまた、あるいは癌が、生物学的サンプル中の腫瘍タンパク質と特異的に反応するT細胞の存在に基づいて検出され得る。特定の方法では、患者から単離されたCD4⁺T細胞および/またはCD8⁺T細胞を含む生物学的サンプルは、腫瘍ポリペプチド、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/またはこのようなポリペプチドの少なくとも免疫原性部分を発現するAPCとともにインキュベートされ、そしてT細胞の特異的活性化の存在または非存在が検出される。適切な生物学的サンプルとしては、単離されたT細胞が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、T細胞は、慣用技術によって(例えば、末梢血リンパ球のFicoll/Hypaque密度勾配遠心分離法によって)患者から単離され得る。T細胞は、2~9日間(代表的に4日間)、37℃にてポリペプチド(例えば、5~25μg/ml)とともにインビトロでインキュベートされ得る。T細胞サンプルの別のアリコート、コントロールとして役立てるために、腫瘍ポリペプチドの非存在下でインキュベートすることが所望され得る。CD4⁺T細胞に関して、活性化は好ましくは、T細胞の増殖を評価することによって検出される。CD8⁺T細胞に関しては、活性化は好ましくは、細胞溶解活性を評価することによって検出される。疾患のない患者におけるよりも少なくとも2倍高い増殖レベルおよび/または少なくとも20%高い細胞溶解活性レベルは、患者における癌の存在を示す。

10

【0273】

上記のように、癌もまた、あるいは癌が、生物学的サンプル中の腫瘍タンパク質をコードするmRNAレベルに基づいて検出され得る。例えば、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づくアッセイにおいて用いて、生物学的サンプルに由来する腫瘍cDNAの一部を増幅し得、ここで、オリゴヌクレオチドプライマーのうちの少なくとも1つは、腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドに特異的である(すなわち、ハイブリダイズする)。次いで、増幅されたcDNAが、当該分野で周知の技術(例えば、ゲル電気泳動)を用いて分離され、そして検出される。

20

【0274】

同様に、腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いて、生物学的サンプル中でこの腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在を検出し得る。

【0275】

アッセイ条件下でのハイブリダイゼーションを可能にするために、オリゴヌクレオチドのプライマーおよびプローブは、少なくとも10ヌクレオチド、そして好ましくは少なくとも20ヌクレオチドの長さの、本発明の腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドの一部に対して少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、そしてより好ましくは少なくとも約90%の同一性を有するオリゴヌクレオチド配列を含むべきである。好ましくは、オリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブは、上記に規定されるような、中程度にストリンジェントな条件下で、本明細書中に記載されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする。本明細書中に記載される診断方法において有用に用いられ得るオリゴヌクレオチドのプライマーおよび/またはプローブは、好ましくは、少なくとも10~40ヌクレオチドの長さである。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマーは、本明細書中に開示される配列を有するDNA分子の少なくとも10の連続するヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチドを含む。PCRに基づくアッセイおよびハイブリダイゼーションアッセイの両方についての技術は、当該分野で周知である(例えば、Mullisら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Erlich編, PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989を参照のこと)。

30

40

【0276】

1つの好ましいアッセイは、RT-PCRを用い、RT-PCRでは、PCRは、逆転写と組み合わせて適用される。代表的に、RNAは生物学的サンプル(例えば、生検組織)から抽出され、そして逆転写されてcDNA分子を生成する。少なくとも1つの特異的ブ

50

ライマーを用いるPCR増幅は、cDNA分子を生成し、このcDNA分子は、例えば、ゲル電気泳動を用いて分離および可視化され得る。増幅は、試験患者および癌に罹患していない個体から採取された生物学的サンプルについて行われ得る。増幅反応は、2桁の大きさに及ぶいくつかのcDNA希釈物について行われ得る。試験患者サンプルのいくつかの希釈物における発現の増加が、癌のないサンプルの同一希釈の物と比較して2倍以上である場合、これは、代表的に、陽性とみなされる。

【0277】

本発明の別の局面において、細胞捕獲技術は、例えば、リアルタイムPCRと組み合わせて使用されて、結腸腫瘍抗原を発現する転移細胞の検出のためのより感度の高いツールを提供し得る。生物学的サンプル（例えば、骨髄サンプル、末梢血、および小針吸引サンプル）における結腸癌細胞の検出は、結腸癌患者の診断および予後判定に望ましい。

10

【0278】

表面細胞マーカーに対する特異的モノクローナル抗体または4量体抗体複合体でコーティングされた免疫磁性ビーズを用いて、サンプル中の癌細胞を最初に富化し得るか、またはサンプル中の癌細胞をポジティブに選択し得る。種々の市販のキットが用いられ得る。これらのキットとしては、Dynabeads（登録商標）Epithelial Enrich（DynaL Biotech, Oslo, Norway）、StemSepTM（StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC）、およびRosetteSep（StemCell Technologies）が挙げられる。当業者は、他の方法論およびキットが用いられて、所望の細胞集団が富化またはポジティブに選択され得ることを認識する。Dynabeads（登録商標）Epithelial Enrichは、正常上皮組織および新生物上皮組織上で発現された2つの糖タンパク質膜抗原に特異的なmAbでコーティングされた磁性ビーズを含む。このコーティングされたビーズをサンプルに添加し得、次いで、このサンプルを磁石に接触させ得、それによりこのビーズに結合した細胞を捕獲し得る。所望でない細胞は洗い流され、磁石により単離された細胞は、ビーズから溶出され、さらなる分析において用いられる。

20

【0279】

RosetteSepは、血液サンプルから直接細胞を富化するために用いられ得、そして種々の所望でない細胞を標的とし、サンプル中に存在する赤血球（RBC）上のグリコホリンAにそれらを架橋して、ロゼットを形成する4量体の抗体のカクテルからなる。Ficoll上で遠心分離すると、標的とした細胞は、遊離のRBCとともにペレットを形成する。枯渴カクテルにおける抗体の組み合わせは、どの細胞が除去され、そして結果的にどの細胞が回収されるかを決定する。利用可能な抗体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD24、CD25、CD29、CD33、CD34、CD36、CD38、CD41、CD45、CD45RA、CD45RO、CD56、CD66B、CD66e、HLA-DR、IgE、およびTCR。

30

【0280】

さらに、本発明において、結腸腫瘍抗原に特異的なmAbが生成され得、そして同様な様式で用いられ得ることが意図される。例えば、腫瘍特異的細胞表面抗原に結合するmAbは、磁性ビーズに結合体化され得るか、または4量体抗体複合体に処方され得、そしてサンプルから転移性の結腸腫瘍細胞を富化するか、またはポジティブに選択するために用いられ得る。一旦サンプルが富化されるか、またはポジティブに選択されると、細胞は溶解され得、そしてRNAが単離され得る。次いで、RNAは、本明細書中に記載のようにリアルタイムPCRアッセイにおいて結腸腫瘍特異的プライマーを用いてRT-PCR分析に供され得る。当業者は、富化されたかまたは選択された集団の細胞が他の方法（例えば、インサイチュハイブリダイゼーションまたはフローサイトメトリー）によって分析され得ることを認識する。

40

【0281】

50

別の実施形態において、本明細書中に記載された組成物は、癌の進行についてのマーカーとして使用され得る。この実施形態において、癌の診断について上記に記載されるようなアッセイは、経時的に実行され得、そして反応性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルの変化を評価し得る。例えば、このアッセイは、6ヶ月～1年の期間、24～72時間毎に実行され得、そしてその後、必要に応じて実行され得る。一般に、癌は、検出されるこのポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルが経時的に増大する患者において進行している。対照的に、癌は、反応性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルが一定のままであるか、または時間とともに減少するかのいずれかである場合、進行していない。

【0282】

特定のインビボ診断アッセイは、腫瘍上で直接実施され得る。1つのこのようなアッセイは、腫瘍細胞を結合剤と接触させる工程を包含する。次いで、結合された結合剤は、レポーター基によって直接的または間接的に検出され得る。このような結合剤はまた、組織学的な用途において使用され得る。あるいは、ポリヌクレオチドプローブは、このような用途において使用され得る。

【0283】

上記のように、感度を改善するために、複数の腫瘍タンパク質マーカーは、所定のサンプル内でアッセイされ得る。本明細書中に提供される異なるタンパク質に特異的な結合剤が単一のアッセイにおいて組み合わせられ得ることは明かである。さらに、複数のプライマーまたはプローブが同時に用いられ得る。腫瘍タンパク質マーカーの選択は、最適な感度をもたらす組み合わせを決定する慣用実験に基づき得る。さらに、または代替として、本明細書中に提供される腫瘍タンパク質のアッセイは、他の公知の腫瘍抗原に対するアッセイと組み合わせられ得る。

【0284】

本発明はさらに、上記の診断方法のうちのいずれかにおいて使用するためのキットを提供する。このようなキットは代表的に、診断アッセイを行うのに必要な2以上の構成要素を備える。構成要素は、化合物、試薬、容器および/または器具であり得る。例えば、キット内の1つの容器は、腫瘍タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含み得る。このような抗体またはフラグメントは、上記のように支持体材料に付着されて提供され得る。1以上のさらなる容器は、アッセイにおいて使用される要素(例えば、試薬または緩衝液)を封入し得る。このようなキットもまた、あるいはこのようなキットは、抗体結合の直接的または間接的な検出に適切なレポーター基を含む上記のような検出試薬を備え得る。

【0285】

あるいは、キットは、生物学的サンプル中の腫瘍タンパク質をコードするmRNAレベルを検出するように設計され得る。このようなキットは一般に、腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、上記のような、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーを備える。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いられ得る。このようなキット内に存在し得るさらなる構成要素としては、腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドの検出を容易にする、第2のオリゴヌクレオチドおよび/または診断試薬もしくは容器が挙げられる。

【0286】

以下の実施例は、例示のために提供され、そして限定のためではない。

【0287】

(実施例1)

(結腸腫瘍タンパク質cDNAの同定)

本実施例は、PCRに基づくcDNAサブトラクション方法を用いた、結腸腫瘍タンパク質をコードするcDNA分子の同定を例示する。

【0288】

10

20

30

40

50

Clontech (Palo Alto, CA) PCR-SelectTM cDNAサブトラクション方法の改変を使用して、結腸腫瘍サンプルにおいて示差的に発現された転写物由来のcDNA中で富化されているcDNA集団を得た。この方法論によって、mRNA集団を結腸腫瘍および転移性腫瘍のサンプル(「テスター」mRNA)から、そして正常組織(例えば、脳、脾臓、骨髄、肝臓、心臓、肺、胃、および小腸)(「ドライバー」mRNA)から単離した。テスターmRNAおよびドライバーmRNAの集団から、標準的方法によってcDNAを合成した。例えば、Ausubel、F.M.ら、Short Protocols in Molecular Biology(第4版、John Wiley and Sons, Inc., 1999)を参照のこと。

【0289】

サブトラクション工程は、Clontechの方法によって誘導されるよりも大きいフラグメントを生成するように改変した、PCRに基づくプロトコルを用いて実施した。この改変プロトコルによって、このテスターcDNAおよびドライバーcDNAを、それぞれが特有の6塩基対ヌクレオチド配列を認識する5つの制限エンドヌクレアーゼ(Mlu I、Msc I、Pvu II、Sal IおよびStu I)を用いて別々に消化した。この消化によって、Clontechの方法に従うRsa Iでの消化から生じる平均サイズ300bpではなく、600bpの平均cDNAサイズを得た。この改変は、最終的なサブトラクション効率に影響しなかった。

【0290】

制限消化後、特有のヌクレオチド配列を有するアダプターオリゴヌクレオチドを、テスターcDNAの5'末端上に連結した；アダプターオリゴヌクレオチドをドライバーcDNA上に連結した。このテスターcDNAおよびドライバーcDNAを、引き続き、過剰のドライバーcDNAを用いて互いにハイブリダイズさせた。このハイブリダイゼーション工程によって、(a)ハイブリダイズしていないテスターcDNA、(b)他のテスターcDNAに対してハイブリダイズしたテスターcDNA、(c)ドライバーcDNAに対してハイブリダイズしたテスターcDNA、(d)ハイブリダイズしていないドライバーcDNA、および(e)ドライバーcDNAにハイブリダイズしたドライバーcDNAの集団を得た。

【0291】

他のテスターcDNAにハイブリダイズしたテスターcDNAを、連結したアダプターに相補的なプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって選択的に増幅した。テスターcDNAのみがアダプター配列に連結され、ハイブリダイズしていないテスターcDNAもハイブリダイズしていないドライバーcDNAもドライバーcDNAにハイブリダイズしたテスターcDNAもまた、ドライバーcDNAにハイブリダイズしたドライバーcDNAも、アダプター特異的オリゴヌクレオチドを用いて増幅されなかった。PCR増幅したテスターcDNAを、pCR2.1プラスミドベクター(Invitrogen; Carlsbad, CA)中でクローニングして、示差的に発現された結腸腫瘍抗原および結腸転移性腫瘍抗原に特異的cDNAに富んだライブラリーを作成した。

【0292】

pCR2.1腫瘍抗原cDNAライブラリー由来の3000クローンを、無作為に選択して、マイクロアレイ分析およびヌクレオチド配列決定のためのクローンを得るために用いた。各pCR2.1クローンからのcDNA挿入物を以下のようにPCR増幅した。要するに、0.5μlのグリセロールストック溶液を99.5μlのPCR混合液に添加した。このPCR混合液は、80μl H₂O、10μl 10×PCR緩衝液、6μl MgCl₂、1μl 10mM dNTP、1μl 100mM M13順方向プライマー(CACGACGTTGTAACAACGACGG；配列番号2236)、1μl 100mM M13逆方向プライマー(CACAGGAACAAGCTATGACC；配列番号2237)、および0.5μl 5u/ml Taq DNAポリメラーゼを含有する。本明細書において用いられるM13の順方向プライマー、および逆方向プライマーは、Operon Technologies (Alameda, CA)から入手した。以下

10

20

30

40

50

の条件下でPCR増幅を30サイクル実施した：95 で5分間、92 で30秒間、57 で40秒間、75 で2分間、および75 で5分間。

【0293】

結腸腫瘍組織 (n = 25)、正常結腸組織 (n = 6)、腎臓、肺、肝臓、脳、心臓、食道、小腸、胃、膵臓、副腎、唾液腺、休止PBMC、活性化PBMC、骨髄、樹状細胞、脊髄、血管、骨格筋、皮膚、胸部および胎児組織において、マイクロアレイ技術を用いて、代表的なクローンのためのmRNA発現レベルを決定した。マイクロアレイ分析を実施するための例示的方法は、Schenarら、Science 270:467~470に記載されている。それぞれの場合において試験した組織サンプルの数は、上記で特に注記したところを除けば1つ (n = 1) であった；さらに、上述の組織の全てはヒト由来であった。 10

【0294】

PCR増幅産物をアレイフォーマット中のスライド上にドットしているが、この各産物は、アレイ中で特有の位置を占める。mRNAを、試験されるべき組織サンプルから抽出し、そして蛍光ヌクレオチドである 5および 3の存在下で、標準的方法を用いて、逆転写によって、蛍光標識したcDNAプローブを生成した。例えば、逆転写反応を実施するための例示的反応条件については、Ausubelら、前出を参照のこと； 5および 3蛍光標識されたヌクレオチドは、例えば、Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden)、またはNEN (登録商標) Life Science Products, Inc. (Boston, MA) から入手可能である。マイクロアレイを、蛍光標識したcDNAでプローブし、そのスライドをスキャン (走査) し、そして蛍光強度を測定した。cDNAマイクロアレイを調製するための、および蛍光強度を測定するためのGenetic Microsystems計測器が、Affymetrix (Santa Clara, CA) から入手可能である。 20

【0295】

正常組織から得たcDNAプローブでプローブした同じセクターにおける蛍光強度と比べた場合の、結腸腫瘍または結腸転移性腫瘍組織から得たcDNAプローブでプローブしたマイクロアレイセクターにおける蛍光強度の上昇によって、結腸腫瘍または結腸転移性腫瘍組織において示差的に発現される腫瘍抗原遺伝子が示される。

【0296】

配列番号1~2231として本明細書中に開示されるクローンを、マイクロアレイベースの方法論によって、PCRサブトラクトした、示差的な結腸腫瘍および結腸転移性腫瘍cDNAライブラリーから同定した。 30

【0297】

(実施例2)

(C931P結腸腫瘍タンパク質cDNAの全長配列)

本実施例は、LifeSeq Gold DataminingによるC931P結腸腫瘍タンパク質cDNAの全長配列を開示する。

【0298】

C931Pについての本来の配列 (配列番号1861として本明細書中に開示される) を、LifeSeq Goldデータベース (2000年12月リリース) のBlastNサーチにおける問合せ配列として使用した。C931Pは、5つのテンプレート配列を含んだ単一LifeSeq Gold遺伝子ピン (#475113) に一致した。371アミノ酸のORFをコードするC931Pについてのコンセンサス全長cDNA配列 (それぞれ、配列番号2235および2232) を決定するために、この5つのテンプレート配列をC931Pと整列させた。複数のスプライス改変体を、LifeSeq Goldデータベースにおいて発見した。これらのスプライス改変体のうち2つを本明細書中に開示し、そのうち1つは371アミノ酸のオープンリーディングフレームをコードする。 40

【0299】

C931Pについて単離した本来のクローン (443bp) を、このLifeSeq G 50

oldの「LGtemplates Sep 2000」サーチデータベースのBlastNサーチにおける問合せ配列として使用した。このサーチを、Incyteによって提供されるLifeSeq gold Webインターフェースを使用して行った。単一LifeSeq Goldテンプレート配列に対する同一の一致が存在した(番号475113.7)。次いで、遺伝子ピン475113(これに475113.7配列が属する)に関する情報を、LifeSeq Goldデータベースから得た。この475113遺伝子ピンは、5つのテンプレート配列および176個のクローンで構成されていた。この5つのテンプレート配列を、DNASTAR Seqmanプログラムを使用してC931P配列と整列させた。これらの配列の整列は、5つのテンプレート配列の各々が、選択的スプライシング形態を示す(各配列が、他の配列と比較して、独特の複数の塩基対欠失を有した)ことを示した。この複数配列整列を、C931P遺伝子についての成熟mRNAを示すはずである単一配列、ならびに単一オープンリーディングフレームを誘導するために使用した。この推定成熟mRNA配列を、5つのテンプレート配列に存在する全ての複数塩基対欠失を組み込むことによって得た。C931Pの本来の単離配列は、推定の完全にプロセスされたmRNA配列において欠失した遺伝子部分に対応する。従って、LifeSeqから得た3つの配列を本明細書中で開示する。1つは、推定の遺伝子の部分的にスプライスされた形態(配列番号2233)に対応し、これはC931Pの本来の単離体配列と整列する。第2は、推定の、完全にプロセスされたmRNA配列(配列番号2232)に対応し、これはC931Pの本来の単離体配列とは整列しない。第3の配列は、この配列の推定のコード部分のみ(配列番号2234)に対応する。単一タンパク質配列(推定のC931P全長タンパク質配列(配列番号2235))は、本明細書中に開示される。

10

20

【0300】

(実施例3)

(リアルタイムPCRを使用する、C931P結腸腫瘍抗原のmRNA発現分析)

結腸腫瘍候補遺伝子C931P(配列番号2232に示される全長cDNA)を、短い結腸パネルおよび拡張した結腸パネルを使用して、以下に記載されるようにリアルタイムPCRによって分析した。この遺伝子が、結腸腫瘍の約50%において発現が増大することを見出した。リンパ節および胸腺においてもまた、ある程度の発現を観察した。

【0301】

定量的リアルタイムPCRにおいて使用すべき第一鎖cDNAを、スーパースク립ト逆転写酵素(RT)(Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD)を使用して、DNase I(Amplification Grade, Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD)で処理した20μgの総RNAから合成した。リアルタイムPCRを、GeneAmpTM 5700配列検出システム(PE Biosystems, Foster City, CA)を用いて行った。この5700システムは、SYBRTMグリーン(二本鎖DNA内に単にインターカレートする蛍光色素)、および遺伝子特異的な順方向プライマーおよび逆方向プライマーのセットを使用する。蛍光の増大を、全増幅プロセスの間モニターする。プライマーの最適濃度を、チェッカーボードアプローチを使用して決定し、そして胸部腫瘍由来のcDNAのプールをこのプロセスにおいて使用した。

30

40

【0302】

2.5μlのSYBRグリーン緩衝液、2μlのcDNAテンプレート、ならびに目的の遺伝子についての順方向プライマーおよび逆方向プライマー各々2.5μlを含む25μlの容量で、PCR反応を行った。RT反応に使用したcDNAを、目的の各遺伝子について1:10、そして-アクチンコントロールについて1:100に希釈した。サンプル中の特定のcDNA(従って初期のmRNA)の量を定量化するために、目的の遺伝子を含むプラスミドDNAを使用して、実行の各々についての標準曲線を作成する。標準曲線を、リアルタイムPCRにおいて決定したCt値(これは、このアッセイにおいて使用した初期cDNA濃度に関連する)を使用して作成した。目的の遺伝子の20~2×10

50

⁶ コピーの範囲の標準希釈物を、この目的のために使用した。さらに、200 fg ~ 2000 fgの範囲の - アクチンについての標準曲線を作成した。これは、比較目的のための、 - アクチンの量に対する組織サンプルの初期RNA含有量の標準化を可能にする。試験した組織の各群についての平均コピー数を、 - アクチンの定量に対して規格化して、この遺伝子の各々において見られる過剰発現のレベルの評価を可能にする。

【0303】

(実施例4)

(Tヘルパー株のペプチドプライミング)

CD4⁺ Tヘルパー株の作製、および腫瘍特異的抗原由来のペプチドエピトープ（これは、HLAクラスII分子の状況において、CD4⁺ T細胞によって認識され得る）の同定を、以下のように行う： 10

10アミノ酸重複する15マーのペプチド（腫瘍特異的抗原由来）を、標準的な手順を使用して作製する。樹状細胞（DC）を、標準的なプロトコルによって、GM-CSFおよびIL-4を使用して正常なドナーのPBMCから誘導する。CD4⁺ T細胞を、MACSビーズ（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）およびネガティブ選択を使用して、DCとして同じドナーから作製する。DCを、15マーのペプチドのプールを用いて一晚パルスする（各ペプチドは、最終濃度0.25 μg/ml）。パルスしたDCを洗浄し、そして底がV字型の96ウェルプレートに1 × 10⁴細胞/ウェルでプレートし、そして精製したCD4⁺ T細胞を1 × 10⁵/ウェルで添加する。培養物に60 ng/mlのIL-6および10 ng/mlのIL-12を補充し、そして37 °Cでインキュベートする。培養物を、抗原提示細胞として上記のように作製およびパルスしたDCを使用して、毎週上記のように再刺激し、5 ng/mlのIL-7および10 U/mlのIL-2を補充する。4回のインビトロ刺激サイクルの後、得られたCD4⁺ T細胞株（各株は、1つのウェルに対応する）を、コントロールとして使用したペプチドの無関係のプールでのペプチドプールの刺激に応答しての、特定の増殖およびサイトカインの産生について試験する。 20

【0304】

(実施例5)

(インビトロ全遺伝子プライミングを使用する、腫瘍特異的CTL株の作製)

腫瘍抗原-ワクシニアで感染したDCを用いるインビトロ全遺伝子プライミングを使用して（例えば、Yeeら、The Journal of Immunology, 157 (9): 4079-86, 1996を参照のこと）、ヒトCTL株（これは、インターフェロン-γ ELISPOT分析によって決定されるように、特定の腫瘍抗原で形質導入された自己線維芽細胞を特異的に認識する）を誘導する。詳細には、10%ヒト血清、50 ng/mlのヒトGM-CSFおよび30 ng/mlのヒトIL-4を含むRPMI培地中で5日間増殖することによって、正常なヒトドナーのPBMCから誘導した単球培養物から樹状細胞（DC）を分化した。培養後、DCを、感染多重度（M.O.I）5で、腫瘍抗原-組換えワクシニアウイルスで一晩感染させ、そして3 μg/mlのCD40リガンドの添加によって一晚成熟させる。次いで、ウイルスをUV照射によって不活化する。CD8⁺ T細胞を、磁気ビーズ系を使用して単離し、そして標準的な培養技術を使用してプライミング培養を開始する。培養物を、以前に同定した腫瘍抗原でレトロウイルス形質導入した自己一次線維芽細胞を使用して、7~10日毎に再刺激する。4回の刺激サイクル後、CD8⁺ T細胞株を同定し、これは、腫瘍抗原で形質導入された自己線維芽細胞で刺激する場合、インターフェロン-γ を特異的に産生する。腫瘍抗原を発現するベクターで形質導入されたHLA不適合B-LCL株のパネルを使用し、そしてCTL株によって産生されたインターフェロン-γ をELISPOTアッセイで測定して、CTL株のHLA拘束を決定する。 30

【0305】

(実施例6)

(抗腫瘍抗原モノクローナル抗体の生成および特徴付け)

50

マウスモノクローナル抗体を以下のように、E. coli由来腫瘍抗原タンパク質に対して惹起させた：50 μgの組換え腫瘍タンパク質を含有する完全フロイントアジュバント(CFA)、続いて10 μgの組換えタンパク質を含有する不完全フロイントアジュバント(IFA)での引き続き腹腔内ブーストによってマウスを免疫する。脾臓の摘出の3日前、約50 μgの可溶性組換えタンパク質を用いてマウスを静脈内免疫する。腫瘍抗原に対して正の力価を有するマウスの脾臓を取り出し、そして単一細胞懸濁液を作成して、SP2/Oミエローマ細胞への融合にもちいてB細胞ハイブリドーマを生成する。ハイブリッドクローンからの上清を、組換え腫瘍タンパク質に対する特異性についてELISAによって試験し、そして腫瘍タンパク質配列全体にまたがるペプチドを用いてエピトープをマッピングした。腫瘍タンパク質をコードするcDNAで安定にトランスフェクトした細胞の表面上で、mAbが腫瘍タンパク質を検出する能力について、mAbをまたフローサイトメトリーによって試験する。

10

【0306】

(実施例7)

(ポリペプチドの合成)

本実施例は、結腸腫瘍タンパク質の調製のための例示的な方法論を開示する。

【0307】

HPTU(0-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)活性化を用いるFMOC化学を使用して、Perkin Elmer/Applied Biosystems Division 430Aペプチド合成機でポリペプチドを合成し得る。結合体化、固定された表面への結合、またはこのペプチドの標識の方法を提供するために、Gly-Cys-Gly配列をこのペプチドのアミノ末端に結合し得る。固体支持体からのペプチドの切断を、以下の切断混合物を使用し得る：トリフルオロ酢酸：エタンジチオール：チオアニソール：水：フェノール(40：1：2：2：3)。2時間の切断後、このペプチドを、冷メチル-t-ブチル-エーテル中で沈殿し得る。次いで、このペプチドペレットを、0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)を含む水中に溶解し得、そして凍結乾燥し、その後C18逆相HPLCによって精製する。水(0.1%のTFAを含む)中の0%~60%アセトニトリル(0.1%のTFAを含む)の勾配を、このペプチドを溶出するために使用し得る。純粋な画分の凍結乾燥後、このペプチドを、エレクトロスプレーまたは他の型の質量分析を使用して、そしてアミノ酸分析によって特徴付け得る。

20

30

【0308】

前述の内容から、本発明の特定の実施形態が例示の目的で本明細書に記載されているが、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく種々の改変がなされ得ることが理解される。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲による以外には限定されない。

【国際公開パンフレット】

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

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96388 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47
- (21) International Application Number: PCT/US91/18557
- (22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/210,899 9 June 2000 (09.06.2000) US
60/270,216 20 February 2001 (20.02.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): CORIXA CORPORATION (US/US); Suite 200, 1124 Columbia Street, Seattle, WA 98104 (US).
- (74) Agents: POTTER, Jane, E., R.; Seal Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104 7092 et al. (US).
- (83) Designated States (conventional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ANIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, KH, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:

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

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



WO 01/96388 A2

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE THERAPY AND DIAGNOSIS OF COLON CANCER

(57) Abstract: Compositions and methods for the therapy and diagnosis of cancer, such as colon cancer, are disclosed. Compositions may comprise one or more colon tumor proteins, immunogenic portions thereof, or polynucleotides that encode such portions. Alternatively, a therapeutic composition may comprise an antigen presenting cell that expresses a colon tumor protein, or a T cell that is specific for cells expressing such a protein. Such compositions may be used, for example, for the prevention and treatment of diseases such as colon cancer. Diagnostic methods based on detecting a colon tumor protein, or mRNA encoding such a protein, in a sample are also provided.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE THERAPY AND DIAGNOSIS
OF COLON CANCER

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to therapy and diagnosis of cancer, such as colon cancer. The invention is more specifically related to polypeptides comprising at least a portion of a colon tumor protein, and to polynucleotides encoding such polypeptides. Such polypeptides and polynucleotides may be used in vaccines and pharmaceutical compositions for prevention and treatment of colon malignancies, and for the diagnosis and monitoring of such cancers.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

Cancer is a significant health problem throughout the world. Although advances have been made in detection and therapy of cancer, no vaccine or other universally successful method for prevention or treatment is currently available. Current therapies, which are generally based on a combination of chemotherapy or surgery and radiation, continue to prove inadequate in many patients.

Colon cancer is the second most frequently diagnosed malignancy in the United States as well as the second most common cause of cancer death. The five-year survival rate for patients with colorectal cancer detected in an early localized stage is 92%; unfortunately, only 37% of colorectal cancer is diagnosed at this stage. The survival rate drops to 64% if the cancer is allowed to spread to adjacent organs or lymph nodes, and to 7% in patients with distant metastases.

The prognosis of colon cancer is directly related to the degree of penetration of the tumor through the bowel wall and the presence or absence of nodal involvement, consequently early detection and treatment are especially important. Currently, diagnosis is aided by the use of screening assays for fecal occult blood, sigmoidoscopy, colonoscopy and double contrast barium enemas. Treatment regimens are determined by the type and stage of the cancer, and include surgery, radiation therapy and/or chemotherapy. Recurrence following surgery (the most common form of therapy) is a major problem and is often the ultimate cause of death.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

2

In spite of considerable research into therapies for these and other cancers, colon cancer remains difficult to diagnose and treat effectively. Accordingly, there is a need in the art for improved methods for detecting and treating such cancers. The present invention fulfills these needs and further provides other related advantages.

5 SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the present invention provides polynucleotide compositions comprising a sequence selected from the group consisting of:

- (a) sequences provided in SEQ ID NO:1-2234;
- (b) complements of the sequences provided in SEQ ID NO:1-2234;
- 10 (c) sequences consisting of at least 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 and 100 contiguous residues of a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234;
- (d) sequences that hybridize to a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234, under moderate or highly stringent conditions;
- (e) sequences having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,
15 97%, 98% or 99% identity to a sequence of SEQ ID NO:1-2234;
- (f) degenerate variants of a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234.

In one preferred embodiment, the polynucleotide compositions of the invention are expressed in at least about 20%, more preferably in at least about 30%,
20 and most preferably in at least about 50% of colon tumor samples tested, at a level that is at least about 2-fold, preferably at least about 5-fold, and most preferably at least about 10-fold higher than that for normal tissues.

The present invention, in another aspect, provides polypeptide compositions comprising an amino acid sequence that is encoded by a polynucleotide
25 sequence described above.

The present invention further provides polypeptide compositions comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence recited in SEQ ID NO:2235.

In certain preferred embodiments, the polypeptides and/or
30 polynucleotides of the present invention are immunogenic, *i.e.*, they are capable of

WO 01/96388

PCT/US01/18557

3

eliciting an immune response, particularly a humoral and/or cellular immune response, as further described herein.

5 The present invention further provides fragments, variants and/or derivatives of the disclosed polypeptide and/or polynucleotide sequences, wherein the fragments, variants and/or derivatives preferably have a level of immunogenic activity of at least about 50%, preferably at least about 70% and more preferably at least about 90% of the level of immunogenic activity of a polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:2235 or a polypeptide sequence encoded by a polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1-2234.

10 The present invention further provides polynucleotides that encode a polypeptide described above, expression vectors comprising such polynucleotides and host cells transformed or transfected with such expression vectors.

15 Within other aspects, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a polypeptide or polynucleotide as described above and a physiologically acceptable carrier.

Within a related aspect of the present invention, the pharmaceutical compositions, e.g., vaccine compositions, are provided for prophylactic or therapeutic applications. Such compositions generally comprise an immunogenic polypeptide or polynucleotide of the invention and an immunostimulant, such as an adjuvant.

20 The present invention further provides pharmaceutical compositions that comprise: (a) an antibody or antigen-binding fragment thereof that specifically binds to a polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, and (b) a physiologically acceptable carrier.

25 Within further aspects, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising: (a) an antigen presenting cell that expresses a polypeptide as described above and (b) a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Illustrative antigen presenting cells include dendritic cells, macrophages, monocytes, fibroblasts and B cells.

30 Within related aspects, pharmaceutical compositions are provided that comprise: (a) an antigen presenting cell that expresses a polypeptide as described above and (b) an immunostimulant.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

4

The present invention further provides, in other aspects, fusion proteins that comprise at least one polypeptide as described above, as well as polynucleotides encoding such fusion proteins, typically in the form of pharmaceutical compositions, e.g., vaccine compositions, comprising a physiologically acceptable carrier and/or an immunostimulant. The fusions proteins may comprise multiple immunogenic polypeptides or portions/variants thereof, as described herein, and may further comprise one or more polypeptide segments for facilitating the expression, purification and/or immunogenicity of the polypeptide(s).

Within further aspects, the present invention provides methods for stimulating an immune response in a patient, preferably a T cell response in a human patient, comprising administering a pharmaceutical composition described herein. The patient may be afflicted with colon cancer, in which case the methods provide treatment for the disease, or patient considered at risk for such a disease may be treated prophylactically.

Within further aspects, the present invention provides methods for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising administering to a patient a pharmaceutical composition as recited above. The patient may be afflicted with colon cancer, in which case the methods provide treatment for the disease, or patient considered at risk for such a disease may be treated prophylactically.

The present invention further provides, within other aspects, methods for removing tumor cells from a biological sample, comprising contacting a biological sample with T cells that specifically react with a polypeptide of the present invention, wherein the step of contacting is performed under conditions and for a time sufficient to permit the removal of cells expressing the protein from the sample.

Within related aspects, methods are provided for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising administering to a patient a biological sample treated as described above.

Methods are further provided, within other aspects, for stimulating and/or expanding T cells specific for a polypeptide of the present invention, comprising contacting T cells with one or more of: (i) a polypeptide as described above; (ii) a polynucleotide encoding such a polypeptide; and/or (iii) an antigen presenting cell that expresses such a polypeptide; under conditions and for a time sufficient to permit the

WO 01/96388

PCT/US01/18557

5

stimulation and/or expansion of T cells. Isolated T cell populations comprising T cells prepared as described above are also provided.

Within further aspects, the present invention provides methods for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising administering to a
5 patient an effective amount of a T cell population as described above.

The present invention further provides methods for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising the steps of: (a) incubating CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells isolated from a patient with one or more of: (i) a polypeptide comprising at least an immunogenic portion of polypeptide disclosed herein; (ii) a
10 polynucleotide encoding such a polypeptide; and (iii) an antigen-presenting cell that expressed such a polypeptide; and (b) administering to the patient an effective amount of the proliferated T cells, and thereby inhibiting the development of a cancer in the patient. Proliferated cells may, but need not, be cloned prior to administration to the patient.

Within further aspects, the present invention provides methods for determining the presence or absence of a cancer, preferably a colon cancer, in a patient comprising: (a) contacting a biological sample obtained from a patient with a binding agent that binds to a polypeptide as recited above; (b) detecting in the sample an amount of polypeptide that binds to the binding agent; and (c) comparing the amount of
20 polypeptide with a predetermined cut-off value, and therefrom determining the presence or absence of a cancer in the patient. Within preferred embodiments, the binding agent is an antibody, more preferably a monoclonal antibody.

The present invention also provides, within other aspects, methods for monitoring the progression of a cancer in a patient. Such methods comprise the steps
25 of: (a) contacting a biological sample obtained from a patient at a first point in time with a binding agent that binds to a polypeptide as recited above; (b) detecting in the sample an amount of polypeptide that binds to the binding agent; (c) repeating steps (a) and (b) using a biological sample obtained from the patient at a subsequent point in time; and (d) comparing the amount of polypeptide detected in step (c) with the amount
30 detected in step (b) and therefrom monitoring the progression of the cancer in the patient.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

6

The present invention further provides, within other aspects, methods for determining the presence or absence of a cancer in a patient, comprising the steps of: (a) contacting a biological sample, e.g., tumor sample, serum sample, etc., obtained from a patient with an oligonucleotide that hybridizes to a polynucleotide that encodes a polypeptide of the present invention; (b) detecting in the sample a level of a polynucleotide, preferably mRNA, that hybridizes to the oligonucleotide; and (c) comparing the level of polynucleotide that hybridizes to the oligonucleotide with a predetermined cut-off value, and therefrom determining the presence or absence of a cancer in the patient. Within certain embodiments, the amount of mRNA is detected via polymerase chain reaction using, for example, at least one oligonucleotide primer that hybridizes to a polynucleotide encoding a polypeptide as recited above, or a complement of such a polynucleotide. Within other embodiments, the amount of mRNA is detected using a hybridization technique, employing an oligonucleotide probe that hybridizes to a polynucleotide that encodes a polypeptide as recited above, or a complement of such a polynucleotide.

In related aspects, methods are provided for monitoring the progression of a cancer in a patient, comprising the steps of: (a) contacting a biological sample obtained from a patient with an oligonucleotide that hybridizes to a polynucleotide that encodes a polypeptide of the present invention; (b) detecting in the sample an amount of a polynucleotide that hybridizes to the oligonucleotide; (c) repeating steps (a) and (b) using a biological sample obtained from the patient at a subsequent point in time; and (d) comparing the amount of polynucleotide detected in step (c) with the amount detected in step (b) and therefrom monitoring the progression of the cancer in the patient.

Within further aspects, the present invention provides antibodies, such as monoclonal antibodies, that bind to a polypeptide as described above, as well as diagnostic kits comprising such antibodies. Diagnostic kits comprising one or more oligonucleotide probes or primers as described above are also provided.

These and other aspects of the present invention will become apparent upon reference to the following detailed description and attached. All references disclosed herein are hereby incorporated by reference in their entirety as if each was incorporated individually.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed generally to compositions and their use in the therapy and diagnosis of cancer, particularly colon cancer. As described further below, illustrative compositions of the present invention include, but are not restricted to, polypeptides, particularly immunogenic polypeptides, polynucleotides encoding such polypeptides, antibodies and other binding agents, antigen presenting cells (APCs) and immune system cells (e.g., T cells).

The practice of the present invention will employ, unless indicated specifically to the contrary, conventional methods of virology, immunology, microbiology, molecular biology and recombinant DNA techniques within the skill of the art, many of which are described below for the purpose of illustration. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

All publications, patents and patent applications cited herein, whether supra or infra, are hereby incorporated by reference in their entirety.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural references unless the content clearly dictates otherwise.

POLYPEPTIDE COMPOSITIONS

As used herein, the term "polypeptide" is used in its conventional meaning, i.e., as a sequence of amino acids. The polypeptides are not limited to a specific length of the product; thus, peptides, oligopeptides, and proteins are included within the definition of polypeptide, and such terms may be used interchangeably herein unless specifically indicated otherwise. This term also does not refer to or exclude post-expression modifications of the polypeptide, for example, glycosylations,

WO 01/96388

PCT/US01/18557

8

acetylations, phosphorylations and the like, as well as other modifications known in the art, both naturally occurring and non-naturally occurring. A polypeptide may be an entire protein, or a subsequence thereof. Particular polypeptides of interest in the context of this invention are amino acid subsequences comprising epitopes, *i.e.*,
5 antigenic determinants substantially responsible for the immunogenic properties of a polypeptide and being capable of evoking an immune response.

Particularly illustrative polypeptides of the present invention comprise those encoded by a polynucleotide sequence set forth in any one of SEQ ID NO:1-2234, or a sequence that hybridizes under moderately stringent conditions, or, alternatively,
10 under highly stringent conditions, to a polynucleotide sequence set forth in any one of SEQ ID NO:1-2234. Certain other illustrative polypeptides of the invention comprise amino acid sequences as set forth in SEQ ID NO:2235.

The polypeptides of the present invention are sometimes herein referred to as colon tumor proteins or colon tumor polypeptides, as an indication that their
15 identification has been based at least in part upon their increased levels of expression in colon tumor samples. Thus, a "colon tumor polypeptide" or "colon tumor protein," refers generally to a polypeptide sequence of the present invention, or a polynucleotide sequence encoding such a polypeptide, that is expressed in a substantial proportion of
20 colon tumor samples, for example preferably greater than about 20%, more preferably greater than about 30%, and most preferably greater than about 50% or more of colon tumor samples tested, at a level that is at least two fold, and preferably at least five fold, greater than the level of expression in normal tissues, as determined using a representative assay provided herein. A colon tumor polypeptide sequence of the
25 invention, based upon its increased level of expression in tumor cells, has particular utility both as a diagnostic marker as well as a therapeutic target, as further described below.

In certain preferred embodiments, the polypeptides of the invention are immunogenic, *i.e.*, they react detectably within an immunoassay (such as an ELISA or T-cell stimulation assay) with antisera and/or T-cells from a patient with colon cancer.
30 Screening for immunogenic activity can be performed using techniques well known to the skilled artisan. For example, such screens can be performed using methods such as

those described in Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. In one illustrative example, a polypeptide may be immobilized on a solid support and contacted with patient sera to allow binding of antibodies within the sera to the immobilized polypeptide. Unbound sera may then be removed and bound antibodies detected using, for example, ¹²⁵I-labeled Protein A.

As would be recognized by the skilled artisan, immunogenic portions of the polypeptides disclosed herein are also encompassed by the present invention. An "immunogenic portion," as used herein, is a fragment of an immunogenic polypeptide of the invention that itself is immunologically reactive (*i.e.*, specifically binds) with B-cells and/or T-cell surface antigen receptors that recognize the polypeptide. Immunogenic portions may generally be identified using well known techniques, such as those summarized in Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993) and references cited therein. Such techniques include screening polypeptides for the ability to react with antigen-specific antibodies, antisera and/or T-cell lines or clones. As used herein, antisera and antibodies are "antigen-specific" if they specifically bind to an antigen (*i.e.*, they react with the protein in an ELISA or other immunoassay, and do not react detectably with unrelated proteins). Such antisera and antibodies may be prepared as described herein, and using well-known techniques.

In one preferred embodiment, an immunogenic portion of a polypeptide of the present invention is a portion that reacts with antisera and/or T-cells at a level that is not substantially less than the reactivity of the full-length polypeptide (*e.g.*, in an ELISA and/or T-cell reactivity assay). Preferably, the level of immunogenic activity of the immunogenic portion is at least about 50%, preferably at least about 70% and most preferably greater than about 90% of the immunogenicity for the full-length polypeptide. In some instances, preferred immunogenic portions will be identified that have a level of immunogenic activity greater than that of the corresponding full-length polypeptide, *e.g.*, having greater than about 100% or 150% or more immunogenic activity.

In certain other embodiments, illustrative immunogenic portions may include peptides in which an N-terminal leader sequence and/or transmembrane domain have been deleted. Other illustrative immunogenic portions will contain a small N-

WO 01/96388

PCT/US01/18557

10

and/or C-terminal deletion (e.g., 1-30 amino acids, preferably 5-15 amino acids), relative to the mature protein.

In another embodiment, a polypeptide composition of the invention may also comprise one or more polypeptides that are immunologically reactive with T cells and/or antibodies generated against a polypeptide of the invention, particularly a polypeptide having an amino acid sequence disclosed herein, or to an immunogenic fragment or variant thereof.

In another embodiment of the invention, polypeptides are provided that comprise one or more polypeptides that are capable of eliciting T cells and/or antibodies that are immunologically reactive with one or more polypeptides described herein, or one or more polypeptides encoded by contiguous nucleic acid sequences contained in the polynucleotide sequences disclosed herein, or immunogenic fragments or variants thereof, or to one or more nucleic acid sequences which hybridize to one or more of these sequences under conditions of moderate to high stringency.

The present invention, in another aspect, provides polypeptide fragments comprising at least about 5, 10, 15, 20, 25, 50, or 100 contiguous amino acids, or more, including all intermediate lengths, of a polypeptide compositions set forth herein, such as those set forth in SEQ ID NO:2235, or those encoded by a polynucleotide sequence set forth in a sequence of SEQ ID NO:1-2234.

In another aspect, the present invention provides variants of the polypeptide compositions described herein. Polypeptide variants generally encompassed by the present invention will typically exhibit at least about 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% or more identity (determined as described below), along its length, to a polypeptide sequences set forth herein.

In one preferred embodiment, the polypeptide fragments and variants provided by the present invention are immunologically reactive with an antibody and/or T-cell that reacts with a full-length polypeptide specifically set forth herein.

In another preferred embodiment, the polypeptide fragments and variants provided by the present invention exhibit a level of immunogenic activity of at least about 50%, preferably at least about 70%, and most preferably at least about 90% or

WO 01/96388

PCT/US01/18557

11

more of that exhibited by a full-length polypeptide sequence specifically set forth herein.

A polypeptide "variant," as the term is used herein, is a polypeptide that typically differs from a polypeptide specifically disclosed herein in one or more substitutions, deletions, additions and/or insertions. Such variants may be naturally occurring or may be synthetically generated, for example, by modifying one or more of the above polypeptide sequences of the invention and evaluating their immunogenic activity as described herein and/or using any of a number of techniques well known in the art.

10 For example, certain illustrative variants of the polypeptides of the invention include those in which one or more portions, such as an N-terminal leader sequence or transmembrane domain, have been removed. Other illustrative variants include variants in which a small portion (e.g., 1-30 amino acids, preferably 5-15 amino acids) has been removed from the N- and/or C-terminal of the mature protein.

15 In many instances, a variant will contain conservative substitutions. A "conservative substitution" is one in which an amino acid is substituted for another amino acid that has similar properties, such that one skilled in the art of peptide chemistry would expect the secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide to be substantially unchanged. As described above, modifications may be made in the structure of the polynucleotides and polypeptides of the present invention and still obtain a functional molecule that encodes a variant or derivative polypeptide with desirable characteristics, e.g., with immunogenic characteristics. When it is desired to alter the amino acid sequence of a polypeptide to create an equivalent, or even an improved, immunogenic variant or portion of a polypeptide of the invention, one skilled in the art will typically change one or more of the codons of the encoding DNA sequence according to Table I.

20 For example, certain amino acids may be substituted for other amino acids in a protein structure without appreciable loss of interactive binding capacity with structures such as, for example, antigen-binding regions of antibodies or binding sites on substrate molecules. Since it is the interactive capacity and nature of a protein that defines that protein's biological functional activity, certain amino acid sequence

WO 01/96388

PCT/US01/18557

12

substitutions can be made in a protein sequence, and, of course, its underlying DNA coding sequence, and nevertheless obtain a protein with like properties. It is thus contemplated that various changes may be made in the peptide sequences of the disclosed compositions, or corresponding DNA sequences which encode said peptides
5 without appreciable loss of their biological utility or activity.

TABLE I

| Amino Acids | | | Codons | | | | | | |
|---------------|-----|---|--------|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Alanine | Ala | A | GCA | GCC | GCG | GCU | | | |
| Cysteine | Cys | C | UGC | UGU | | | | | |
| Aspartic acid | Asp | D | GAC | GAU | | | | | |
| Glutamic acid | Glu | E | GAA | GAG | | | | | |
| Phenylalanine | Phe | F | UUC | UUU | | | | | |
| Glycine | Gly | G | GGA | GGC | GGG | GGU | | | |
| Histidine | His | H | CAC | CAU | | | | | |
| Isoleucine | Ile | I | AUA | AUC | AUU | | | | |
| Lysine | Lys | K | AAA | AAG | | | | | |
| Leucine | Leu | L | UUA | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU | |
| Methionine | Met | M | AUG | | | | | | |
| Asparagine | Asn | N | AAC | AAU | | | | | |
| Proline | Pro | P | CCA | CCC | CCG | CCU | | | |
| Glutamine | Gln | Q | CAA | CAG | | | | | |
| Arginine | Arg | R | AGA | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU | |
| Serine | Ser | S | AGC | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU | |
| Threonine | Thr | T | ACA | ACC | ACG | ACU | | | |
| Valine | Val | V | GUA | GUC | GUG | GUU | | | |
| Tryptophan | Trp | W | UGG | | | | | | |
| Tyrosine | Tyr | Y | UAC | UAU | | | | | |

10 In making such changes, the hydrophobic index of amino acids may be considered. The importance of the hydrophobic amino acid index in conferring interactive biologic function on a protein is generally understood in the art (Kyte and

Doolittle, 1982, incorporated herein by reference). It is accepted that the relative hydrophobic character of the amino acid contributes to the secondary structure of the resultant protein, which in turn defines the interaction of the protein with other molecules, for example, enzymes, substrates, receptors, DNA, antibodies, antigens, and the like. Each amino acid has been assigned a hydrophobic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics (Kyte and Doolittle, 1982). These values are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

It is known in the art that certain amino acids may be substituted by other amino acids having a similar hydrophobic index or score and still result in a protein with similar biological activity, *i.e.* still obtain a biologically equivalent protein. In making such changes, the substitution of amino acids whose hydrophobic indices are within ± 2 is preferred, those within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophobicity. U. S. Patent 4,554,101 (specifically incorporated herein by reference in its entirety), states that the greatest local average hydrophobicity of a protein, as governed by the hydrophobicity of its adjacent amino acids, correlates with a biological property of the protein.

As detailed in U. S. Patent 4,554,101, the following hydrophobicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 \pm 1); glutamate (+3.0 \pm 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 \pm 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4). It is understood that an amino acid can be substituted for another having a similar hydrophobicity value and still obtain a biologically equivalent, and in particular, an immunologically equivalent protein. In such changes, the substitution of amino acids whose hydrophobicity values are within ± 2

WO 01/96388

PCT/US01/18557

14

is preferred, those within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

As outlined above, amino acid substitutions are generally therefore based on the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, for example, their hydrophobicity, hydrophilicity, charge, size, and the like. Exemplary substitutions that take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

In addition, any polynucleotide may be further modified to increase stability *in vivo*. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences at the 5' and/or 3' ends; the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages in the backbone; and/or the inclusion of nontraditional bases such as inosine, quosine and wybutosine, as well as acetyl-methyl-, thio- and other modified forms of adenine, cytidine, guanine, thymine and uridine.

Amino acid substitutions may further be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity and/or the amphipathic nature of the residues. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine and valine; glycine and alanine; asparagine and glutamine; and serine, threonine, phenylalanine and tyrosine. Other groups of amino acids that may represent conservative changes include: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his. A variant may also, or alternatively, contain nonconservative changes. In a preferred embodiment, variant polypeptides differ from a native sequence by substitution, deletion or addition of five amino acids or fewer. Variants may also (or alternatively) be modified by, for example, the deletion or addition of amino acids that have minimal influence on the immunogenicity, secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide.

As noted above, polypeptides may comprise a signal (or leader) sequence at the N-terminal end of the protein, which co-translationally or post-translationally directs transfer of the protein. The polypeptide may also be conjugated to a linker or other sequence for ease of synthesis, purification or identification of the polypeptide (e.g., poly-His), or to enhance binding of the polypeptide to a solid support. For example, a polypeptide may be conjugated to an immunoglobulin Fc region.

When comparing polypeptide sequences, two sequences are said to be "identical" if the sequence of amino acids in the two sequences is the same when aligned for maximum correspondence, as described below. Comparisons between two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, 40 to about 50, in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted using the Megalign program in the Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI), using default parameters. This program embodies several alignment schemes described in the following references: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins -- Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenics pp. 626-645 *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) *CABIOS* 5:151-153; Myers, E.W. and Müller W. (1988) *CABIOS* 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) *Comb. Theor* 11:105; Saitou, N. Nei, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) *Proc. Natl. Acad., Sci. USA* 80:726-730.

Alternatively, optimal alignment of sequences for comparison may be conducted by the local identity algorithm of Smith and Waterman (1981) *Adv. APL*

WO 01/96388

PCT/US01/18557

16

Math 2:482, by the identity alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, by the search for similarity methods of Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), or by inspection.

One preferred example of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul et al. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 and Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectively. BLAST and BLAST 2.0 can be used, for example with the parameters described herein, to determine percent sequence identity for the polynucleotides and polypeptides of the invention. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. For amino acid sequences, a scoring matrix can be used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W , T and X determine the sensitivity and speed of the alignment.

In one preferred approach, the "percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions, wherein the portion of the polypeptide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (*i.e.*, gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the reference sequence (*i.e.*, the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

17

Within other illustrative embodiments, a polypeptide may be a xenogenic polypeptide that comprises a polypeptide having substantial sequence identity, as described above, to the human polypeptide (also termed autologous antigen) which served as a reference polypeptide, but which xenogenic polypeptide is derived from a different, non-human species. One skilled in the art will recognize that "self" antigens are often poor stimulators of CD8+ and CD4+ T-lymphocyte responses, and therefore efficient immunotherapeutic strategies directed against tumor polypeptides require the development of methods to overcome immune tolerance to particular self tumor polypeptides. For example, humans immunized with prostate protein from a xenogenic (non human) origin are capable of mounting an immune response against the counterpart human protein, e.g. the human prostate tumor protein present on human tumor cells. Accordingly, the present invention provides methods for purifying the xenogenic form of the tumor proteins set forth herein, such as the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2235, or those encoded by polynucleotide sequences set forth in SEQ ID NO:1-2234.

Therefore, one aspect of the present invention provides xenogenic variants of the polypeptide compositions described herein. Such xenogenic variants generally encompassed by the present invention will typically exhibit at least about 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% or more identity along their lengths, to a polypeptide sequences set forth herein.

More particularly, the invention is directed to mouse, rat, monkey, porcine and other non-human polypeptides which can be used as xenogenic forms of human polypeptides set forth herein, to induce immune responses directed against tumor polypeptides of the invention.

Within other illustrative embodiments, a polypeptide may be a fusion polypeptide that comprises multiple polypeptides as described herein, or that comprises at least one polypeptide as described herein and an unrelated sequence, such as a known tumor protein. A fusion partner may, for example, assist in providing T helper epitopes (an immunological fusion partner), preferably T helper epitopes recognized by humans, or may assist in expressing the protein (an expression enhancer) at higher yields than the native recombinant protein. Certain preferred fusion partners are both

immunological and expression enhancing fusion partners. Other fusion partners may be selected so as to increase the solubility of the polypeptide or to enable the polypeptide to be targeted to desired intracellular compartments. Still further fusion partners include affinity tags, which facilitate purification of the polypeptide.

5 Fusion polypeptides may generally be prepared using standard techniques, including chemical conjugation. Preferably, a fusion polypeptide is expressed as a recombinant polypeptide, allowing the production of increased levels, relative to a non-fused polypeptide, in an expression system. Briefly, DNA sequences encoding the polypeptide components may be assembled separately, and ligated into an
10 appropriate expression vector. The 3' end of the DNA sequence encoding one polypeptide component is ligated, with or without a peptide linker, to the 5' end of a DNA sequence encoding the second polypeptide component so that the reading frames of the sequences are in phase. This permits translation into a single fusion polypeptide that retains the biological activity of both component polypeptides.

15 A peptide linker sequence may be employed to separate the first and second polypeptide components by a distance sufficient to ensure that each polypeptide folds into its secondary and tertiary structures. Such a peptide linker sequence is incorporated into the fusion polypeptide using standard techniques well known in the art. Suitable peptide linker sequences may be chosen based on the following factors:
20 (1) their ability to adopt a flexible extended conformation; (2) their inability to adopt a secondary structure that could interact with functional epitopes on the first and second polypeptides; and (3) the lack of hydrophobic or charged residues that might react with the polypeptide functional epitopes. Preferred peptide linker sequences contain Gly, Asn and Ser residues. Other near neutral amino acids, such as Thr and Ala may also be
25 used in the linker sequence. Amino acid sequences which may be usefully employed as linkers include those disclosed in Maratea et al., *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262, 1986; U.S. Patent No. 4,935,233 and U.S. Patent No. 4,751,180. The linker sequence may generally be from 1 to about 50 amino acids in length. Linker sequences are not required when the first and second
30 polypeptides have non-essential N-terminal amino acid regions that can be used to separate the functional domains and prevent steric interference.

The ligated DNA sequences are operably linked to suitable transcriptional or translational regulatory elements. The regulatory elements responsible for expression of DNA are located only 5' to the DNA sequence encoding the first polypeptides. Similarly, stop codons required to end translation and transcription termination signals are only present 3' to the DNA sequence encoding the second polypeptide.

The fusion polypeptide can comprise a polypeptide as described herein together with an unrelated immunogenic protein, such as an immunogenic protein capable of eliciting a recall response. Examples of such proteins include tetanus, tuberculosis and hepatitis proteins (see, for example, Stoute et al. *New Engl. J. Med.*, 336:86-91, 1997).

In one preferred embodiment, the immunological fusion partner is derived from a *Mycobacterium* sp., such as a *Mycobacterium tuberculosis*-derived Ra12 fragment. Ra12 compositions and methods for their use in enhancing the expression and/or immunogenicity of heterologous polynucleotide/polypeptide sequences is described in U.S. Patent Application 60/158,585, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety. Briefly, Ra12 refers to a polynucleotide region that is a subsequence of a *Mycobacterium tuberculosis* MTB32A nucleic acid. MTB32A is a serine protease of 32 KD molecular weight encoded by a gene in virulent and avirulent strains of *M. tuberculosis*. The nucleotide sequence and amino acid sequence of MTB32A have been described (for example, U.S. Patent Application 60/158,585; see also, Skeiky et al., *Infection and Immun.* (1999) 67:3998-4007, incorporated herein by reference). C-terminal fragments of the MTB32A coding sequence express at high levels and remain as a soluble polypeptides throughout the purification process. Moreover, Ra12 may enhance the immunogenicity of heterologous immunogenic polypeptides with which it is fused. One preferred Ra12 fusion polypeptide comprises a 14 KD C-terminal fragment corresponding to amino acid residues 192 to 323 of MTB32A. Other preferred Ra12 polynucleotides generally comprise at least about 15 consecutive nucleotides, at least about 30 nucleotides, at least about 60 nucleotides, at least about 100 nucleotides, at least about 200 nucleotides, or at least about 300 nucleotides that encode a portion of a Ra12 polypeptide. Ra12

polynucleotides may comprise a native sequence (i.e., an endogenous sequence that encodes a Ra12 polypeptide or a portion thereof) or may comprise a variant of such a sequence. Ra12 polynucleotide variants may contain one or more substitutions, additions, deletions and/or insertions such that the biological activity of the encoded fusion polypeptide is not substantially diminished, relative to a fusion polypeptide comprising a native Ra12 polypeptide. Variants preferably exhibit at least about 70% identity, more preferably at least about 80% identity and most preferably at least about 90% identity to a polynucleotide sequence that encodes a native Ra12 polypeptide or a portion thereof.

10 Within other preferred embodiments, an immunological fusion partner is derived from protein D, a surface protein of the gram-negative bacterium *Haemophilus influenzae* B (WO 91/18926). Preferably, a protein D derivative comprises approximately the first third of the protein (e.g., the first N-terminal 100-110 amino acids), and a protein D derivative may be lipidated. Within certain preferred
15 embodiments, the first 109 residues of a Lipoprotein D fusion partner is included on the N-terminus to provide the polypeptide with additional exogenous T-cell epitopes and to increase the expression level in *E. coli* (thus functioning as an expression enhancer). The lipid tail ensures optimal presentation of the antigen to antigen presenting cells. Other fusion partners include the non-structural protein from influenzae virus, NS1
20 (hemagglutinin). Typically, the N-terminal 81 amino acids are used, although different fragments that include T-helper epitopes may be used.

In another embodiment, the immunological fusion partner is the protein known as LYTA, or a portion thereof (preferably a C-terminal portion). LYTA is derived from *Streptococcus pneumoniae*, which synthesizes an N-acetyl-L-alanine amidase known as amidase LYTA (encoded by the *LytA* gene; *Gene* 43:265-292,
25 1986). LYTA is an autolysin that specifically degrades certain bonds in the peptidoglycan backbone. The C-terminal domain of the LYTA protein is responsible for the affinity to the choline or to some choline analogues such as DMAE. This property has been exploited for the development of *E. coli* C-LYTA expressing
30 plasmids useful for expression of fusion proteins. Purification of hybrid proteins containing the C-LYTA fragment at the amino terminus has been described (see

Biotechnology 10:795-798, 1992). Within a preferred embodiment, a repeat portion of LYTA may be incorporated into a fusion polypeptide. A repeat portion is found in the C-terminal region starting at residue 178. A particularly preferred repeat portion incorporates residues 188-305.

5 Yet another illustrative embodiment involves fusion polypeptides, and the polynucleotides encoding them, wherein the fusion partner comprises a targeting signal capable of directing a polypeptide to the endosomal/lysosomal compartment, as described in U.S. Patent No. 5,633,234. An immunogenic polypeptide of the invention, when fused with this targeting signal, will associate more efficiently with MHC class II
10 molecules and thereby provide enhanced in vivo stimulation of CD4⁺ T-cells specific for the polypeptide.

Polypeptides of the invention are prepared using any of a variety of well known synthetic and/or recombinant techniques, the latter of which are further described below. Polypeptides, portions and other variants generally less than about
15 150 amino acids can be generated by synthetic means, using techniques well known to those of ordinary skill in the art. In one illustrative example, such polypeptides are synthesized using any of the commercially available solid-phase techniques, such as the Merrifield solid-phase synthesis method, where amino acids are sequentially added to a growing amino acid chain. See Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146, 1963.
20 Equipment for automated synthesis of polypeptides is commercially available from suppliers such as Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), and may be operated according to the manufacturer's instructions.

In general, polypeptide compositions (including fusion polypeptides) of the invention are isolated. An "isolated" polypeptide is one that is removed from its
25 original environment. For example, a naturally-occurring protein or polypeptide is isolated if it is separated from some or all of the coexisting materials in the natural system. Preferably, such polypeptides are also purified, e.g., are at least about 90% pure, more preferably at least about 95% pure and most preferably at least about 99% pure.

POLYNUCLEOTIDE COMPOSITIONS

The present invention, in other aspects, provides polynucleotide compositions. The terms "DNA" and "polynucleotide" are used essentially interchangeably herein to refer to a DNA molecule that has been isolated free of total genomic DNA of a particular species. "Isolated," as used herein, means that a polynucleotide is substantially away from other coding sequences, and that the DNA molecule does not contain large portions of unrelated coding DNA, such as large chromosomal fragments or other functional genes or polypeptide coding regions. Of course, this refers to the DNA molecule as originally isolated, and does not exclude genes or coding regions later added to the segment by the hand of man.

As will be understood by those skilled in the art, the polynucleotide compositions of this invention can include genomic sequences, extra-genomic and plasmid-encoded sequences and smaller engineered gene segments that express, or may be adapted to express, proteins, polypeptides, peptides and the like. Such segments may be naturally isolated, or modified synthetically by the hand of man.

As will be also recognized by the skilled artisan, polynucleotides of the invention may be single-stranded (coding or antisense) or double-stranded, and may be DNA (genomic, cDNA or synthetic) or RNA molecules. RNA molecules may include HnRNA molecules, which contain introns and correspond to a DNA molecule in a one-to-one manner, and mRNA molecules, which do not contain introns. Additional coding or non-coding sequences may, but need not, be present within a polynucleotide of the present invention, and a polynucleotide may, but need not, be linked to other molecules and/or support materials.

Polynucleotides may comprise a native sequence (*i.e.*, an endogenous sequence that encodes a polypeptide/protein of the invention or a portion thereof) or may comprise a sequence that encodes a variant or derivative, preferably and immunogenic variant or derivative, of such a sequence.

Therefore, according to another aspect of the present invention, polynucleotide compositions are provided that comprise some or all of a polynucleotide sequence set forth in any one of SEQ ID NO:1-2234, complements of a polynucleotide sequence set forth in any one of SEQ ID NO:1-2234, and degenerate variants of a

WO 01/96388

PCT/US01/18557

23

polynucleotide sequence set forth in any one of SEQ ID NO:1-2234. In certain preferred embodiments, the polynucleotide sequences set forth herein encode immunogenic polypeptides, as described above.

In other related embodiments, the present invention provides
5 polynucleotide variants having substantial identity to the sequences disclosed herein in SEQ ID NO:1-2234, for example those comprising at least 70% sequence identity, preferably at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% or higher, sequence identity compared to a polynucleotide sequence of this invention using the
10 methods described herein, (*e.g.*, BLAST analysis using standard parameters, as described below). One skilled in this art will recognize that these values can be appropriately adjusted to determine corresponding identity of proteins encoded by two nucleotide sequences by taking into account codon degeneracy, amino acid similarity, reading frame positioning and the like.

Typically, polynucleotide variants will contain one or more substitutions,
15 additions, deletions and/or insertions, preferably such that the immunogenicity of the polypeptide encoded by the variant polynucleotide is not substantially diminished relative to a polypeptide encoded by a polynucleotide sequence specifically set forth herein). The term "variants" should also be understood to encompass homologous genes of xenogenic origin.

In additional embodiments, the present invention provides
20 polynucleotide fragments comprising or consisting of various lengths of contiguous stretches of sequence identical to or complementary to one or more of the sequences disclosed herein. For example, polynucleotides are provided by this invention that comprise or consist of at least about 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400,
25 500 or 1000 or more contiguous nucleotides of one or more of the sequences disclosed herein as well as all intermediate lengths there between. It will be readily understood that "intermediate lengths", in this context, means any length between the quoted values, such as 16, 17, 18, 19, *etc.*; 21, 22, 23, *etc.*; 30, 31, 32, *etc.*; 50, 51, 52, 53, *etc.*; 100, 101, 102, 103, *etc.*; 150, 151, 152, 153, *etc.*; including all integers through 200-
30 500; 500-1,000, and the like. A polynucleotide sequence as described here may be extended at one or both ends by additional nucleotides not found in the native sequence.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

24

This additional sequence may consist of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 nucleotides at either end of the disclosed sequence or at both ends of the disclosed sequence.

In another embodiment of the invention, polynucleotide compositions
5 are provided that are capable of hybridizing under moderate to high stringency conditions to a polynucleotide sequence provided herein, or a fragment thereof, or a complementary sequence thereof. Hybridization techniques are well known in the art of molecular biology. For purposes of illustration, suitable moderately stringent conditions for testing the hybridization of a polynucleotide of this invention with other
10 polynucleotides include prewashing in a solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50°C-60°C, 5 X SSC, overnight; followed by washing twice at 65°C for 20 minutes with each of 2X, 0.5X and 0.2X SSC containing 0.1% SDS. One skilled in the art will understand that the stringency of hybridization can be readily manipulated, such as by altering the salt content of the hybridization solution
15 and/or the temperature at which the hybridization is performed. For example, in another embodiment, suitable highly stringent hybridization conditions include those described above, with the exception that the temperature of hybridization is increased, e.g., to 60-65°C or 65-70°C.

In certain preferred embodiments, the polynucleotides described above,
20 e.g., polynucleotide variants, fragments and hybridizing sequences, encode polypeptides that are immunologically cross-reactive with a polypeptide sequence specifically set forth herein. In other preferred embodiments, such polynucleotides encode polypeptides that have a level of immunogenic activity of at least about 50%, preferably at least about 70%, and more preferably at least about 90% of that for a
25 polypeptide sequence specifically set forth herein.

The polynucleotides of the present invention, or fragments thereof, regardless of the length of the coding sequence itself, may be combined with other DNA sequences, such as promoters, polyadenylation signals, additional restriction enzyme sites, multiple cloning sites, other coding segments, and the like, such that their
30 overall length may vary considerably. It is therefore contemplated that a nucleic acid fragment of almost any length may be employed, with the total length preferably being

limited by the ease of preparation and use in the intended recombinant DNA protocol. For example, illustrative polynucleotide segments with total lengths of about 10,000, about 5000, about 3000, about 2,000, about 1,000, about 500, about 200, about 100, about 50 base pairs in length, and the like, (including all intermediate lengths) are contemplated to be useful in many implementations of this invention.

When comparing polynucleotide sequences, two sequences are said to be "identical" if the sequence of nucleotides in the two sequences is the same when aligned for maximum correspondence, as described below. Comparisons between two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, 40 to about 50, in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted using the Megalign program in the Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI), using default parameters. This program embodies several alignment schemes described in the following references: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) *CABIOS* 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) *CABIOS* 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) *Comb. Theor* 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1975) *Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) *Proc. Natl. Acad., Sci. USA* 80:726-730.

Alternatively, optimal alignment of sequences for comparison may be conducted by the local identity algorithm of Smith and Waterman (1981) *Adv. APL Math* 2:482, by the identity alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J.*

Mol. Biol. 48:443, by the search for similarity methods of Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI),
5 or by inspection.

One preferred example of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 and Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectively. BLAST and BLAST
10 2.0 can be used, for example with the parameters described herein, to determine percent sequence identity for the polynucleotides of the invention. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. In one illustrative example, cumulative scores can be calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues;
15 always >0) and N (penalty score for mismatching residues; always <0). Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T and X
20 determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alignments, (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands.

25 Preferably, the "percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions, wherein the portion of the polynucleotide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (*i.e.*, gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does
30 not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical

nucleic acid bases occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the reference sequence (*i.e.*, the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

5 It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that, as a result of the degeneracy of the genetic code, there are many nucleotide sequences that encode a polypeptide as described herein. Some of these polynucleotides bear minimal homology to the nucleotide sequence of any native gene. Nonetheless, polynucleotides that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present
10 invention. Further, alleles of the genes comprising the polynucleotide sequences provided herein are within the scope of the present invention. Alleles are endogenous genes that are altered as a result of one or more mutations, such as deletions, additions and/or substitutions of nucleotides. The resulting mRNA and protein may, but need not, have an altered structure or function. Alleles may be identified using standard
15 techniques (such as hybridization, amplification and/or database sequence comparison).

Therefore, in another embodiment of the invention, a mutagenesis approach, such as site-specific mutagenesis, is employed for the preparation of immunogenic variants and/or derivatives of the polypeptides described herein. By this approach, specific modifications in a polypeptide sequence can be made through
20 mutagenesis of the underlying polynucleotides that encode them. These techniques provides a straightforward approach to prepare and test sequence variants, for example, incorporating one or more of the foregoing considerations, by introducing one or more nucleotide sequence changes into the polynucleotide.

Site-specific mutagenesis allows the production of mutants through the
25 use of specific oligonucleotide sequences which encode the DNA sequence of the desired mutation, as well as a sufficient number of adjacent nucleotides, to provide a primer sequence of sufficient size and sequence complexity to form a stable duplex on both sides of the deletion junction being traversed. Mutations may be employed in a selected polynucleotide sequence to improve, alter, decrease, modify, or otherwise
30 change the properties of the polynucleotide itself, and/or alter the properties, activity, composition, stability, or primary sequence of the encoded polypeptide.

In certain embodiments of the present invention, the inventors contemplate the mutagenesis of the disclosed polynucleotide sequences to alter one or more properties of the encoded polypeptide, such as the immunogenicity of a polypeptide vaccine. The techniques of site-specific mutagenesis are well-known in the art, and are widely used to create variants of both polypeptides and polynucleotides. For example, site-specific mutagenesis is often used to alter a specific portion of a DNA molecule. In such embodiments, a primer comprising typically about 14 to about 25 nucleotides or so in length is employed, with about 5 to about 10 residues on both sides of the junction of the sequence being altered.

As will be appreciated by those of skill in the art, site-specific mutagenesis techniques have often employed a phage vector that exists in both a single stranded and double stranded form. Typical vectors useful in site-directed mutagenesis include vectors such as the M13 phage. These phage are readily commercially-available and their use is generally well-known to those skilled in the art. Double-stranded plasmids are also routinely employed in site directed mutagenesis that eliminates the step of transferring the gene of interest from a plasmid to a phage.

In general, site-directed mutagenesis in accordance herewith is performed by first obtaining a single-stranded vector or melting apart of two strands of a double-stranded vector that includes within its sequence a DNA sequence that encodes the desired peptide. An oligonucleotide primer bearing the desired mutated sequence is prepared, generally synthetically. This primer is then annealed with the single-stranded vector, and subjected to DNA polymerizing enzymes such as *E. coli* polymerase I Klenow fragment, in order to complete the synthesis of the mutation-bearing strand. Thus, a heteroduplex is formed wherein one strand encodes the original non-mutated sequence and the second strand bears the desired mutation. This heteroduplex vector is then used to transform appropriate cells, such as *E. coli* cells, and clones are selected which include recombinant vectors bearing the mutated sequence arrangement.

The preparation of sequence variants of the selected peptide-encoding DNA segments using site-directed mutagenesis provides a means of producing potentially useful species and is not meant to be limiting as there are other ways in

which sequence variants of peptides and the DNA sequences encoding them may be obtained. For example, recombinant vectors encoding the desired peptide sequence may be treated with mutagenic agents, such as hydroxylamine, to obtain sequence variants. Specific details regarding these methods and protocols are found in the teachings of Maloy *et al.*, 1994; Segal, 1976; Prokop and Bajpai, 1991; Kuby, 1994; and Maniatis *et al.*, 1982, each incorporated herein by reference, for that purpose.

As used herein, the term "oligonucleotide directed mutagenesis procedure" refers to template-dependent processes and vector-mediated propagation which result in an increase in the concentration of a specific nucleic acid molecule relative to its initial concentration, or in an increase in the concentration of a detectable signal, such as amplification. As used herein, the term "oligonucleotide directed mutagenesis procedure" is intended to refer to a process that involves the template-dependent extension of a primer molecule. The term template dependent process refers to nucleic acid synthesis of an RNA or a DNA molecule wherein the sequence of the newly synthesized strand of nucleic acid is dictated by the well-known rules of complementary base pairing (see, for example, Watson, 1987). Typically, vector mediated methodologies involve the introduction of the nucleic acid fragment into a DNA or RNA vector, the clonal amplification of the vector, and the recovery of the amplified nucleic acid fragment. Examples of such methodologies are provided by U. S. Patent No. 4,237,224, specifically incorporated herein by reference in its entirety.

In another approach for the production of polypeptide variants of the present invention, recursive sequence recombination, as described in U.S. Patent No. 5,837,458, may be employed. In this approach, iterative cycles of recombination and screening or selection are performed to "evolve" individual polynucleotide variants of the invention having, for example, enhanced immunogenic activity.

In other embodiments of the present invention, the polynucleotide sequences provided herein can be advantageously used as probes or primers for nucleic acid hybridization. As such, it is contemplated that nucleic acid segments that comprise or consist of a sequence region of at least about a 15 nucleotide long contiguous sequence that has the same sequence as, or is complementary to, a 15 nucleotide long contiguous sequence disclosed herein will find particular utility. Longer contiguous

identical or complementary sequences, *e.g.*, those of about 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 (including all intermediate lengths) and even up to full length sequences will also be of use in certain embodiments.

The ability of such nucleic acid probes to specifically hybridize to a
5 sequence of interest will enable them to be of use in detecting the presence of complementary sequences in a given sample. However, other uses are also envisioned, such as the use of the sequence information for the preparation of mutant species primers, or primers for use in preparing other genetic constructions.

Polynucleotide molecules having sequence regions consisting of
10 contiguous nucleotide stretches of 10-14, 15-20, 30, 50, or even of 100-200 nucleotides or so (including intermediate lengths as well), identical or complementary to a polynucleotide sequence disclosed herein, are particularly contemplated as hybridization probes for use *in, e.g.*, Southern and Northern blotting. This would allow a gene product, or fragment thereof, to be analyzed, both in diverse cell types and also
15 in various bacterial cells. The total size of fragment, as well as the size of the complementary stretch(es), will ultimately depend on the intended use or application of the particular nucleic acid segment. Smaller fragments will generally find use in hybridization embodiments, wherein the length of the contiguous complementary region may be varied, such as between about 15 and about 100 nucleotides, but larger
20 contiguous complementarity stretches may be used, according to the length complementary sequences one wishes to detect.

The use of a hybridization probe of about 15-25 nucleotides in length allows the formation of a duplex molecule that is both stable and selective. Molecules having contiguous complementary sequences over stretches greater than 15 bases in
25 length are generally preferred, though, in order to increase stability and selectivity of the hybrid, and thereby improve the quality and degree of specific hybrid molecules obtained. One will generally prefer to design nucleic acid molecules having gene-complementary stretches of 15 to 25 contiguous nucleotides, or even longer where desired.

30 Hybridization probes may be selected from any portion of any of the sequences disclosed herein. All that is required is to review the sequences set forth

WO 01/96388

PCT/US01/18557

31

herein, or to any continuous portion of the sequences, from about 15-25 nucleotides in length up to and including the full length sequence, that one wishes to utilize as a probe or primer. The choice of probe and primer sequences may be governed by various factors. For example, one may wish to employ primers from towards the termini of the
5 total sequence.

Small polynucleotide segments or fragments may be readily prepared by, for example, directly synthesizing the fragment by chemical means, as is commonly practiced using an automated oligonucleotide synthesizer. Also, fragments may be obtained by application of nucleic acid reproduction technology, such as the PCR™
10 technology of U. S. Patent 4,683,202 (incorporated herein by reference), by introducing selected sequences into recombinant vectors for recombinant production, and by other recombinant DNA techniques generally known to those of skill in the art of molecular biology.

The nucleotide sequences of the invention may be used for their ability
15 to selectively form duplex molecules with complementary stretches of the entire gene or gene fragments of interest. Depending on the application envisioned, one will typically desire to employ varying conditions of hybridization to achieve varying degrees of selectivity of probe towards target sequence. For applications requiring high selectivity, one will typically desire to employ relatively stringent conditions to form
20 the hybrids, e.g., one will select relatively low salt and/or high temperature conditions, such as provided by a salt concentration of from about 0.02 M to about 0.15 M salt at temperatures of from about 50°C to about 70°C. Such selective conditions tolerate little, if any, mismatch between the probe and the template or target strand, and would be particularly suitable for isolating related sequences.

Of course, for some applications, for example, where one desires to
25 prepare mutants employing a mutant primer strand hybridized to an underlying template, less stringent (reduced stringency) hybridization conditions will typically be needed in order to allow formation of the heteroduplex. In these circumstances, one may desire to employ salt conditions such as those of from about 0.15 M to about 0.9 M
30 salt, at temperatures ranging from about 20°C to about 55°C. Cross-hybridizing species can thereby be readily identified as positively hybridizing signals with respect to control

hybridizations. In any case, it is generally appreciated that conditions can be rendered more stringent by the addition of increasing amounts of formamide, which serves to destabilize the hybrid duplex in the same manner as increased temperature. Thus, hybridization conditions can be readily manipulated, and thus will generally be a method of choice depending on the desired results.

According to another embodiment of the present invention, polynucleotide compositions comprising antisense oligonucleotides are provided. Antisense oligonucleotides have been demonstrated to be effective and targeted inhibitors of protein synthesis, and, consequently, provide a therapeutic approach by which a disease can be treated by inhibiting the synthesis of proteins that contribute to the disease. The efficacy of antisense oligonucleotides for inhibiting protein synthesis is well established. For example, the synthesis of polygalacturonase and the muscarinic type 2 acetylcholine receptor are inhibited by antisense oligonucleotides directed to their respective mRNA sequences (U. S. Patent 5,739,119 and U. S. Patent 5,759,829). Further, examples of antisense inhibition have been demonstrated with the nuclear protein cyclin, the multiple drug resistance gene (MDG1), ICAM-1, E-selectin, STK-1, striatal GABA_A receptor and human EGF (Jaskulski *et al.*, Science, 1988 Jun 10;240(4858):1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, Cancer Commun. 1989;1(4):225-32; Peris *et al.*, Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15;57(2):310-20; U. S. Patent 5,801,154; U.S. Patent 5,789,573; U. S. Patent 5,718,709 and U.S. Patent 5,610,288). Antisense constructs have also been described that inhibit and can be used to treat a variety of abnormal cellular proliferations, e.g. cancer (U. S. Patent 5,747,470; U. S. Patent 5,591,317 and U. S. Patent 5,783,683).

Therefore, in certain embodiments, the present invention provides oligonucleotide sequences that comprise all, or a portion of, any sequence that is capable of specifically binding to polynucleotide sequence described herein, or a complement thereof. In one embodiment, the antisense oligonucleotides comprise DNA or derivatives thereof. In another embodiment, the oligonucleotides comprise RNA or derivatives thereof. In a third embodiment, the oligonucleotides are modified DNAs comprising a phosphorothioated modified backbone. In a fourth embodiment, the oligonucleotide sequences comprise peptide nucleic acids or derivatives thereof. In

each case, preferred compositions comprise a sequence region that is complementary, and more preferably substantially-complementary, and even more preferably, completely complementary to one or more portions of polynucleotides disclosed herein. Selection of antisense compositions specific for a given gene sequence is based upon
5 analysis of the chosen target sequence and determination of secondary structure, T_m , binding energy, and relative stability. Antisense compositions may be selected based upon their relative inability to form dimers, hairpins, or other secondary structures that would reduce or prohibit specific binding to the target mRNA in a host cell. Highly preferred target regions of the mRNA, are those which are at or near the AUG
10 translation initiation codon, and those sequences which are substantially complementary to 5' regions of the mRNA. These secondary structure analyses and target site selection considerations can be performed, for example, using v.4 of the OLIGO primer analysis software and/or the BLASTN 2.0.5 algorithm software (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402).

15 The use of an antisense delivery method employing a short peptide vector, termed MPG (27 residues), is also contemplated. The MPG peptide contains a hydrophobic domain derived from the fusion sequence of HIV gp41 and a hydrophilic domain from the nuclear localization sequence of SV40 T-antigen (Morris *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997 Jul 15;25(14):2730-6). It has been demonstrated that several
20 molecules of the MPG peptide coat the antisense oligonucleotides and can be delivered into cultured mammalian cells in less than 1 hour with relatively high efficiency (90%). Further, the interaction with MPG strongly increases both the stability of the oligonucleotide to nuclease and the ability to cross the plasma membrane.

According to another embodiment of the invention, the polynucleotide
25 compositions described herein are used in the design and preparation of ribozyme molecules for inhibiting expression of the tumor polypeptides and proteins of the present invention in tumor cells. Ribozymes are RNA-protein complexes that cleave nucleic acids in a site-specific fashion. Ribozymes have specific catalytic domains that possess endonuclease activity (Kim and Cech, Proc Natl Acad Sci U S A. 1987
30 Dec;84(24):8788-92; Forster and Symons, Cell. 1987 Apr 24;49(2):211-20). For example, a large number of ribozymes accelerate phosphoester transfer reactions with a

high degree of specificity, often cleaving only one of several phosphoesters in an oligonucleotide substrate (Cech *et al.*, *Cell*, 1981 Dec;27(3 Pt 2):487-96; Michel and Westhof, *J Mol Biol*, 1990 Dec 5;216(3):585-610; Reinhold-Hurek and Shub, *Nature*, 1992 May 14;357(6374):173-6). This specificity has been attributed to the requirement
5 that the substrate bind via specific base-pairing interactions to the internal guide sequence ("IGS") of the ribozyme prior to chemical reaction.

Six basic varieties of naturally-occurring enzymatic RNAs are known presently. Each can catalyze the hydrolysis of RNA phosphodiester bonds *in trans* (and thus can cleave other RNA molecules) under physiological conditions. In general,
10 enzymatic nucleic acids act by first binding to a target RNA. Such binding occurs through the target binding portion of an enzymatic nucleic acid which is held in close proximity to an enzymatic portion of the molecule that acts to cleave the target RNA. Thus, the enzymatic nucleic acid first recognizes and then binds a target RNA through
15 complementary base-pairing, and once bound to the correct site, acts enzymatically to cut the target RNA. Strategic cleavage of such a target RNA will destroy its ability to direct synthesis of an encoded protein. After an enzymatic nucleic acid has bound and cleaved its RNA target, it is released from that RNA to search for another target and can repeatedly bind and cleave new targets.

The enzymatic nature of a ribozyme is advantageous over many
20 technologies, such as antisense technology (where a nucleic acid molecule simply binds to a nucleic acid target to block its translation) since the concentration of ribozyme necessary to affect a therapeutic treatment is lower than that of an antisense oligonucleotide. This advantage reflects the ability of the ribozyme to act enzymatically. Thus, a single ribozyme molecule is able to cleave many molecules of
25 target RNA. In addition, the ribozyme is a highly specific inhibitor, with the specificity of inhibition depending not only on the base pairing mechanism of binding to the target RNA, but also on the mechanism of target RNA cleavage. Single mismatches, or base-substitutions, near the site of cleavage can completely eliminate catalytic activity of a ribozyme. Similar mismatches in antisense molecules do not prevent their action
30 (Woolf *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992 Aug 15;89(16):7305-9). Thus, the

WO 01/96388

PCT/US01/18557

35

specificity of action of a ribozyme is greater than that of an antisense oligonucleotide binding the same RNA site.

The enzymatic nucleic acid molecule may be formed in a hammerhead, hairpin, a hepatitis δ virus, group I intron or RNaseP RNA (in association with an RNA guide sequence) or Neurospora VS RNA motif. Examples of hammerhead motifs are described by Rossi *et al.* Nucleic Acids Res. 1992 Sep 11;20(17):4559-65. Examples of hairpin motifs are described by Hampel *et al.* (Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP 0360257), Hampel and Trütz, Biochemistry 1989 Jun 13;28(12):4929-33; Hampel *et al.*, Nucleic Acids Res. 1990 Jan 25;18(2):299-304 and U. S. Patent 5,631,359. An example of the hepatitis δ virus motif is described by Perrotta and Been, Biochemistry. 1992 Dec 1;31(47):11843-52; an example of the RNaseP motif is described by Guerrier-Takada *et al.*, Cell. 1983 Dec;35(3 Pt 2):849-57; Neurospora VS RNA ribozyme motif is described by Collins (Saville and Collins, Cell. 1990 May 18;61(4):685-96; Saville and Collins, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 1;88(19):8826-30; Collins and Olive, Biochemistry. 1993 Mar 23;32(11):2795-9); and an example of the Group I intron is described in (U. S. Patent 4,987,071). All that is important in an enzymatic nucleic acid molecule of this invention is that it has a specific substrate binding site which is complementary to one or more of the target gene RNA regions, and that it have nucleotide sequences within or surrounding that substrate binding site which impart an RNA cleaving activity to the molecule. Thus the ribozyme constructs need not be limited to specific motifs mentioned herein.

Ribozymes may be designed as described in Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/23569 and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595, each specifically incorporated herein by reference) and synthesized to be tested *in vitro* and *in vivo*, as described. Such ribozymes can also be optimized for delivery. While specific examples are provided, those in the art will recognize that equivalent RNA targets in other species can be utilized when necessary.

Ribozyme activity can be optimized by altering the length of the ribozyme binding arms, or chemically synthesizing ribozymes with modifications that prevent their degradation by serum ribonucleases (see e.g., Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 92/07065; Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/15187; Int. Pat. Appl. Publ. No. WO

WO 01/96388

PCT/US01/18557

36

91/03162; Eur. Pat. Appl. Publ. No. 92110298.4; U. S. Patent 5,334,711; and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/13688, which describe various chemical modifications that can be made to the sugar moieties of enzymatic RNA molecules), modifications which enhance their efficacy in cells, and removal of stem II bases to shorten RNA synthesis
5 times and reduce chemical requirements.

Sullivan *et al.* (Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595) describes the general methods for delivery of enzymatic RNA molecules. Ribozymes may be administered to cells by a variety of methods known to those familiar to the art, including, but not restricted to, encapsulation in liposomes, by iontophoresis, or by
10 incorporation into other vehicles, such as hydrogels, cyclodextrins, biodegradable nanocapsules, and bioadhesive microspheres. For some indications, ribozymes may be directly delivered *ex vivo* to cells or tissues with or without the aforementioned vehicles. Alternatively, the RNA/vehicle combination may be locally delivered by direct inhalation, by direct injection or by use of a catheter, infusion pump or stent.
15 Other routes of delivery include, but are not limited to, intravascular, intramuscular, subcutaneous or joint injection, aerosol inhalation, oral (tablet or pill form), topical, systemic, ocular, intraperitoneal and/or intrathecal delivery. More detailed descriptions of ribozyme delivery and administration are provided in Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595 and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/23569, each specifically incorporated
20 herein by reference.

Another means of accumulating high concentrations of a ribozyme(s) within cells is to incorporate the ribozyme-encoding sequences into a DNA expression vector. Transcription of the ribozyme sequences are driven from a promoter for eukaryotic RNA polymerase I (pol I), RNA polymerase II (pol II), or RNA polymerase
25 III (pol III). Transcripts from pol II or pol III promoters will be expressed at high levels in all cells; the levels of a given pol II promoter in a given cell type will depend on the nature of the gene regulatory sequences (enhancers, silencers, *etc.*) present nearby. Prokaryotic RNA polymerase promoters may also be used, providing that the prokaryotic RNA polymerase enzyme is expressed in the appropriate cells. Ribozymes
30 expressed from such promoters have been shown to function in mammalian cells. Such transcription units can be incorporated into a variety of vectors for introduction into

mammalian cells, including but not restricted to, plasmid DNA vectors, viral DNA vectors (such as adenovirus or adeno-associated vectors), or viral RNA vectors (such as retroviral, semliki forest virus, sindbis virus vectors).

In another embodiment of the invention, peptide nucleic acids (PNAs) compositions are provided. PNA is a DNA mimic in which the nucleobases are attached to a pseudopeptide backbone (Good and Nielsen, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997 7(4) 431-37). PNA is able to be utilized in a number of methods that traditionally have used RNA or DNA. Often PNA sequences perform better in techniques than the corresponding RNA or DNA sequences and have utilities that are not inherent to RNA or DNA. A review of PNA including methods of making, characteristics of, and methods of using, is provided by Corey (*Trends Biotechnol* 1997 Jun;15(6):224-9). As such, in certain embodiments, one may prepare PNA sequences that are complementary to one or more portions of the ACE mRNA sequence, and such PNA compositions may be used to regulate, alter, decrease, or reduce the translation of ACE-specific mRNA, and thereby alter the level of ACE activity in a host cell to which such PNA compositions have been administered.

PNAs have 2-aminoethyl-glycine linkages replacing the normal phosphodiester backbone of DNA (Nielsen *et al.*, *Science* 1991 Dec 6;254(5037):1497-500; Hanvey *et al.*, *Science*. 1992 Nov 27;258(5087):1481-5; Hynup and Nielsen, *Bioorg Med Chem.* 1996 Jan;4(1):5-23). This chemistry has three important consequences: firstly, in contrast to DNA or phosphorothioate oligonucleotides, PNAs are neutral molecules; secondly, PNAs are achiral, which avoids the need to develop a stereoselective synthesis; and thirdly, PNA synthesis uses standard Boc or Fmoc protocols for solid-phase peptide synthesis, although other methods, including a modified Merrifield method, have been used.

PNA monomers or ready-made oligomers are commercially available from PerSeptive Biosystems (Framingham, MA). PNA syntheses by either Boc or Fmoc protocols are straightforward using manual or automated protocols (Norton *et al.*, *Bioorg Med Chem.* 1995 Apr;3(4):437-45). The manual protocol lends itself to the production of chemically modified PNAs or the simultaneous synthesis of families of closely related PNAs.

As with peptide synthesis, the success of a particular PNA synthesis will depend on the properties of the chosen sequence. For example, while in theory PNAs can incorporate any combination of nucleotide bases, the presence of adjacent purines can lead to deletions of one or more residues in the product. In expectation of this difficulty, it is suggested that, in producing PNAs with adjacent purines, one should repeat the coupling of residues likely to be added inefficiently. This should be followed by the purification of PNAs by reverse-phase high-pressure liquid chromatography, providing yields and purity of product similar to those observed during the synthesis of peptides.

Modifications of PNAs for a given application may be accomplished by coupling amino acids during solid-phase synthesis or by attaching compounds that contain a carboxylic acid group to the exposed N-terminal amine. Alternatively, PNAs can be modified after synthesis by coupling to an introduced lysine or cysteine. The ease with which PNAs can be modified facilitates optimization for better solubility or for specific functional requirements. Once synthesized, the identity of PNAs and their derivatives can be confirmed by mass spectrometry. Several studies have made and utilized modifications of PNAs (for example, Norton *et al.*, *Bioorg Med Chem.* 1995 Apr;3(4):437-45; Petersen *et al.*, *J Pept Sci.* 1995 May-Jun;1(3):175-83; Orum *et al.*, *Biotechniques.* 1995 Sep;19(3):472-80; Footer *et al.*, *Biochemistry.* 1996 Aug 20;35(33):10673-9; Griffith *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1995 Aug 11;23(15):3003-8; Pardridge *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5592-6; Boffa *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 14;92(6):1901-5; Gambacorti-Passerini *et al.*, *Blood.* 1996 Aug 15;88(4):1411-7; Armitage *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 11;94(23):12320-5; Seeger *et al.*, *Biotechniques.* 1997 Sep;23(3):512-7). U.S. Patent No. 5,700,922 discusses PNA-DNA-PNA chimeric molecules and their uses in diagnostics, modulating protein in organisms, and treatment of conditions susceptible to therapeutics.

Methods of characterizing the antisense binding properties of PNAs are discussed in Rose (*Anal Chem.* 1993 Dec 15;65(24):3545-9) and Jensen *et al.* (*Biochemistry.* 1997 Apr 22;36(16):5072-7). Rose uses capillary gel electrophoresis to determine binding of PNAs to their complementary oligonucleotide, measuring the relative binding kinetics and stoichiometry. Similar types of measurements were made by Jensen *et al.* using BIAcore™ technology.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

39

Other applications of PNAs that have been described and will be apparent to the skilled artisan include use in DNA strand invasion, antisense inhibition, mutational analysis, enhancers of transcription, nucleic acid purification, isolation of transcriptionally active genes, blocking of transcription factor binding, genome cleavage, biosensors, *in situ* hybridization, and the like.

POLYNUCLEOTIDE IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND EXPRESSION

Polynucleotides compositions of the present invention may be identified, prepared and/or manipulated using any of a variety of well established techniques (see generally, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989, and other like references). For example, a polynucleotide may be identified, as described in more detail below, by screening a microarray of cDNAs for tumor-associated expression (*i.e.*, expression that is at least two fold greater in a tumor than in normal tissue, as determined using a representative assay provided herein). Such screens may be performed, for example, using the microarray technology of Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA) according to the manufacturer's instructions (and essentially as described by Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10614-10619, 1996 and Heller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2150-2155, 1997). Alternatively, polynucleotides may be amplified from cDNA prepared from cells expressing the proteins described herein, such as tumor cells.

Many template dependent processes are available to amplify a target sequences of interest present in a sample. One of the best known amplification methods is the polymerase chain reaction (PCRTM) which is described in detail in U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202 and 4,800,159, each of which is incorporated herein by reference in its entirety. Briefly, in PCRTM, two primer sequences are prepared which are complementary to regions on opposite complementary strands of the target sequence. An excess of deoxynucleoside triphosphates is added to a reaction mixture along with a DNA polymerase (*e.g.*, *Taq* polymerase). If the target sequence is present in a sample, the primers will bind to the target and the polymerase will cause the primers to be extended along the target sequence by adding on nucleotides. By raising and lowering the temperature of the reaction mixture, the extended primers will

dissociate from the target to form reaction products, excess primers will bind to the target and to the reaction product and the process is repeated. Preferably reverse transcription and PCR™ amplification procedure may be performed in order to quantify the amount of mRNA amplified. Polymerase chain reaction methodologies are well known in the art.

Any of a number of other template dependent processes, many of which are variations of the PCR™ amplification technique, are readily known and available in the art. Illustratively, some such methods include the ligase chain reaction (referred to as LCR), described, for example, in Eur. Pat. Appl. Publ. No. 320,308 and U.S. Patent No. 4,883,750; Qbeta Replicase, described in PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. PCT/US87/00880; Strand Displacement Amplification (SDA) and Repair Chain Reaction (RCR). Still other amplification methods are described in Great Britain Pat. Appl. No. 2 202 328, and in PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. PCT/US89/01025. Other nucleic acid amplification procedures include transcription-based amplification systems (TAS) (PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. WO 88/10315), including nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and 3SR. Eur. Pat. Appl. Publ. No. 329,822 describes a nucleic acid amplification process involving cyclically synthesizing single-stranded RNA ("ssRNA"), ssDNA, and double-stranded DNA (dsDNA). PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. WO 89/06700 describes a nucleic acid sequence amplification scheme based on the hybridization of a promoter/primer sequence to a target single-stranded DNA ("ssDNA") followed by transcription of many RNA copies of the sequence. Other amplification methods such as "RACE" (Frohman, 1996), and "one-sided PCR" (Ohara, 1989) are also well-known to those of skill in the art.

An amplified portion of a polynucleotide of the present invention may be used to isolate a full length gene from a suitable library (e.g., a tumor cDNA library) using well known techniques. Within such techniques, a library (cDNA or genomic) is screened using one or more polynucleotide probes or primers suitable for amplification. Preferably, a library is size-selected to include larger molecules. Random primed libraries may also be preferred for identifying 5' and upstream regions of genes. Genomic libraries are preferred for obtaining introns and extending 5' sequences.

For hybridization techniques, a partial sequence may be labeled (e.g., by nick-translation or end-labelling with ^{32}P) using well-known techniques. A bacterial or bacteriophage library is then generally screened by hybridizing filters containing denatured bacterial colonies (or lawns containing phage plaques) with the labeled probe
5 (see Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Hybridizing colonies or plaques are selected and expanded, and the DNA is isolated for further analysis. cDNA clones may be analyzed to determine the amount of additional sequence by, for example, PCR using a primer from the partial sequence and a primer from the vector. Restriction
10 maps and partial sequences may be generated to identify one or more overlapping clones. The complete sequence may then be determined using standard techniques, which may involve generating a series of deletion clones. The resulting overlapping sequences can then be assembled into a single contiguous sequence. A full length cDNA molecule can be generated by ligating suitable fragments, using well known techniques.

15 Alternatively, amplification techniques, such as those described above, can be useful for obtaining a full length coding sequence from a partial cDNA sequence. One such amplification technique is inverse PCR (see Triglia et al., *Nucl. Acids Res.* 16:8186, 1988), which uses restriction enzymes to generate a fragment in the known region of the gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation
20 and used as a template for PCR with divergent primers derived from the known region. Within an alternative approach, sequences adjacent to a partial sequence may be retrieved by amplification with a primer to a linker sequence and a primer specific to a known region. The amplified sequences are typically subjected to a second round of amplification with the same linker primer and a second primer specific to the known
25 region. A variation on this procedure, which employs two primers that initiate extension in opposite directions from the known sequence, is described in WO 96/38591. Another such technique is known as "rapid amplification of cDNA ends" or RACE. This technique involves the use of an internal primer and an external primer, which hybridizes to a polyA region or vector sequence, to identify sequences that are 5'
30 and 3' of a known sequence. Additional techniques include capture PCR (Lagerstrom et al., *PCR Methods Applic.* 1:111-19, 1991) and walking PCR (Parker et al., *Nucl. Acids*.

Res. 19:3055-60, 1991). Other methods employing amplification may also be employed to obtain a full length cDNA sequence.

In certain instances, it is possible to obtain a full length cDNA sequence by analysis of sequences provided in an expressed sequence tag (EST) database, such as that available from GenBank. Searches for overlapping ESTs may generally be performed using well known programs (e.g., NCBI BLAST searches), and such ESTs may be used to generate a contiguous full length sequence. Full length DNA sequences may also be obtained by analysis of genomic fragments.

In other embodiments of the invention, polynucleotide sequences or fragments thereof which encode polypeptides of the invention, or fusion proteins or functional equivalents thereof, may be used in recombinant DNA molecules to direct expression of a polypeptide in appropriate host cells. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences that encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence may be produced and these sequences may be used to clone and express a given polypeptide.

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous in some instances to produce polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce a recombinant RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

Moreover, the polynucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter polypeptide encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the gene product. For example, DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequences. In addition, site-directed mutagenesis may be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, or introduce mutations, and so forth.

In another embodiment of the invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, to screen peptide libraries for inhibitors of polypeptide activity, it may be useful to encode a chimeric protein that can be recognized by a commercially available antibody. A fusion protein may also be engineered to contain a cleavage site located between the polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the polypeptide may be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

Sequences encoding a desired polypeptide may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers, M. H. et al. (1980) *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, Horn, T. et al. (1980) *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232). Alternatively, the protein itself may be produced using chemical methods to synthesize the amino acid sequence of a polypeptide, or a portion thereof. For example, peptide synthesis can be performed using various solid-phase techniques (Roberge, J. Y. et al. (1995) *Science* 269:202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

A newly synthesized peptide may be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton, T. (1983) *Proteins, Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y.) or other comparable techniques available in the art. The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure). Additionally, the amino acid sequence of a polypeptide, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide.

In order to express a desired polypeptide, the nucleotide sequences encoding the polypeptide, or functional equivalents, may be inserted into appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing

sequences encoding a polypeptide of interest and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described, for example, in Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., and Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express polynucleotide sequences. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with virus expression vectors (*e.g.*, baculovirus); plant cell systems transformed with virus expression vectors (*e.g.*, cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (*e.g.*, Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems.

The "control elements" or "regulatory sequences" present in an expression vector are those non-translated regions of the vector--enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions--which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements may vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, may be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the pBLUESCRIPT phagemid (Stratagene, La Jolla, Calif.) or pSPORT1 plasmid (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) and the like may be used. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are generally preferred. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of the sequence encoding a polypeptide, vectors based on SV40 or EBV may be advantageously used with an appropriate selectable marker.

In bacterial systems, any of a number of expression vectors may be selected depending upon the use intended for the expressed polypeptide. For example, when large quantities are needed, for example for the induction of antibodies, vectors

which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified may be used. Such vectors include, but are not limited to, the multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as pBLUESCRIPT (Stratagene), in which the sequence encoding the polypeptide of interest may be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of .beta.-galactosidase so that a hybrid protein is produced; pIN vectors (Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509); and the like. pGEX Vectors (Promega, Madison, Wis.) may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems may be designed to include heparin, thrombin, or factor XA protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

15 In the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH may be used. For reviews, see Ausubel et al. (supra) and Grant et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544.

In cases where plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding polypeptides may be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV may be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311. Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters may be used (Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843; and Winter, J. et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105). These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (see, for example, Hobbs, S. or Murry, I. E. in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196).

An insect system may also be used to express a polypeptide of interest. For example, in one such system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. The sequences encoding the polypeptide may be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of the polypeptide-encoding sequence will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses may then be used to infect, for example, *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which the polypeptide of interest may be expressed (Engelhard, E. K. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 :3224-3227).

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems are generally available. For example, in cases where an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding a polypeptide of interest may be ligated into an adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome may be used to obtain a viable virus which is capable of expressing the polypeptide in infected host cells (Logan, J. and Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659). In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, may be used to increase expression in mammalian host cells.

Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of sequences encoding a polypeptide of interest. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding the polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a portion thereof, is inserted, exogenous translational control signals including the ATG initiation codon should be provided. Furthermore, the initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers which are

appropriate for the particular cell system which is used, such as those described in the literature (Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162).

In addition, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the protein may also be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells such as CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38, which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for such post-translational activities, may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is generally preferred. For example, cell lines which stably express a polynucleotide of interest may be transformed using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11:223-32) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, I. et al. (1990) *Cell* 22:817-23) genes which can be employed in tk.sup.- or apt.sup.- cells, respectively. Also, antimetabolite, antibiotic or herbicide resistance can be used as the basis for selection; for example, dhfr which confers resistance to methotrexate (Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70); npt, which confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin, F. et al (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14); and als or pat, which confer resistance to chlorisulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murry, *supra*).

Additional selectable genes have been described, for example, *trpB*, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman, S. C. and R. C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51). The use of visible markers has gained popularity with such markers as anthocyanins, beta-glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, being widely used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes, C. A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if the sequence encoding a polypeptide is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing sequences can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a polypeptide-encoding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the tandem gene as well.

Alternatively, host cells that contain and express a desired polynucleotide sequence may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques which include, for example, membrane, solution, or chip based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of polynucleotide-encoded products, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the product are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on a given polypeptide may be preferred for some applications, but a competitive binding assay may also be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton, R. et al. (1990;

Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn.) and Maddox, D. E. et al. (1983; *J. Exp. Med.* 158:1211-1216).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and may be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means
5 for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides include oligolabeling, nick translation, end-labeling or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences, or any portions thereof may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA
10 probes in vitro by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6 and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits. Suitable reporter molecules or labels, which may be used include radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

15 Host cells transformed with a polynucleotide sequence of interest may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides of the
20 invention may be designed to contain signal sequences which direct secretion of the encoded polypeptide through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may be used to join sequences encoding a polypeptide of interest to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are
25 not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, Wash.). The inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego,
30 Calif.) between the purification domain and the encoded polypeptide may be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion

protein containing a polypeptide of interest and a nucleic acid encoding 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification on IMIAC (immobilized metal ion affinity chromatography) as described in Porath, J. et al. (1992, *Prot. Exp. Purif.* 3:263-281) while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the desired polypeptide from the fusion protein. A discussion of vectors which contain fusion proteins is provided in Kyoll, D. J. et al. (1993; *DNA Cell Biol.* 12:441-453).

In addition to recombinant production methods, polypeptides of the invention, and fragments thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield J. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Alternatively, various fragments may be chemically synthesized separately and combined using chemical methods to produce the full length molecule.

ANTIBODY COMPOSITIONS, FRAGMENTS THEREOF AND OTHER BINDING AGENTS

According to another aspect, the present invention further provides binding agents, such as antibodies and antigen-binding fragments thereof, that exhibit immunological binding to a tumor polypeptide disclosed herein, or to a portion, variant or derivative thereof. An antibody, or antigen-binding fragment thereof, is said to "specifically bind," "immunologically bind," and/or is "immunologically reactive" to a polypeptide of the invention if it reacts at a detectable level (within, for example, an ELISA assay) with the polypeptide, and does not react detectably with unrelated polypeptides under similar conditions.

Immunological binding, as used in this context, generally refers to the non-covalent interactions of the type which occur between an immunoglobulin molecule and an antigen for which the immunoglobulin is specific. The strength, or affinity of immunological binding interactions can be expressed in terms of the dissociation constant (K_d) of the interaction, wherein a smaller K_d represents a greater affinity. Immunological binding properties of selected polypeptides can be quantified

using methods well known in the art. One such method entails measuring the rates of antigen-binding site/antigen complex formation and dissociation, wherein those rates depend on the concentrations of the complex partners, the affinity of the interaction, and on geometric parameters that equally influence the rate in both directions. Thus, both the "on rate constant" (K_{on}) and the "off rate constant" (K_{off}) can be determined by calculation of the concentrations and the actual rates of association and dissociation. The ratio of K_{on}/K_{off} enables cancellation of all parameters not related to affinity, and is thus equal to the dissociation constant K_d . See, generally, Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473.

10 An "antigen-binding site," or "binding portion" of an antibody refers to the part of the immunoglobulin molecule that participates in antigen binding. The antigen binding site is formed by amino acid residues of the N-terminal variable ("V") regions of the heavy ("H") and light ("L") chains. Three highly divergent stretches within the V regions of the heavy and light chains are referred to as "hypervariable regions" which are interposed between more conserved flanking stretches known as "framework regions," or "FRs". Thus the term "FR" refers to amino acid sequences which are naturally found between and adjacent to hypervariable regions in immunoglobulins. In an antibody molecule, the three hypervariable regions of a light chain and the three hypervariable regions of a heavy chain are disposed relative to each other in three dimensional space to form an antigen-binding surface. The antigen-binding surface is complementary to the three-dimensional surface of a bound antigen, and the three hypervariable regions of each of the heavy and light chains are referred to as "complementarity-determining regions," or "CDRs."

25 Binding agents may be further capable of differentiating between patients with and without a cancer, such as colon cancer, using the representative assays provided herein. For example, antibodies or other binding agents that bind to a tumor protein will preferably generate a signal indicating the presence of a cancer in at least about 20% of patients with the disease, more preferably at least about 30% of patients. Alternatively, or in addition, the antibody will generate a negative signal indicating the absence of the disease in at least about 90% of individuals without the cancer. To determine whether a binding agent satisfies this requirement, biological samples (e.g.,

blood, sera, sputum, urine and/or tumor biopsies) from patients with and without a cancer (as determined using standard clinical tests) may be assayed as described herein for the presence of polypeptides that bind to the binding agent. Preferably, a statistically significant number of samples with and without the disease will be assayed.

5 Each binding agent should satisfy the above criteria; however, those of ordinary skill in the art will recognize that binding agents may be used in combination to improve sensitivity.

Any agent that satisfies the above requirements may be a binding agent. For example, a binding agent may be a ribosome, with or without a peptide component, an RNA molecule or a polypeptide. In a preferred embodiment, a binding agent is an antibody or an antigen-binding fragment thereof. Antibodies may be prepared by any of a variety of techniques known to those of ordinary skill in the art. See, e.g., Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. In general, antibodies can be produced by cell culture techniques, including the generation of monoclonal antibodies as described herein, or via transfection of antibody genes into suitable bacterial or mammalian cell hosts, in order to allow for the production of recombinant antibodies. In one technique, an immunogen comprising the polypeptide is initially injected into any of a wide variety of mammals (e.g., mice, rats, rabbits, sheep or goats). In this step, the polypeptides of this invention may serve as the immunogen without modification. Alternatively, particularly for relatively short polypeptides, a superior immune response may be elicited if the polypeptide is joined to a carrier protein, such as bovine serum albumin or keyhole limpet hemocyanin. The immunogen is injected into the animal host, preferably according to a predetermined schedule incorporating one or more booster immunizations, and the animals are bled periodically. Polyclonal antibodies specific for the polypeptide may then be purified from such antisera by, for example, affinity chromatography using the polypeptide coupled to a suitable solid support.

10
15
20
25

Monoclonal antibodies specific for an antigenic polypeptide of interest may be prepared, for example, using the technique of Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, and improvements thereto. Briefly, these methods involve the preparation of immortal cell lines capable of producing antibodies having the

30

desired specificity (*i.e.*, reactivity with the polypeptide of interest). Such cell lines may be produced, for example, from spleen cells obtained from an animal immunized as described above. The spleen cells are then immortalized by, for example, fusion with a myeloma cell fusion partner, preferably one that is syngeneic with the immunized animal. A variety of fusion techniques may be employed. For example, the spleen cells and myeloma cells may be combined with a nonionic detergent for a few minutes and then plated at low density on a selective medium that supports the growth of hybrid cells, but not myeloma cells. A preferred selection technique uses HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) selection. After a sufficient time, usually about 1 to 2 weeks, colonies of hybrids are observed. Single colonies are selected and their culture supernatants tested for binding activity against the polypeptide. Hybridomas having high reactivity and specificity are preferred.

Monoclonal antibodies may be isolated from the supernatants of growing hybridoma colonies. In addition, various techniques may be employed to enhance the yield, such as injection of the hybridoma cell line into the peritoneal cavity of a suitable vertebrate host, such as a mouse. Monoclonal antibodies may then be harvested from the ascites fluid or the blood. Contaminants may be removed from the antibodies by conventional techniques, such as chromatography, gel filtration, precipitation, and extraction. The polypeptides of this invention may be used in the purification process in, for example, an affinity chromatography step.

A number of therapeutically useful molecules are known in the art which comprise antigen-binding sites that are capable of exhibiting immunological binding properties of an antibody molecule. The proteolytic enzyme papain preferentially cleaves IgG molecules to yield several fragments, two of which (the "F(ab)" fragments) each comprise a covalent heterodimer that includes an intact antigen-binding site. The enzyme pepsin is able to cleave IgG molecules to provide several fragments, including the "F(ab)₂" fragment which comprises both antigen-binding sites. An "Fv" fragment can be produced by preferential proteolytic cleavage of an IgM, and on rare occasions IgG or IgA immunoglobulin molecule. Fv fragments are, however, more commonly derived using recombinant techniques known in the art. The Fv fragment includes a non-covalent V_H::V_L heterodimer including an antigen-binding site which retains much

of the antigen recognition and binding capabilities of the native antibody molecule. Inbar et al. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman et al. (1976) Biochem 15:2706-2710; and Ehrlich et al. (1980) Biochem 19:4091-4096.

A single chain Fv ("sFv") polypeptide is a covalently linked V_H:V_L heterodimer which is expressed from a gene fusion including V_H- and V_L-encoding genes linked by a peptide-encoding linker. Huston et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883. A number of methods have been described to discern chemical structures for converting the naturally aggregated-but chemically separated-light and heavy polypeptide chains from an antibody V region into an sFv molecule which will fold into a three dimensional structure substantially similar to the structure of an antigen-binding site. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,091,513 and 5,132,405, to Huston et al.; and U.S. Pat. No. 4,946,778, to Ladner et al.

Each of the above-described molecules includes a heavy chain and a light chain CDR set, respectively interposed between a heavy chain and a light chain FR set which provide support to the CDRs and define the spatial relationship of the CDRs relative to each other. As used herein, the term "CDR set" refers to the three hypervariable regions of a heavy or light chain V region. Proceeding from the N-terminus of a heavy or light chain, these regions are denoted as "CDR1," "CDR2," and "CDR3" respectively. An antigen-binding site, therefore, includes six CDRs, comprising the CDR set from each of a heavy and a light chain V region. A polypeptide comprising a single CDR, (e.g., a CDR1, CDR2 or CDR3) is referred to herein as a "molecular recognition unit." Crystallographic analysis of a number of antigen-antibody complexes has demonstrated that the amino acid residues of CDRs form extensive contact with bound antigen, wherein the most extensive antigen contact is with the heavy chain CDR3. Thus, the molecular recognition units are primarily responsible for the specificity of an antigen-binding site.

As used herein, the term "FR set" refers to the four flanking amino acid sequences which frame the CDRs of a CDR set of a heavy or light chain V region. Some FR residues may contact bound antigen; however, FRs are primarily responsible for folding the V region into the antigen-binding site, particularly the FR residues directly adjacent to the CDRs. Within FRs, certain amino residues and certain structural

features are very highly conserved. In this regard, all V region sequences contain an internal disulfide loop of around 90 amino acid residues. When the V regions fold into a binding-site, the CDRs are displayed as projecting loop motifs which form an antigen-binding surface. It is generally recognized that there are conserved structural regions of FRs which influence the folded shape of the CDR loops into certain "canonical" structures--regardless of the precise CDR amino acid sequence. Further, certain FR residues are known to participate in non-covalent interdomain contacts which stabilize the interaction of the antibody heavy and light chains.

A number of "humanized" antibody molecules comprising an antigen-binding site derived from a non-human immunoglobulin have been described, including chimeric antibodies having rodent V regions and their associated CDRs fused to human constant domains (Winter et al. (1991) *Nature* 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224; Shaw et al. (1987) *J Immunol.* 138:4534-4538; and Brown et al. (1987) *Cancer Res.* 47:3577-3583), rodent CDRs grafted into a human supporting FR prior to fusion with an appropriate human antibody constant domain (Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536; and Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525), and rodent CDRs supported by recombinantly veneered rodent FRs (European Patent Publication No. 519,596, published Dec. 23, 1992). These "humanized" molecules are designed to minimize unwanted immunological response toward rodent antihuman antibody molecules which limits the duration and effectiveness of therapeutic applications of those moieties in human recipients.

As used herein, the terms "veneered FRs" and "recombinantly veneered FRs" refer to the selective replacement of FR residues from, e.g., a rodent heavy or light chain V region, with human FR residues in order to provide a xenogeneic molecule comprising an antigen-binding site which retains substantially all of the native FR polypeptide folding structure. Veneering techniques are based on the understanding that the ligand binding characteristics of an antigen-binding site are determined primarily by the structure and relative disposition of the heavy and light chain CDR sets within the antigen-binding surface. Davies et al. (1990) *Ann. Rev. Biochem.* 59:439-473. Thus, antigen binding specificity can be preserved in a humanized antibody only wherein the

CDR structures, their interaction with each other, and their interaction with the rest of the V region domains are carefully maintained. By using veneering techniques, exterior (e.g., solvent-accessible) FR residues which are readily encountered by the immune system are selectively replaced with human residues to provide a hybrid molecule that
5 comprises either a weakly immunogenic, or substantially non-immunogenic veneered surface.

The process of veneering makes use of the available sequence data for human antibody variable domains compiled by Kabat et al., in *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th ed., (U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1987), updates to the Kabat database, and other accessible
10 U.S. and foreign databases (both nucleic acid and protein). Solvent accessibilities of V region amino acids can be deduced from the known three-dimensional structure for human and murine antibody fragments. There are two general steps in veneering a murine antigen-binding site. Initially, the FRs of the variable domains of an antibody
15 molecule of interest are compared with corresponding FR sequences of human variable domains obtained from the above-identified sources. The most homologous human V regions are then compared residue by residue to corresponding murine amino acids. The residues in the murine FR which differ from the human counterpart are replaced by the residues present in the human moiety using recombinant techniques well known in the
20 art. Residue switching is only carried out with moieties which are at least partially exposed (solvent accessible), and care is exercised in the replacement of amino acid residues which may have a significant effect on the tertiary structure of V region domains, such as proline, glycine and charged amino acids.

In this manner, the resultant "veneered" murine antigen-binding sites are
25 thus designed to retain the murine CDR residues, the residues substantially adjacent to the CDRs, the residues identified as buried or mostly buried (solvent inaccessible), the residues believed to participate in non-covalent (e.g., electrostatic and hydrophobic) contacts between heavy and light chain domains, and the residues from conserved structural regions of the FRs which are believed to influence the "canonical" tertiary
30 structures of the CDR loops. These design criteria are then used to prepare recombinant nucleotide sequences which combine the CDRs of both the heavy and light chain of a

murine antigen-binding site into human-appearing FRs that can be used to transfect mammalian cells for the expression of recombinant human antibodies which exhibit the antigen specificity of the murine antibody molecule.

In another embodiment of the invention, monoclonal antibodies of the present invention may be coupled to one or more therapeutic agents. Suitable agents in this regard include radionuclides, differentiation inducers, drugs, toxins, and derivatives thereof. Preferred radionuclides include ^{90}Y , ^{125}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{188}Re , ^{188}Re , ^{211}At , and ^{212}Bi . Preferred drugs include methotrexate, and pyrimidine and purine analogs. Preferred differentiation inducers include phorbol esters and butyric acid. Preferred toxins include ricin, abrin, diphtheria toxin, cholera toxin, gelonin, *Pseudomonas* exotoxin, *Shigella* toxin, and pokeweed antiviral protein.

A therapeutic agent may be coupled (*e.g.*, covalently bonded) to a suitable monoclonal antibody either directly or indirectly (*e.g.*, via a linker group). A direct reaction between an agent and an antibody is possible when each possesses a substituent capable of reacting with the other. For example, a nucleophilic group, such as an amino or sulfhydryl group, on one may be capable of reacting with a carbonyl-containing group, such as an anhydride or an acid halide, or with an alkyl group containing a good leaving group (*e.g.*, a halide) on the other.

Alternatively, it may be desirable to couple a therapeutic agent and an antibody via a linker group. A linker group can function as a spacer to distance an antibody from an agent in order to avoid interference with binding capabilities. A linker group can also serve to increase the chemical reactivity of a substituent on an agent or an antibody, and thus increase the coupling efficiency. An increase in chemical reactivity may also facilitate the use of agents, or functional groups on agents, which otherwise would not be possible.

It will be evident to those skilled in the art that a variety of bifunctional or polyfunctional reagents, both homo- and hetero-functional (such as those described in the catalog of the Pierce Chemical Co., Rockford, IL), may be employed as the linker group. Coupling may be effected, for example, through amino groups, carboxyl groups, sulfhydryl groups or oxidized carbohydrate residues. There are numerous references describing such methodology, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,671,958, to Rodwell et al.

Where a therapeutic agent is more potent when free from the antibody portion of the immunoconjugates of the present invention, it may be desirable to use a linker group which is cleavable during or upon internalization into a cell. A number of different cleavable linker groups have been described. The mechanisms for the intracellular release of an agent from these linker groups include cleavage by reduction of a disulfide bond (e.g., U.S. Patent No. 4,489,710, to Spittler), by irradiation of a photolabile bond (e.g., U.S. Patent No. 4,625,014, to Senter et al.), by hydrolysis of derivatized amino acid side chains (e.g., U.S. Patent No. 4,638,045, to Kohn et al.), by serum complement-mediated hydrolysis (e.g., U.S. Patent No. 4,671,958, to Rodwell et al.), and acid-catalyzed hydrolysis (e.g., U.S. Patent No. 4,569,789, to Blattler et al.).

It may be desirable to couple more than one agent to an antibody. In one embodiment, multiple molecules of an agent are coupled to one antibody molecule. In another embodiment, more than one type of agent may be coupled to one antibody. Regardless of the particular embodiment, immunoconjugates with more than one agent may be prepared in a variety of ways. For example, more than one agent may be coupled directly to an antibody molecule, or linkers that provide multiple sites for attachment can be used. Alternatively, a carrier can be used.

A carrier may bear the agents in a variety of ways, including covalent bonding either directly or via a linker group. Suitable carriers include proteins such as albumins (e.g., U.S. Patent No. 4,507,234, to Kato et al.), peptides and polysaccharides such as aminodextran (e.g., U.S. Patent No. 4,699,784, to Shih et al.). A carrier may also bear an agent by noncovalent bonding or by encapsulation, such as within a liposome vesicle (e.g., U.S. Patent Nos. 4,429,008 and 4,873,088). Carriers specific for radionuclide agents include radiohalogenated small molecules and chelating compounds. For example, U.S. Patent No. 4,735,792 discloses representative radiohalogenated small molecules and their synthesis. A radionuclide chelate may be formed from chelating compounds that include those containing nitrogen and sulfur atoms as the donor atoms for binding the metal, or metal oxide, radionuclide. For example, U.S. Patent No. 4,673,562, to Davison et al. discloses representative chelating compounds and their synthesis.

T CELL COMPOSITIONS

The present invention, in another aspect, provides T cells specific for a tumor polypeptide disclosed herein, or for a variant or derivative thereof. Such cells may generally be prepared *in vitro* or *ex vivo*, using standard procedures. For example, 5 T cells may be isolated from bone marrow, peripheral blood, or a fraction of bone marrow or peripheral blood of a patient, using a commercially available cell separation system, such as the Isolex™ System, available from Nexell Therapeutics, Inc. (Irvine, CA; see also U.S. Patent No. 5,240,856; U.S. Patent No. 5,215,926; WO 89/06280; WO 91/16116 and WO 92/07243). Alternatively, T cells may be derived from related or 10 unrelated humans, non-human mammals, cell lines or cultures.

T cells may be stimulated with a polypeptide, polynucleotide encoding a polypeptide and/or an antigen presenting cell (APC) that expresses such a polypeptide. Such stimulation is performed under conditions and for a time sufficient to permit the generation of T cells that are specific for the polypeptide of interest. Preferably, a 15 tumor polypeptide or polynucleotide of the invention is present within a delivery vehicle, such as a microsphere, to facilitate the generation of specific T cells.

T cells are considered to be specific for a polypeptide of the present invention if the T cells specifically proliferate, secrete cytokines or kill target cells coated with the polypeptide or expressing a gene encoding the polypeptide. T cell 20 specificity may be evaluated using any of a variety of standard techniques. For example, within a chromium release assay or proliferation assay, a stimulation index of more than two fold increase in lysis and/or proliferation, compared to negative controls, indicates T cell specificity. Such assays may be performed, for example, as described in Chen et al., *Cancer Res.* 54:1065-1070, 1994. Alternatively, detection of the 25 proliferation of T cells may be accomplished by a variety of known techniques. For example, T cell proliferation can be detected by measuring an increased rate of DNA synthesis (*e.g.*, by pulse-labeling cultures of T cells with tritiated thymidine and measuring the amount of tritiated thymidine incorporated into DNA). Contact with a tumor polypeptide (100 ng/ml - 100 µg/ml, preferably 200 ng/ml - 25 µg/ml) for 3 - 7 30 days will typically result in at least a two fold increase in proliferation of the T cells. Contact as described above for 2-3 hours should result in activation of the T cells, as

measured using standard cytokine assays in which a two fold increase in the level of cytokine release (e.g. TNF or IFN- γ) is indicative of T cell activation (see Coligan et al., Current Protocols in Immunology, vol. 1, Wiley Interscience (Greene 1998)). T cells that have been activated in response to a tumor polypeptide, polynucleotide or polypeptide-expressing APC may be CD4⁺ and/or CD8⁺. Tumor polypeptide-specific T cells may be expanded using standard techniques. Within preferred embodiments, the T cells are derived from a patient, a related donor or an unrelated donor, and are administered to the patient following stimulation and expansion.

For therapeutic purposes, CD4⁺ or CD8⁺ T cells that proliferate in response to a tumor polypeptide, polynucleotide or APC can be expanded in number either *in vitro* or *in vivo*. Proliferation of such T cells *in vitro* may be accomplished in a variety of ways. For example, the T cells can be re-exposed to a tumor polypeptide, or a short peptide corresponding to an immunogenic portion of such a polypeptide, with or without the addition of T cell growth factors, such as interleukin-2, and/or stimulator cells that synthesize a tumor polypeptide. Alternatively, one or more T cells that proliferate in the presence of the tumor polypeptide can be expanded in number by cloning. Methods for cloning cells are well known in the art, and include limiting dilution.

T CELL RECEPTOR COMPOSITIONS

The T cell receptor (TCR) consists of 2 different, highly variable polypeptide chains, termed the T-cell receptor α and β chains, that are linked by a disulfide bond (Janeway, Travers, Walport. *Immunobiology*. Fourth Ed., 148-159. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, 1999). The α/β heterodimer complexes with the invariant CD3 chains at the cell membrane. This complex recognizes specific antigenic peptides bound to MHC molecules. The enormous diversity of TCR specificities is generated much like immunoglobulin diversity, through somatic gene rearrangement. The β chain genes contain over 50 variable (V), 2 diversity (D), over 10 joining (J) segments, and 2 constant region segments (C). The α chain genes contain over 70 V segments, and over 60 J segments but no D segments, as well as one C segment. During T cell development in the thymus, the D to J gene rearrangement of

the β chain occurs, followed by the V gene segment rearrangement to the DJ. This functional VDJ β exon is transcribed and spliced to join to a C β . For the α chain, a V α gene segment rearranges to a J α gene segment to create the functional exon that is then transcribed and spliced to the C α . Diversity is further increased during the
5 recombination process by the random addition of P and N-nucleotides between the V, D, and J segments of the β chain and between the V and J segments in the α chain (Janeway, Travers, Walport. *Immunobiology*. Fourth Ed., 98 and 150. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, 1999).

The present invention, in another aspect, provides TCRs specific for a polypeptide disclosed herein, or for a variant or derivative thereof. In accordance with
10 the present invention, polynucleotide and amino acid sequences are provided for the V-J or V-D-J junctional regions or parts thereof for the alpha and beta chains of the T-cell receptor which recognize tumor polypeptides described herein. In general, this aspect of the invention relates to T-cell receptors which recognize or bind tumor polypeptides
15 presented in the context of MHC. In a preferred embodiment the tumor antigens recognized by the T-cell receptors comprise a polypeptide of the present invention. For example, cDNA encoding a TCR specific for a colon tumor peptide can be isolated from T cells specific for a tumor polypeptide using standard molecular biological and recombinant DNA techniques.

This invention further includes the T-cell receptors or analogs thereof
20 having substantially the same function or activity as the T-cell receptors of this invention which recognize or bind tumor polypeptides. Such receptors include, but are not limited to, a fragment of the receptor, or a substitution, addition or deletion mutant of a T-cell receptor provided herein. This invention also encompasses polypeptides or
25 peptides that are substantially homologous to the T-cell receptors provided herein or that retain substantially the same activity. The term "analog" includes any protein or polypeptide having an amino acid residue sequence substantially identical to the T-cell receptors provided herein in which one or more residues, preferably no more than 5 residues, more preferably no more than 25 residues have been conservatively
30 substituted with a functionally similar residue and which displays the functional aspects of the T-cell receptor as described herein.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

62

The present invention further provides for suitable mammalian host cells, for example, non-specific T cells, that are transfected with a polynucleotide encoding TCRs specific for a polypeptide described herein, thereby rendering the host cell specific for the polypeptide. The α and β chains of the TCR may be contained on
5 separate expression vectors or alternatively, on a single expression vector that also contains an internal ribosome entry site (IRES) for cap-independent translation of the gene downstream of the IRES. Said host cells expressing TCRs specific for the polypeptide may be used, for example, for adoptive immunotherapy of colon cancer as discussed further below.

10 In further aspects of the present invention, cloned TCRs specific for a polypeptide recited herein may be used in a kit for the diagnosis of colon cancer. For example, the nucleic acid sequence or portions thereof, of colon tumor-specific TCRs can be used as probes or primers for the detection of expression of the rearranged genes encoding the specific TCR in a biological sample. Therefore, the present invention
15 further provides for an assay for detecting messenger RNA or DNA encoding the TCR specific for a polypeptide.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

In additional embodiments, the present invention concerns formulation of one or more of the polynucleotide, polypeptide, T-cell, TCR, and/or antibody
20 compositions disclosed herein in pharmaceutically-acceptable carriers for administration to a cell or an animal, either alone, or in combination with one or more other modalities of therapy.

It will be understood that, if desired, a composition as disclosed herein may be administered in combination with other agents as well, such as, e.g., other
25 proteins or polypeptides or various pharmaceutically-active agents. In fact, there is virtually no limit to other components that may also be included, given that the additional agents do not cause a significant adverse effect upon contact with the target cells or host tissues. The compositions may thus be delivered along with various other agents as required in the particular instance. Such compositions may be purified from
30 host cells or other biological sources, or alternatively may be chemically synthesized as

described herein. Likewise, such compositions may further comprise substituted or derivatized RNA or DNA compositions.

Therefore, in another aspect of the present invention, pharmaceutical compositions are provided comprising one or more of the polynucleotide, polypeptide, antibody, TCR, and/or T-cell compositions described herein in combination with a physiologically acceptable carrier. In certain preferred embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention comprise immunogenic polynucleotide and/or polypeptide compositions of the invention for use in prophylactic and therapeutic vaccine applications. Vaccine preparation is generally described in, for example, M.F. Powell and M.J. Newman, eds., "Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)," Plenum Press (NY, 1995). Generally, such compositions will comprise one or more polynucleotide and/or polypeptide compositions of the present invention in combination with one or more immunostimulants.

It will be apparent that any of the pharmaceutical compositions described herein can contain pharmaceutically acceptable salts of the polynucleotides and polypeptides of the invention. Such salts can be prepared, for example, from pharmaceutically acceptable non-toxic bases, including organic bases (*e.g.*, salts of primary, secondary and tertiary amines and basic amino acids) and inorganic bases (*e.g.*, sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium and magnesium salts).

In another embodiment, illustrative immunogenic compositions, *e.g.*, vaccine compositions, of the present invention comprise DNA encoding one or more of the polypeptides as described above, such that the polypeptide is generated *in situ*. As noted above, the polynucleotide may be administered within any of a variety of delivery systems known to those of ordinary skill in the art. Indeed, numerous gene delivery techniques are well known in the art, such as those described by Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:143-198, 1998, and references cited therein. Appropriate polynucleotide expression systems will, of course, contain the necessary regulatory DNA regulatory sequences for expression in a patient (such as a suitable promoter and terminating signal). Alternatively, bacterial delivery systems may involve the administration of a bacterium (such as *Bacillus-Calmette-Guerrin*) that expresses an immunogenic portion of the polypeptide on its cell surface or secretes such an epitope.

Therefore, in certain embodiments, polynucleotides encoding immunogenic polypeptides described herein are introduced into suitable mammalian host cells for expression using any of a number of known viral-based systems. In one illustrative embodiment, retroviruses provide a convenient and effective platform for gene delivery systems. A selected nucleotide sequence encoding a polypeptide of the present invention can be inserted into a vector and packaged in retroviral particles using techniques known in the art. The recombinant virus can then be isolated and delivered to a subject. A number of illustrative retroviral systems have been described (e.g., U.S. Pat. No. 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) *Curr. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

In addition, a number of illustrative adenovirus-based systems have also been described. Unlike retroviruses which integrate into the host genome, adenoviruses persist extrachromosomally thus minimizing the risks associated with insertional mutagenesis (Haj-Ahmad and Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett et al. (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth et al. (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr et al. (1994) *Gene Therapy* 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; and Rich et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476).

Various adeno-associated virus (AAV) vector systems have also been developed for polynucleotide delivery. AAV vectors can be readily constructed using techniques well known in the art. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,173,414 and 5,139,941; International Publication Nos. WO 92/01070 and WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) *Molce. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling and Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; and Zhou et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

Additional viral vectors useful for delivering the polynucleotides encoding polypeptides of the present invention by gene transfer include those derived

from the pox family of viruses, such as vaccinia virus and avian poxvirus. By way of example, vaccinia virus recombinants expressing the novel molecules can be constructed as follows. The DNA encoding a polypeptide is first inserted into an appropriate vector so that it is adjacent to a vaccinia promoter and flanking vaccinia DNA sequences, such as the sequence encoding thymidine kinase (TK). This vector is then used to transfect cells which are simultaneously infected with vaccinia. Homologous recombination serves to insert the vaccinia promoter plus the gene encoding the polypeptide of interest into the viral genome. The resulting TK^{sup}(-) recombinant can be selected by culturing the cells in the presence of 5-bromodeoxyuridine and picking viral plaques resistant thereto.

A vaccinia-based infection/transfection system can be conveniently used to provide for inducible, transient expression or coexpression of one or more polypeptides described herein in host cells of an organism. In this particular system, cells are first infected *in vitro* with a vaccinia virus recombinant that encodes the bacteriophage T7 RNA polymerase. This polymerase displays exquisite specificity in that it only transcribes templates bearing T7 promoters. Following infection, cells are transfected with the polynucleotide or polynucleotides of interest, driven by a T7 promoter. The polymerase expressed in the cytoplasm from the vaccinia virus recombinant transcribes the transfected DNA into RNA which is then translated into polypeptide by the host translational machinery. The method provides for high level, transient, cytoplasmic production of large quantities of RNA and its translation products. See, *e.g.*, Elroy-Stein and Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:6743-6747; Fuerst *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:8122-8126.

Alternatively, avipoxviruses, such as the fowlpox and canarypox viruses, can also be used to deliver the coding sequences of interest. Recombinant avipox viruses, expressing immunogens from mammalian pathogens, are known to confer protective immunity when administered to non-avian species. The use of an Avipox vector is particularly desirable in human and other mammalian species since members of the Avipox genus can only productively replicate in susceptible avian species and therefore are not infective in mammalian cells. Methods for producing recombinant Avipoxviruses are known in the art and employ genetic recombination, as described

above with respect to the production of vaccinia viruses. See, e.g., WO 91/12882; WO 89/03429; and WO 92/03545.

Any of a number of alphavirus vectors can also be used for delivery of polynucleotide compositions of the present invention, such as those vectors described in U.S. Patent Nos. 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 and 6,015,694. Certain vectors based on Venezuelan Equine Encephalitis (VEE) can also be used, illustrative examples of which can be found in U.S. Patent Nos. 5,505,947 and 5,643,576.

Moreover, molecular conjugate vectors, such as the adenovirus chimeric vectors described in Michael et al. *J. Biol. Chem.* (1993) 268:6866-6869 and Wagner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:6099-6103, can also be used for gene delivery under the invention.

Additional illustrative information on these and other known viral-based delivery systems can be found, for example, in Fisher-Hoch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:317-321, 1989; Flexner et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86-103, 1989; Flexner et al., *Vaccine* 8:17-21, 1990; U.S. Patent Nos. 4,603,112, 4,769,330, and 5,017,487; WO 89/01973; U.S. Patent No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434, 1991; Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11498-11502, 1993; Guzman et al., *Circulation* 88:2838-2848, 1993; and Guzman et al., *Cir. Res.* 73:1202-1207, 1993.

In certain embodiments, a polynucleotide may be integrated into the genome of a target cell. This integration may be in the specific location and orientation via homologous recombination (gene replacement) or it may be integrated in a random, non-specific location (gene augmentation). In yet further embodiments, the polynucleotide may be stably maintained in the cell as a separate, episomal segment of DNA. Such polynucleotide segments or "episomes" encode sequences sufficient to permit maintenance and replication independent of or in synchronization with the host cell cycle. The manner in which the expression construct is delivered to a cell and where in the cell the polynucleotide remains is dependent on the type of expression construct employed.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

67

In another embodiment of the invention, a polynucleotide is administered/delivered as "naked" DNA, for example as described in Ulmer et al., *Science* 259:1745-1749, 1993 and reviewed by Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993. The uptake of naked DNA may be increased by coating the DNA onto biodegradable beads, which are efficiently transported into the cells.

In still another embodiment, a composition of the present invention can be delivered via a particle bombardment approach, many of which have been described. In one illustrative example, gas-driven particle acceleration can be achieved with devices such as those manufactured by Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) and Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), some examples of which are described in U.S. Patent Nos. 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; and EP Patent No. 0500 799. This approach offers a needle-free delivery approach wherein a dry powder formulation of microscopic particles, such as polynucleotide or polypeptide particles, are accelerated to high speed within a helium gas jet generated by a hand held device, propelling the particles into a target tissue of interest.

In a related embodiment, other devices and methods that may be useful for gas-driven needle-less injection of compositions of the present invention include those provided by Bioject, Inc. (Portland, OR), some examples of which are described in U.S. Patent Nos. 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 and 5,993,412.

According to another embodiment, the pharmaceutical compositions described herein will comprise one or more immunostimulants in addition to the immunogenic polynucleotide, polypeptide, antibody, T-cell, TCR, and/or APC compositions of this invention. An immunostimulant refers to essentially any substance that enhances or potentiates an immune response (antibody and/or cell-mediated) to an exogenous antigen. One preferred type of immunostimulant comprises an adjuvant. Many adjuvants contain a substance designed to protect the antigen from rapid catabolism, such as aluminum hydroxide or mineral oil, and a stimulator of immune responses, such as lipid A, *Bordetella pertussis* or *Mycobacterium tuberculosis* derived proteins. Certain adjuvants are commercially available as, for example, Freund's Incomplete Adjuvant and Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck

Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); aluminum salts such as aluminum hydroxide gel (alum) or aluminum phosphate; salts of calcium, iron or zinc; an insoluble suspension of acylated tyrosine; acylated sugars; cationically or anionically derivatized polysaccharides; polyphosphazenes; biodegradable microspheres; monophosphoryl lipid A and quil A. Cytokines, such as GM-CSF, interleukin-2, -7, -12, and other like growth factors, may also be used as adjuvants.

Within certain embodiments of the invention, the adjuvant composition is preferably one that induces an immune response predominantly of the Th1 type. High levels of Th1-type cytokines (e.g., IFN- γ , TNF α , IL-2 and IL-12) tend to favor the induction of cell mediated immune responses to an administered antigen. In contrast, high levels of Th2-type cytokines (e.g., IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10) tend to favor the induction of humoral immune responses. Following application of a vaccine as provided herein, a patient will support an immune response that includes Th1- and Th2-type responses. Within a preferred embodiment, in which a response is predominantly Th1-type, the level of Th1-type cytokines will increase to a greater extent than the level of Th2-type cytokines. The levels of these cytokines may be readily assessed using standard assays. For a review of the families of cytokines, see Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Certain preferred adjuvants for eliciting a predominantly Th1-type response include, for example, a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A, together with an aluminum salt. MPL[®] adjuvants are available from Corixa Corporation (Seattle, WA; see, for example, US Patent Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 and 4,912,094). CpG-containing oligonucleotides (in which the CpG dinucleotide is unmethylated) also induce a predominantly Th1 response. Such oligonucleotides are well known and are described, for example, in WO 96/02555, WO 99/33488 and U.S. Patent Nos. 6,003,200 and 5,856,462. Immunostimulatory DNA sequences are also described, for example, by Sato et al., *Science* 273:352, 1996. Another preferred adjuvant comprises a saponin, such as Quil A, or derivatives thereof, including QS21 and QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; Digitonin; or *Gypsophila* or

Chenopodium quinoa saponins. Other preferred formulations include more than one saponin in the adjuvant combinations of the present invention, for example combinations of at least two of the following group comprising QS21, QS7, Quil A, β -escin, or digitonin.

- 5 Alternatively the saponin formulations may be combined with vaccine vehicles composed of chitosan or other polycationic polymers, polylactide and polylactide-co-glycolide particles, poly-N-acetyl glucosamine-based polymer matrix, particles composed of polysaccharides or chemically modified polysaccharides, liposomes and lipid-based particles, particles composed of glycerol monoesters, etc.
- 10 The saponins may also be formulated in the presence of cholesterol to form particulate structures such as liposomes or ISCOMs. Furthermore, the saponins may be formulated together with a polyoxyethylene ether or ester, in either a non-particulate solution or suspension, or in a particulate structure such as a paucilamellar liposome or ISCOM. The saponins may also be formulated with excipients such as Carbopol[®] to increase
- 15 viscosity, or may be formulated in a dry powder form with a powder excipient such as lactose.

In one preferred embodiment, the adjuvant system includes the combination of a monophosphoryl lipid A and a saponin derivative, such as the combination of QS21 and 3D-MPL[®] adjuvant, as described in WO 94/00153, or a less

20 reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol, as described in WO 96/33739. Other preferred formulations comprise an oil-in-water emulsion and tocopherol. Another particularly preferred adjuvant formulation employing QS21, 3D-MPL[®] adjuvant and tocopherol in an oil-in-water emulsion is described in WO 95/17210.

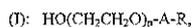
25 Another enhanced adjuvant system involves the combination of a CpG-containing oligonucleotide and a saponin derivative particularly the combination of CpG and QS21 is disclosed in WO 00/09159. Preferably the formulation additionally comprises an oil in water emulsion and tocopherol.

Additional illustrative adjuvants for use in the pharmaceutical

30 compositions of the invention include Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), the SBAS series

of adjuvants (*e.g.*, SBAS-2 or SBAS-4, available from SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium), Detox (Enhanzyn[®]) (Corixa, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) and other aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates (AGPs), such as those described in pending U.S. Patent Application Serial Nos. 08/853,826 and 09/074,720, 5 the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties, and polyoxyethylene ether adjuvants such as those described in WO 99/52549A1.

Other preferred adjuvants include adjuvant molecules of the general formula



10 wherein, n is 1-50, A is a bond or $-\text{C}(\text{O})-$, R is C_{1-50} alkyl or Phenyl C_{1-50} alkyl.

One embodiment of the present invention consists of a vaccine formulation comprising a polyoxyethylene ether of general formula (I), wherein n is between 1 and 50, preferably 4-24, most preferably 9; the R component is C_{1-50} , preferably $\text{C}_4\text{-C}_{20}$ alkyl and most preferably C_{12} alkyl, and A is a bond. The 15 concentration of the polyoxyethylene ethers should be in the range 0.1-20%, preferably from 0.1-10%, and most preferably in the range 0.1-1%. Preferred polyoxyethylene ethers are selected from the following group: polyoxyethylene-9-lauryl ether, polyoxyethylene-9-stearyl ether, polyoxyethylene-3-stearyl ether, polyoxyethylene-4-lauryl ether, polyoxyethylene-35-lauryl ether, and polyoxyethylene-23-lauryl ether. 20 Polyoxyethylene ethers such as polyoxyethylene lauryl ether are described in the Merck index (12th edition: entry 7717). These adjuvant molecules are described in WO 99/52549.

The polyoxyethylene ether according to the general formula (I) above may, if desired, be combined with another adjuvant. For example, a preferred adjuvant 25 combination is preferably with CpG as described in the pending U.K. patent application GB 9820956.2.

According to another embodiment of this invention, an immunogenic composition described herein is delivered to a host via antigen presenting cells (APCs), such as dendritic cells, macrophages, B cells, monocytes and other cells that may be 30 engineered to be efficient APCs. Such cells may, but need not, be genetically modified to increase the capacity for presenting the antigen, to improve activation and/or

WO 01/96388

PCT/US01/18557

71

5 maintenance of the T cell response, to have anti-tumor effects *per se* and/or to be immunologically compatible with the receiver (*i.e.*, matched HLA haplotype). APCs may generally be isolated from any of a variety of biological fluids and organs, including tumor and peritumoral tissues, and may be autologous, allogeneic, syngeneic or xenogeneic cells.

10 Certain preferred embodiments of the present invention use dendritic cells or progenitors thereof as antigen-presenting cells. Dendritic cells are highly potent APCs (Banchereau and Steinman, *Nature* 392:245-251, 1998) and have been shown to be effective as a physiological adjuvant for eliciting prophylactic or therapeutic antitumor immunity (*see* Timmerman and Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529, 1999). In general, dendritic cells may be identified based on their typical shape (stellate *in situ*, with marked cytoplasmic processes (dendrites) visible *in vitro*), their ability to take up, process and present antigens with high efficiency and their ability to activate naive T cell responses. Dendritic cells may, of course, be engineered to express specific cell-
15 surface receptors or ligands that are not commonly found on dendritic cells *in vivo* or *ex vivo*, and such modified dendritic cells are contemplated by the present invention. As an alternative to dendritic cells, secreted vesicles antigen-loaded dendritic cells (called exosomes) may be used within a vaccine (*see* Zitvogel et al., *Nature Med.* 4:594-600, 1998).

20 Dendritic cells and progenitors may be obtained from peripheral blood, bone marrow, tumor-infiltrating cells, peritumoral tissues-infiltrating cells, lymph nodes, spleen, skin, umbilical cord blood or any other suitable tissue or fluid. For example, dendritic cells may be differentiated *ex vivo* by adding a combination of cytokines such as GM-CSF, IL-4, IL-13 and/or TNF α to cultures of monocytes
25 harvested from peripheral blood. Alternatively, CD34 positive cells harvested from peripheral blood, umbilical cord blood or bone marrow may be differentiated into dendritic cells by adding to the culture medium combinations of GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 ligand, LPS, flt3 ligand and/or other compound(s) that induce differentiation, maturation and proliferation of dendritic cells.

30 Dendritic cells are conveniently categorized as "immature" and "mature" cells, which allows a simple way to discriminate between two well characterized

phenotypes. However, this nomenclature should not be construed to exclude all possible intermediate stages of differentiation. Immature dendritic cells are characterized as APC with a high capacity for antigen uptake and processing, which correlates with the high expression of Fcγ receptor and mannose receptor. The mature phenotype is typically characterized by a lower expression of these markers, but a high expression of cell surface molecules responsible for T cell activation such as class I and class II MHC, adhesion molecules (e.g., CD54 and CD11) and costimulatory molecules (e.g., CD40, CD80, CD86 and 4-1BB).

APCs may generally be transfected with a polynucleotide of the invention (or portion or other variant thereof) such that the encoded polypeptide, or an immunogenic portion thereof, is expressed on the cell surface. Such transfection may take place *ex vivo*, and a pharmaceutical composition comprising such transfected cells may then be used for therapeutic purposes, as described herein. Alternatively, a gene delivery vehicle that targets a dendritic or other antigen presenting cell may be administered to a patient, resulting in transfection that occurs *in vivo*. *In vivo* and *ex vivo* transfection of dendritic cells, for example, may generally be performed using any methods known in the art, such as those described in WO 97/24447, or the gene gun approach described by Mahvi et al., *Immunology and cell Biology* 75:456-460, 1997. Antigen loading of dendritic cells may be achieved by incubating dendritic cells or progenitor cells with the tumor polypeptide, DNA (naked or within a plasmid vector) or RNA; or with antigen-expressing recombinant bacterium or viruses (e.g., vaccinia, fowlpox, adenovirus or lentivirus vectors). Prior to loading, the polypeptide may be covalently conjugated to an immunological partner that provides T cell help (e.g., a carrier molecule). Alternatively, a dendritic cell may be pulsed with a non-conjugated immunological partner, separately or in the presence of the polypeptide.

While any suitable carrier known to those of ordinary skill in the art may be employed in the pharmaceutical compositions of this invention, the type of carrier will typically vary depending on the mode of administration. Compositions of the present invention may be formulated for any appropriate manner of administration, including for example, topical, oral, nasal, mucosal, intravenous, intracranial, intraperitoneal, subcutaneous and intramuscular administration.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

73

Carriers for use within such pharmaceutical compositions are biocompatible, and may also be biodegradable. In certain embodiments, the formulation preferably provides a relatively constant level of active component release. In other embodiments, however, a more rapid rate of release immediately upon administration may be desired. The formulation of such compositions is well within the level of ordinary skill in the art using known techniques. Illustrative carriers useful in this regard include microparticles of poly(lactide-co-glycolide), polyacrylate, latex, starch, cellulose, dextran and the like. Other illustrative delayed-release carriers include supramolecular biovectors, which comprise a non-liquid hydrophilic core (e.g., a cross-linked polysaccharide or oligosaccharide) and, optionally, an external layer comprising an amphiphilic compound, such as a phospholipid (see e.g., U.S. Patent No. 5,151,254 and PCT applications WO 94/20078, WO/94/23701 and WO 96/06638). The amount of active compound contained within a sustained release formulation depends upon the site of implantation, the rate and expected duration of release and the nature of the condition to be treated or prevented.

In another illustrative embodiment, biodegradable microspheres (e.g., polylactate polyglycolate) are employed as carriers for the compositions of this invention. Suitable biodegradable microspheres are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,544, 5,407,609 and 5,942,252. Modified hepatitis B core protein carrier systems, such as described in WO/99 40934, and references cited therein, will also be useful for many applications. Another illustrative carrier/delivery system employs a carrier comprising particulate-protein complexes, such as those described in U.S. Patent No. 5,928,647, which are capable of inducing a class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses in a host.

In another illustrative embodiment, calcium phosphate core particles are employed as carriers, vaccine adjuvants, or as controlled release matrices for the compositions of this invention. Exemplary calcium phosphate particles are disclosed, for example, in published patent application No. WO/0046147.

The pharmaceutical compositions of the invention will often further comprise one or more buffers (e.g., neutral buffered saline or phosphate buffered

WO 01/96388

PCT/US01/18557

74

saline), carbohydrates (e.g., glucose, mannose, sucrose or dextrans), mannitol, proteins, polypeptides or amino acids such as glycine, antioxidants, bacteriostats, chelating agents such as EDTA or glutathione, adjuvants (e.g., aluminum hydroxide), solutes that render the formulation isotonic, hypotonic or weakly hypertonic with the blood of a recipient, suspending agents, thickening agents and/or preservatives. Alternatively, compositions of the present invention may be formulated as a lyophilizate.

The pharmaceutical compositions described herein may be presented in unit-dose or multi-dose containers, such as sealed ampoules or vials. Such containers are typically sealed in such a way to preserve the sterility and stability of the formulation until use. In general, formulations may be stored as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles. Alternatively, a pharmaceutical composition may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of a sterile liquid carrier immediately prior to use.

The development of suitable dosing and treatment regimens for using the particular compositions described herein in a variety of treatment regimens, including e.g., oral, parenteral, intravenous, intranasal, and intramuscular administration and formulation, is well known in the art, some of which are briefly discussed below for general purposes of illustration.

In certain applications, the pharmaceutical compositions disclosed herein may be delivered via oral administration to an animal. As such, these compositions may be formulated with an inert diluent or with an assimilable edible carrier, or they may be enclosed in hard- or soft-shell gelatin capsule, or they may be compressed into tablets, or they may be incorporated directly with the food of the diet.

The active compounds may even be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tables, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like (see, for example, Mathiowitz *et al.*, *Nature* 1997 Mar 27;386(6623):410-4; Hwang *et al.*, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998;15(3):243-84; U. S. Patent 5,641,515; U. S. Patent 5,580,579 and U. S. Patent 5,792,451). Tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain any of a variety of additional components, for example, a binder, such as gum tragacanth, acacia, cornstarch, or gelatin; excipients, such as dicalcium phosphate; a disintegrating

WO 01/96388

PCT/US01/18557

75

agent, such as corn starch, potato starch, alginic acid and the like; a lubricant, such as magnesium stearate; and a sweetening agent, such as sucrose, lactose or saccharin may be added or a flavoring agent, such as peppermint, oil of wintergreen, or cherry flavoring. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with shellac, sugar, or both. Of course, any material used in preparing any dosage unit form should be pharmaceutically pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the active compounds may be incorporated into sustained-release preparation and formulations.

Typically, these formulations will contain at least about 0.1% of the active compound or more, although the percentage of the active ingredient(s) may, of course, be varied and may conveniently be between about 1 or 2% and about 60% or 70% or more of the weight or volume of the total formulation. Naturally, the amount of active compound(s) in each therapeutically useful composition may be prepared in such a way that a suitable dosage will be obtained in any given unit dose of the compound. Factors such as solubility, bioavailability, biological half-life, route of administration, product shelf life, as well as other pharmacological considerations will be contemplated by one skilled in the art of preparing such pharmaceutical formulations, and as such, a variety of dosages and treatment regimens may be desirable.

For oral administration the compositions of the present invention may alternatively be incorporated with one or more excipients in the form of a mouthwash, dentifrice, buccal tablet, oral spray, or sublingual orally-administered formulation. Alternatively, the active ingredient may be incorporated into an oral solution such as one containing sodium borate, glycerin and potassium bicarbonate, or dispersed in a dentifrice, or added in a therapeutically-effective amount to a composition that may include water, binders, abrasives, flavoring agents, foaming agents, and humectants. Alternatively the compositions may be fashioned into a tablet or solution form that may be placed under the tongue or otherwise dissolved in the mouth.

In certain circumstances it will be desirable to deliver the pharmaceutical compositions disclosed herein parenterally, intravenously, intramuscularly, or even

WO 01/96388

PCT/US01/18557

76

intraperitoneally. Such approaches are well known to the skilled artisan, some of which are further described, for example, in U. S. Patent 5,543,158; U. S. Patent 5,641,515 and U. S. Patent 5,399,363. In certain embodiments, solutions of the active compounds as free base or pharmacologically acceptable salts may be prepared in water suitably
5 mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions may also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations generally will contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

Illustrative pharmaceutical forms suitable for injectable use include
10 sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions (for example, see U. S. Patent 5,466,468). In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms,
15 such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g., glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and/or vegetable oils. Proper fluidity may be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and/or
20 by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be facilitated by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in
25 the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

In one embodiment, for parenteral administration in an aqueous solution, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are
30 especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, a sterile aqueous medium that can be employed will

be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage may be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion, (see for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. Moreover, for human administration, preparations will of course preferably meet sterility, pyrogenicity, and the general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

In another embodiment of the invention, the compositions disclosed herein may be formulated in a neutral or salt form. Illustrative pharmaceutically-acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective.

The carriers can further comprise any and all solvents, dispersion media, vehicles, coatings, diluents, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, buffers, carrier solutions, suspensions, colloids, and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions. The phrase "pharmaceutically-acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an allergic or similar untoward reaction when administered to a human.

In certain embodiments, the pharmaceutical compositions may be delivered by intranasal sprays, inhalation, and/or other aerosol delivery vehicles. Methods for delivering genes, nucleic acids, and peptide compositions directly to the

lungs *via* nasal aerosol sprays has been described, *e.g.*, in U. S. Patent 5,756,353 and U. S. Patent 5,804,212. Likewise, the delivery of drugs using intranasal microparticle resins (Takenaga *et al.*, *J Controlled Release* 1998 Mar 2;52(1-2):81-7) and lysophosphatidyl-glycerol compounds (U. S. Patent 5,725,871) are also well-known in the pharmaceutical arts. Likewise, illustrative transmucosal drug delivery in the form of a polytetrafluoroethylene support matrix is described in U. S. Patent 5,780,045.

In certain embodiments, liposomes, nanocapsules, microparticles, lipid particles, vesicles, and the like, are used for the introduction of the compositions of the present invention into suitable host cells/organisms. In particular, the compositions of the present invention may be formulated for delivery either encapsulated in a lipid particle, a liposome, a vesicle, a nanosphere, or a nanoparticle or the like. Alternatively, compositions of the present invention can be bound, either covalently or non-covalently, to the surface of such carrier vehicles.

The formation and use of liposome and liposome-like preparations as potential drug carriers is generally known to those of skill in the art (see for example, Lasic, *Trends Biotechnol* 1998 Jul;16(7):307-21; Takakura, *Nippon Rinsho* 1998 Mar;56(3):691-5; Chandran *et al.*, *Indian J Exp Biol*. 1997 Aug;35(8):801-9; Margalit, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1995;12(2-3):233-61; U.S. Patent 5,567,434; U.S. Patent 5,552,157; U.S. Patent 5,565,213; U.S. Patent 5,738,868 and U.S. Patent 5,795,587, each specifically incorporated herein by reference in its entirety).

Liposomes have been used successfully with a number of cell types that are normally difficult to transfect by other procedures, including T cell suspensions, primary hepatocyte cultures and PC 12 cells (Renneisen *et al.*, *J Biol Chem*. 1990 Sep 25;265(27):16337-42; Muller *et al.*, *DNA Cell Biol*. 1990 Apr;9(3):221-9). In addition, liposomes are free of the DNA length constraints that are typical of viral-based delivery systems. Liposomes have been used effectively to introduce genes, various drugs, radiotherapeutic agents, enzymes, viruses, transcription factors, allosteric effectors and the like, into a variety of cultured cell lines and animals. Furthermore, the use of liposomes does not appear to be associated with autoimmune responses or unacceptable toxicity after systemic delivery.

In certain embodiments, liposomes are formed from phospholipids that are dispersed in an aqueous medium and spontaneously form multilamellar concentric bilayer vesicles (also termed multilamellar vesicles (MLVs)).

Alternatively, in other embodiments, the invention provides for 5 pharmaceutically-acceptable nanocapsule formulations of the compositions of the present invention. Nanocapsules can generally entrap compounds in a stable and reproducible way (see, for example, Quintanar-Guerrero *et al.*, *Drug Dev Ind Pharm.* 1998 Dec;24(12):1113-28). To avoid side effects due to intracellular polymeric overloading, such ultrafine particles (sized around 0.1 μm) may be designed using 10 polymers able to be degraded *in vivo*. Such particles can be made as described, for example, by Couvreur *et al.*, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1988;5(1):1-20; zur Muhlen *et al.*, *Eur J Pharm Biopharm.* 1998 Mar;45(2):149-55; Zambaux *et al.* *J Controlled Release.* 1998 Jan 2;50(1-3):31-40; and U. S. Patent 5,145,684.

CANCER THERAPEUTIC METHODS

15 Immunologic approaches to cancer therapy are based on the recognition that cancer cells can often evade the body's defenses against aberrant or foreign cells and molecules, and that these defenses might be therapeutically stimulated to regain the lost ground, e.g. pgs. 623-648 in Klein, *Immunology* (Wiley-Interscience, New York, 1982). Numerous recent observations that various immune effectors can directly or 20 indirectly inhibit growth of tumors has led to renewed interest in this approach to cancer therapy, e.g. Jager, *et al.*, *Oncology* 2001;60(1):1-7; Renner, *et al.*, *Ann Hematol* 2000 Dec;79(12):651-9.

Four basic cell types whose function has been associated with antitumor cell immunity and the elimination of tumor cells from the body are: i) B-lymphocytes 25 which secrete immunoglobulins into the blood plasma for identifying and labeling the nonself invader cells; ii) monocytes which secrete the complement proteins that are responsible for lysing and processing the immunoglobulin-coated target invader cells; iii) natural killer lymphocytes having two mechanisms for the destruction of tumor cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killing; and iv) T- 30 lymphocytes possessing antigen-specific receptors and having the capacity to recognize

a tumor cell carrying complementary marker molecules (Schreiber, H., 1989, in *Fundamental Immunology* (ed. W. E. Paul, pp. 923-955).

Cancer immunotherapy generally focuses on inducing humoral immune responses, cellular immune responses, or both. Moreover, it is well established that induction of CD4⁺ T helper cells is necessary in order to secondarily induce either antibodies or cytotoxic CD8⁺ T cells. Polypeptide antigens that are selective or ideally specific for cancer cells, particularly colon cancer cells, offer a powerful approach for inducing immune responses against colon cancer, and are an important aspect of the present invention.

Therefore, in further aspects of the present invention, the pharmaceutical compositions described herein may be used to stimulate an immune response against cancer, particularly for the immunotherapy of colon cancer. Within such methods, the pharmaceutical compositions described herein are administered to a patient, typically a warm-blooded animal, preferably a human. A patient may or may not be afflicted with cancer. Pharmaceutical compositions and vaccines may be administered either prior to or following surgical removal of primary tumors and/or treatment such as administration of radiotherapy or conventional chemotherapeutic drugs. As discussed above, administration of the pharmaceutical compositions may be by any suitable method, including administration by intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal, intradermal, anal, vaginal, topical and oral routes.

Within certain embodiments, immunotherapy may be active immunotherapy, in which treatment relies on the *in vivo* stimulation of the endogenous host immune system to react against tumors with the administration of immune response-modifying agents (such as polypeptides and polynucleotides as provided herein).

Within other embodiments, immunotherapy may be passive immunotherapy, in which treatment involves the delivery of agents with established tumor-immune reactivity (such as effector cells or antibodies) that can directly or indirectly mediate antitumor effects and does not necessarily depend on an intact host immune system. Examples of effector cells include T cells as discussed above, T lymphocytes (such as CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes and CD4⁺ T-helper tumor-

infiltrating lymphocytes), killer cells (such as Natural Killer cells and lymphokine-activated killer cells), B cells and antigen-presenting cells (such as dendritic cells and macrophages) expressing a polypeptide provided herein. T cell receptors and antibody receptors specific for the polypeptides recited herein may be cloned, expressed and
5 transferred into other vectors or effector cells for adoptive immunotherapy. The polypeptides provided herein may also be used to generate antibodies or anti-idiotypic antibodies (as described above and in U.S. Patent No. 4,918,164) for passive immunotherapy.

Monoclonal antibodies may be labeled with any of a variety of labels for
10 desired selective usages in detection, diagnostic assays or therapeutic applications (as described in U.S. Patent Nos. 6,090,365; 6,015,542; 5,843,398; 5,595,721; and 4,708,930, hereby incorporated by reference in their entirety as if each was incorporated individually). In each case, the binding of the labelled monoclonal antibody to the
15 determinant site of the antigen will signal detection or delivery of a particular therapeutic agent to the antigenic determinant on the non-normal cell. A further object of this invention is to provide the specific monoclonal antibody suitably labelled for achieving such desired selective usages thereof.

Effector cells may generally be obtained in sufficient quantities for adoptive immunotherapy by growth *in vitro*, as described herein. Culture conditions for
20 expanding single antigen-specific effector cells to several billion in number with retention of antigen recognition *in vivo* are well known in the art. Such *in vitro* culture conditions typically use intermittent stimulation with antigen, often in the presence of cytokines (such as IL-2) and non-dividing feeder cells. As noted above, immunoreactive polypeptides as provided herein may be used to rapidly expand
25 antigen-specific T cell cultures in order to generate a sufficient number of cells for immunotherapy. In particular, antigen-presenting cells, such as dendritic, macrophage, monocyte, fibroblast and/or B cells, may be pulsed with immunoreactive polypeptides or transfected with one or more polynucleotides using standard techniques well known in the art. For example, antigen-presenting cells can be transfected with a
30 polynucleotide having a promoter appropriate for increasing expression in a recombinant virus or other expression system. Cultured effector cells for use in therapy

must be able to grow and distribute widely, and to survive long term *in vivo*. Studies have shown that cultured effector cells can be induced to grow *in vivo* and to survive long term in substantial numbers by repeated stimulation with antigen supplemented with IL-2 (see, for example, Cheever *et al.*, *Immunological Reviews* 157:177, 1997).

5 Alternatively, a vector expressing a polypeptide recited herein may be introduced into antigen presenting cells taken from a patient and clonally propagated *ex vivo* for transplant back into the same patient. Transfected cells may be reintroduced into the patient using any means known in the art, preferably in sterile form by intravenous, intracavitary, intraperitoneal or intratumor administration.

10 Routes and frequency of administration of the therapeutic compositions described herein, as well as dosage, will vary from individual to individual, and may be readily established using standard techniques. In general, the pharmaceutical compositions and vaccines may be administered by injection (*e.g.*, intracutaneous, intramuscular, intravenous or subcutaneous), intranasally (*e.g.*, by aspiration) or orally.
15 Preferably, between 1 and 10 doses may be administered over a 52 week period. Preferably, 6 doses are administered, at intervals of 1 month, and booster vaccinations may be given periodically thereafter. Alternate protocols may be appropriate for individual patients. A suitable dose is an amount of a compound that, when administered as described above, is capable of promoting an anti-tumor immune
20 response, and is at least 10-50% above the basal (*i.e.*, untreated) level. Such response can be monitored by measuring the anti-tumor antibodies in a patient or by vaccine-dependent generation of cytolytic effector cells capable of killing the patient's tumor cells *in vitro*. Such vaccines should also be capable of causing an immune response that leads to an improved clinical outcome (*e.g.*, more frequent remissions, complete or
25 partial or longer disease-free survival) in vaccinated patients as compared to non-vaccinated patients. In general, for pharmaceutical compositions and vaccines comprising one or more polypeptides, the amount of each polypeptide present in a dose ranges from about 25 µg to 5 mg per kg of host. Suitable dose sizes will vary with the size of the patient, but will typically range from about 0.1 mL to about 5 mL.

30 In general, an appropriate dosage and treatment regimen provides the active compound(s) in an amount sufficient to provide therapeutic and/or prophylactic

benefit. Such a response can be monitored by establishing an improved clinical outcome (e.g., more frequent remissions, complete or partial, or longer disease-free survival) in treated patients as compared to non-treated patients. Increases in preexisting immune responses to a tumor protein generally correlate with an improved clinical outcome. Such immune responses may generally be evaluated using standard proliferation, cytotoxicity or cytokine assays, which may be performed using samples obtained from a patient before and after treatment.

CANCER DETECTION AND DIAGNOSTIC COMPOSITIONS, METHODS AND KITS

In general, a cancer may be detected in a patient based on the presence of one or more colon tumor proteins and/or polynucleotides encoding such proteins in a biological sample (for example, blood, sera, sputum urine and/or tumor biopsies) obtained from the patient. In other words, such proteins may be used as markers to indicate the presence or absence of a cancer such as colon cancer. In addition, such proteins may be useful for the detection of other cancers. The binding agents provided herein generally permit detection of the level of antigen that binds to the agent in the biological sample.

Polynucleotide primers and probes may be used to detect the level of mRNA encoding a tumor protein, which is also indicative of the presence or absence of a cancer. In general, a tumor sequence should be present at a level that is at least two-fold, preferably three-fold, and more preferably five-fold or higher in tumor tissue than in normal tissue of the same type from which the tumor arose. Expression levels of a particular tumor sequence in tissue types different from that in which the tumor arose are irrelevant in certain diagnostic embodiments since the presence of tumor cells can be confirmed by observation of predetermined differential expression levels, e.g., 2-fold, 5-fold, etc. in tumor tissue to expression levels in normal tissue of the same type.

Other differential expression patterns can be utilized advantageously for diagnostic purposes. For example, in one aspect of the invention, overexpression of a tumor sequence in tumor tissue and normal tissue of the same type, but not in other normal tissue types, e.g. PBMCs, can be exploited diagnostically. In this case, the presence of metastatic tumor cells, for example in a sample taken from the circulation

or some other tissue site different from that in which the tumor arose, can be identified and/or confirmed by detecting expression of the tumor sequence in the sample, for example using RT-PCR analysis. In many instances, it will be desired to enrich for tumor cells in the sample of interest, e.g., PBMCs, using cell capture or other like techniques.

There are a variety of assay formats known to those of ordinary skill in the art for using a binding agent to detect polypeptide markers in a sample. See, e.g., Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. In general, the presence or absence of a cancer in a patient may be determined by (a) contacting a biological sample obtained from a patient with a binding agent; (b) detecting in the sample a level of polypeptide that binds to the binding agent; and (c) comparing the level of polypeptide with a predetermined cut-off value.

In a preferred embodiment, the assay involves the use of binding agent immobilized on a solid support to bind to and remove the polypeptide from the remainder of the sample. The bound polypeptide may then be detected using a detection reagent that contains a reporter group and specifically binds to the binding agent/polypeptide complex. Such detection reagents may comprise, for example, a binding agent that specifically binds to the polypeptide or an antibody or other agent that specifically binds to the binding agent, such as an anti-immunoglobulin, protein G, protein A or a lectin. Alternatively, a competitive assay may be utilized, in which a polypeptide is labeled with a reporter group and allowed to bind to the immobilized binding agent after incubation of the binding agent with the sample. The extent to which components of the sample inhibit the binding of the labeled polypeptide to the binding agent is indicative of the reactivity of the sample with the immobilized binding agent. Suitable polypeptides for use within such assays include full length colon tumor proteins and polypeptide portions thereof to which the binding agent binds, as described above.

The solid support may be any material known to those of ordinary skill in the art to which the tumor protein may be attached. For example, the solid support may be a test well in a microtiter plate or a nitrocellulose or other suitable membrane. Alternatively, the support may be a bead or disc, such as glass, fiberglass, latex or a

plastic material such as polystyrene or polyvinylchloride. The support may also be a magnetic particle or a fiber optic sensor, such as those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,359,681. The binding agent may be immobilized on the solid support using a variety of techniques known to those of skill in the art, which are amply
5 described in the patent and scientific literature. In the context of the present invention, the term "immobilization" refers to both noncovalent association, such as adsorption, and covalent attachment (which may be a direct linkage between the agent and functional groups on the support or may be a linkage by way of a cross-linking agent). Immobilization by adsorption to a well in a microtiter plate or to a membrane is
10 preferred. In such cases, adsorption may be achieved by contacting the binding agent, in a suitable buffer, with the solid support for a suitable amount of time. The contact time varies with temperature, but is typically between about 1 hour and about 1 day. In general, contacting a well of a plastic microtiter plate (such as polystyrene or polyvinylchloride) with an amount of binding agent ranging from about 10 ng to about
15 10 μ g, and preferably about 100 ng to about 1 μ g, is sufficient to immobilize an adequate amount of binding agent.

Covalent attachment of binding agent to a solid support may generally be achieved by first reacting the support with a bifunctional reagent that will react with both the support and a functional group, such as a hydroxyl or amino group, on the
20 binding agent. For example, the binding agent may be covalently attached to supports having an appropriate polymer coating using benzoquinone or by condensation of an aldehyde group on the support with an amine and an active hydrogen on the binding partner (see, e.g., Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, at A12-A13).

25 In certain embodiments, the assay is a two-antibody sandwich assay. This assay may be performed by first contacting an antibody that has been immobilized on a solid support, commonly the well of a microtiter plate, with the sample, such that polypeptides within the sample are allowed to bind to the immobilized antibody. Unbound sample is then removed from the immobilized polypeptide-antibody
30 complexes and a detection reagent (preferably a second antibody capable of binding to a different site on the polypeptide) containing a reporter group is added. The amount of

detection reagent that remains bound to the solid support is then determined using a method appropriate for the specific reporter group.

More specifically, once the antibody is immobilized on the support as described above, the remaining protein binding sites on the support are typically
5 blocked. Any suitable blocking agent known to those of ordinary skill in the art, such as bovine serum albumin or Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The immobilized antibody is then incubated with the sample, and polypeptide is allowed to bind to the antibody. The sample may be diluted with a suitable diluent, such as phosphate-buffered saline (PBS) prior to incubation. In general, an appropriate contact
10 time (*i.e.*, incubation time) is a period of time that is sufficient to detect the presence of polypeptide within a sample obtained from an individual with colon cancer at least about 95% of that achieved at equilibrium between bound and unbound polypeptide. Those of ordinary skill in the art will recognize that the time necessary to achieve equilibrium may be readily determined by assaying the level of binding that occurs over
15 a period of time. At room temperature, an incubation time of about 30 minutes is generally sufficient.

Unbound sample may then be removed by washing the solid support with an appropriate buffer, such as PBS containing 0.1% Tween 20™. The second antibody, which contains a reporter group, may then be added to the solid support.
20 Preferred reporter groups include those groups recited above.

The detection reagent is then incubated with the immobilized antibody-polypeptide complex for an amount of time sufficient to detect the bound polypeptide. An appropriate amount of time may generally be determined by assaying the level of binding that occurs over a period of time. Unbound detection reagent is then removed
25 and bound detection reagent is detected using the reporter group. The method employed for detecting the reporter group depends upon the nature of the reporter group. For radioactive groups, scintillation counting or autoradiographic methods are generally appropriate. Spectroscopic methods may be used to detect dyes, luminescent groups and fluorescent groups. Biotin may be detected using avidin, coupled to a
30 different reporter group (commonly a radioactive or fluorescent group or an enzyme). Enzyme reporter groups may generally be detected by the addition of substrate

(generally for a specific period of time), followed by spectroscopic or other analysis of the reaction products.

To determine the presence or absence of a cancer, such as colon cancer, the signal detected from the reporter group that remains bound to the solid support is generally compared to a signal that corresponds to a predetermined cut-off value. In one preferred embodiment, the cut-off value for the detection of a cancer is the average mean signal obtained when the immobilized antibody is incubated with samples from patients without the cancer. In general, a sample generating a signal that is three standard deviations above the predetermined cut-off value is considered positive for the cancer. In an alternate preferred embodiment, the cut-off value is determined using a Receiver Operator Curve, according to the method of Sackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7. Briefly, in this embodiment, the cut-off value may be determined from a plot of pairs of true positive rates (*i.e.*, sensitivity) and false positive rates (100%-specificity) that correspond to each possible cut-off value for the diagnostic test result. The cut-off value on the plot that is the closest to the upper left-hand corner (*i.e.*, the value that encloses the largest area) is the most accurate cut-off value, and a sample generating a signal that is higher than the cut-off value determined by this method may be considered positive. Alternatively, the cut-off value may be shifted to the left along the plot, to minimize the false positive rate, or to the right, to minimize the false negative rate. In general, a sample generating a signal that is higher than the cut-off value determined by this method is considered positive for a cancer.

In a related embodiment, the assay is performed in a flow-through or strip test format, wherein the binding agent is immobilized on a membrane, such as nitrocellulose. In the flow-through test, polypeptides within the sample bind to the immobilized binding agent as the sample passes through the membrane. A second, labeled binding agent then binds to the binding agent-polypeptide complex as a solution containing the second binding agent flows through the membrane. The detection of bound second binding agent may then be performed as described above. In the strip test format, one end of the membrane to which binding agent is bound is immersed in a solution containing the sample. The sample migrates along the membrane through a

region containing second binding agent and to the area of immobilized binding agent. Concentration of second binding agent at the area of immobilized antibody indicates the presence of a cancer. Typically, the concentration of second binding agent at that site generates a pattern, such as a line, that can be read visually. The absence of such a pattern indicates a negative result. In general, the amount of binding agent immobilized on the membrane is selected to generate a visually discernible pattern when the biological sample contains a level of polypeptide that would be sufficient to generate a positive signal in the two-antibody sandwich assay, in the format discussed above. Preferred binding agents for use in such assays are antibodies and antigen-binding fragments thereof. Preferably, the amount of antibody immobilized on the membrane ranges from about 25 ng to about 1 μ g, and more preferably from about 50 ng to about 500 ng. Such tests can typically be performed with a very small amount of biological sample.

Of course, numerous other assay protocols exist that are suitable for use with the tumor proteins or binding agents of the present invention. The above descriptions are intended to be exemplary only. For example, it will be apparent to those of ordinary skill in the art that the above protocols may be readily modified to use tumor polypeptides to detect antibodies that bind to such polypeptides in a biological sample. The detection of such tumor protein specific antibodies may correlate with the presence of a cancer.

A cancer may also, or alternatively, be detected based on the presence of T cells that specifically react with a tumor protein in a biological sample. Within certain methods, a biological sample comprising CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells isolated from a patient is incubated with a tumor polypeptide, a polynucleotide encoding such a polypeptide and/or an APC that expresses at least an immunogenic portion of such a polypeptide, and the presence or absence of specific activation of the T cells is detected. Suitable biological samples include, but are not limited to, isolated T cells. For example, T cells may be isolated from a patient by routine techniques (such as by Ficoll/Hypaque density gradient centrifugation of peripheral blood lymphocytes). T cells may be incubated *in vitro* for 2-9 days (typically 4 days) at 37°C with polypeptide (e.g., 5 - 25 μ g/ml). It may be desirable to incubate another aliquot of a T cell sample

in the absence of tumor polypeptide to serve as a control. For CD4⁺ T cells, activation is preferably detected by evaluating proliferation of the T cells. For CD8⁺ T cells, activation is preferably detected by evaluating cytolytic activity. A level of proliferation that is at least two fold greater and/or a level of cytolytic activity that is at least 20% greater than in disease-free patients indicates the presence of a cancer in the patient.

As noted above, a cancer may also, or alternatively, be detected based on the level of mRNA encoding a tumor protein in a biological sample. For example, at least two oligonucleotide primers may be employed in a polymerase chain reaction (PCR) based assay to amplify a portion of a tumor cDNA derived from a biological sample, wherein at least one of the oligonucleotide primers is specific for (*i.e.*, hybridizes to) a polynucleotide encoding the tumor protein. The amplified cDNA is then separated and detected using techniques well known in the art, such as gel electrophoresis.

Similarly, oligonucleotide probes that specifically hybridize to a polynucleotide encoding a tumor protein may be used in a hybridization assay to detect the presence of polynucleotide encoding the tumor protein in a biological sample.

To permit hybridization under assay conditions, oligonucleotide primers and probes should comprise an oligonucleotide sequence that has at least about 60%, preferably at least about 75% and more preferably at least about 90%, identity to a portion of a polynucleotide encoding a tumor protein of the invention that is at least 10 nucleotides, and preferably at least 20 nucleotides, in length. Preferably, oligonucleotide primers and/or probes hybridize to a polynucleotide encoding a polypeptide described herein under moderately stringent conditions, as defined above. Oligonucleotide primers and/or probes which may be usefully employed in the diagnostic methods described herein preferably are at least 10-40 nucleotides in length. In a preferred embodiment, the oligonucleotide primers comprise at least 10 contiguous nucleotides, more preferably at least 15 contiguous nucleotides, of a DNA molecule having a sequence as disclosed herein. Techniques for both PCR based assays and hybridization assays are well known in the art (*see*, for example, Mullis et al., *Cold*

Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Frilich ed., *PCR Technology*, Stockton Press, NY, 1989).

One preferred assay employs RT-PCR, in which PCR is applied in conjunction with reverse transcription. Typically, RNA is extracted from a biological sample, such as biopsy tissue, and is reverse transcribed to produce cDNA molecules. PCR amplification using at least one specific primer generates a cDNA molecule, which may be separated and visualized using, for example, gel electrophoresis. Amplification may be performed on biological samples taken from a test patient and from an individual who is not afflicted with a cancer. The amplification reaction may be performed on several dilutions of cDNA spanning two orders of magnitude. A two-fold or greater increase in expression in several dilutions of the test patient sample as compared to the same dilutions of the non-cancerous sample is typically considered positive.

In another aspect of the present invention, cell capture technologies may be used in conjunction with, for example, real-time PCR to provide a more sensitive tool for detection of metastatic cells expressing colon tumor antigens. Detection of colon cancer cells in biological samples, e.g., bone marrow samples, peripheral blood, and small needle aspiration samples is desirable for diagnosis and prognosis in colon cancer patients.

Immunomagnetic beads coated with specific monoclonal antibodies to surface cell markers, or tetrameric antibody complexes, may be used to first enrich or positively select cancer cells in a sample. Various commercially available kits may be used, including Dynabeads® Epithelial Enrich (DynaL Biotech, Oslo, Norway), StemSep™ (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC), and RosetteSep (StemCell Technologies). A skilled artisan will recognize that other methodologies and kits may also be used to enrich or positively select desired cell populations. Dynabeads® Epithelial Enrich contains magnetic beads coated with mAbs specific for two glycoprotein membrane antigens expressed on normal and neoplastic epithelial tissues. The coated beads may be added to a sample and the sample then applied to a magnet, thereby capturing the cells bound to the beads. The unwanted cells are washed away and the magnetically isolated cells eluted from the beads and used in further analyses.

RosetteSep can be used to enrich cells directly from a blood sample and consists of a cocktail of tetrameric antibodies that targets a variety of unwanted cells and crosslinks them to glycophorin A on red blood cells (RBC) present in the sample, forming rosettes. When centrifuged over Ficoll, targeted cells pellet along with the free RBC. The combination of antibodies in the depletion cocktail determines which cells will be removed and consequently which cells will be recovered. Antibodies that are available include, but are not limited to: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD29, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD66B, CD66e, HLA-DR, IgF, and TCR $\alpha\beta$.

Additionally, it is contemplated in the present invention that mAbs specific for colon tumor antigens can be generated and used in a similar manner. For example, mAbs that bind to tumor-specific cell surface antigens may be conjugated to magnetic beads, or formulated in a tetrameric antibody complex, and used to enrich or positively select metastatic colon tumor cells from a sample. Once a sample is enriched or positively selected, cells may be lysed and RNA isolated. RNA may then be subjected to RT-PCR analysis using colon tumor-specific primers in a real-time PCR assay as described herein. One skilled in the art will recognize that enriched or selected populations of cells may be analyzed by other methods (e.g. *in situ* hybridization or flow cytometry).

In another embodiment, the compositions described herein may be used as markers for the progression of cancer. In this embodiment, assays as described above for the diagnosis of a cancer may be performed over time, and the change in the level of reactive polypeptide(s) or polynucleotide(s) evaluated. For example, the assays may be performed every 24-72 hours for a period of 6 months to 1 year, and thereafter performed as needed. In general, a cancer is progressing in those patients in whom the level of polypeptide or polynucleotide detected increases over time. In contrast, the cancer is not progressing when the level of reactive polypeptide or polynucleotide either remains constant or decreases with time.

Certain *in vivo* diagnostic assays may be performed directly on a tumor. One such assay involves contacting tumor cells with a binding agent. The bound

WO 01/96388

PCT/US01/18557

92

binding agent may then be detected directly or indirectly via a reporter group. Such binding agents may also be used in histological applications. Alternatively, polynucleotide probes may be used within such applications.

As noted above, to improve sensitivity, multiple tumor protein markers may be assayed within a given sample. It will be apparent that binding agents specific for different proteins provided herein may be combined within a single assay. Further, multiple primers or probes may be used concurrently. The selection of tumor protein markers may be based on routine experiments to determine combinations that results in optimal sensitivity. In addition, or alternatively, assays for tumor proteins provided herein may be combined with assays for other known tumor antigens.

The present invention further provides kits for use within any of the above diagnostic methods. Such kits typically comprise two or more components necessary for performing a diagnostic assay. Components may be compounds, reagents, containers and/or equipment. For example, one container within a kit may contain a monoclonal antibody or fragment thereof that specifically binds to a tumor protein. Such antibodies or fragments may be provided attached to a support material, as described above. One or more additional containers may enclose elements, such as reagents or buffers, to be used in the assay. Such kits may also, or alternatively, contain a detection reagent as described above that contains a reporter group suitable for direct or indirect detection of antibody binding.

Alternatively, a kit may be designed to detect the level of mRNA encoding a tumor protein in a biological sample. Such kits generally comprise at least one oligonucleotide probe or primer, as described above, that hybridizes to a polynucleotide encoding a tumor protein. Such an oligonucleotide may be used, for example, within a PCR or hybridization assay. Additional components that may be present within such kits include a second oligonucleotide and/or a diagnostic reagent or container to facilitate the detection of a polynucleotide encoding a tumor protein.

The following Examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

30

EXAMPLES

EXAMPLE 1

IDENTIFICATION OF COLON TUMOR PROTEIN cDNAs

5 This Example illustrates the identification of cDNA molecules encoding colon tumor proteins using PCR-based cDNA subtraction methodology.

A modification of the Clontech (Palo Alto, CA) PCR-Select™ cDNA subtraction methodology was employed to obtain cDNA populations enriched in cDNAs derived from transcripts that are differentially expressed in colon tumor
10 samples. By this methodology, mRNA populations were isolated from colon tumor and metastatic tumor samples ("tester" mRNA) as well as from normal tissues, such as brain, pancreas, bone marrow, liver, heart, lung, stomach and small intestine ("driver" mRNA). From the tester and driver mRNA populations, cDNA was synthesized by standard methodology. See, e.g., Ausubel, F.M. et al., *Short Protocols in Molecular*
15 *Biology* (4th ed., John Wiley and Sons, Inc., 1999).

The subtraction steps were performed using a PCR-based protocol that was modified to generate fragments larger than would be derived by the Clontech methodology. By this modified protocol, the tester and driver cDNAs were separately
20 digested with five restriction endonucleases (Mlu I, Msc I, Pvu II, Sal I and Stu I) each of which recognize a unique 6-base pair nucleotide sequence. This digestion resulted in an average cDNA size of 600 bp, rather than the average size of 300 bp that results from digestion with Ksa I according to the Clontech methodology. This modification did not affect the ultimate subtraction efficiency.

Following the restriction digestion, adapter oligonucleotides having
25 unique nucleotide sequences were ligated onto the 5' ends of the tester cDNAs; adapter oligonucleotides were not ligated onto the driver cDNAs. The tester and driver cDNAs were subsequently hybridized one to the other using an excess of driver cDNA. This hybridization step resulted in populations of (a) unhybridized tester cDNAs, (b) tester cDNAs hybridized to other tester cDNAs, (c) tester cDNAs hybridized to driver
30 cDNAs, (d) unhybridized driver cDNAs and (e) driver cDNAs hybridized to driver cDNAs.

WO 01/96388

PCT/US01/18557

94

Tester cDNAs hybridized to other tester cDNAs were selectively amplified by a polymerase chain reaction (PCR) employing primers complementary to the ligated adapters. Because only tester cDNAs were ligated to adapter sequences, neither unhybridized tester or driver cDNAs, tester cDNAs hybridized to driver cDNAs nor driver cDNAs hybridized to driver cDNAs were amplified using adapter specific oligonucleotides. The PCR amplified tester cDNAs were cloned into the pCR2.1 plasmid vector (Invitrogen; Carlsbad, CA) to create libraries enriched in differentially expressed colon tumor antigen and colon metastatic (tumor antigen specific) cDNAs.

Three thousand clones from the pCR2.1 tumor antigen cDNA libraries were randomly selected and used to obtain clones for microarray analysis and nucleotide sequencing. The cDNA insert from each pCR2.1 clone was PCR amplified as follows. Briefly, 0.5 μ l of glycerol stock solution was added to 99.5 μ l of PCR mix containing 80 μ l H₂O, 10 μ l 10X PCR Buffer, 6 μ l MgCl₂, 1 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l 100 mM M13 forward primer (CACGACGTGTAAAACGACGG; SEQ ID NO:2236), 1 μ l 100 mM M13 reverse primer (CACAGGAAAACAGCTATGACC; SEQ ID NO:2237), and 0.5 μ l 5 u/ml Taq DNA polymerase. The M13 forward and reverse primers used herein were obtained from Operon Technologies (Alameda, CA). The PCR amplification was performed for thirty cycles under the following conditions: 95°C for 5 minutes, 92°C for 30 seconds, 57°C for 40 seconds, 75°C for 2 minutes and 75°C for 5 minutes.

mRNA expression levels for representative clones were determined using microarray technology in colon tumor tissues (n=25), normal colon tissues (n=6), kidney, lung, liver, brain, heart, esophagus, small intestine, stomach, pancreas, adrenal gland, salivary gland, resting PBMC, activated PBMC, bone marrow, dendritic cells, spinal cord, blood vessels, skeletal muscle, skin, breast and fetal tissues. An exemplary methodology for performing the microarray analysis is described in Schena *et al.*, *Science* 270:467-470. The number of tissue samples tested in each case was one (n=1), except where specifically noted above; additionally, all the above-mentioned tissues were derived from humans.

The PCR amplification products were dotted onto slides in an array format, with each product occupying a unique location in the array. mRNA was

WO 01/96388

PCT/US01/18557

95

extracted from the tissue sample to be tested, and fluorescent-labeled cDNA probes were generated by reverse transcription, according to standard methodology, in the presence of fluorescent nucleotides ψ 5 and ψ 3. See, e.g., Ausubel, et al., *supra* for exemplary reaction conditions for performing the reverse transcription reaction; ψ 5 and ψ 3 fluorescent labeled nucleotides may be obtained, e.g., from Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden) or NEN® Life Science Products, Inc. (Boston, MA). The microarrays were probed with the fluorescent-labeled cDNAs, the slides were scanned and fluorescence intensity was measured. Genetic MicroSystems instrumentation for preparing the cDNA microarrays and for measuring fluorescence intensity is available from Affymetrix (Santa Clara, CA).

An elevated fluorescence intensity in a microarray sector probed with cDNA probes obtained from a colon tumor or colon metastatic tumor tissue as compared to the fluorescence intensity in the same sector probed with cDNA probes obtained from a normal tissue indicates a tumor antigen gene that is differentially expressed in colon tumor or colon metastatic tumor tissue.

Clones disclosed herein as SEQ ID NO:1-2231 were identified from the PCR subtracted differential colon tumor and colon metastatic tumor cDNA libraries by the microarray based methodology.

20

EXAMPLE 2

FULL-LENGTH SEQUENCE OF C931P COLON TUMOR PROTEIN cDNA

This example discloses the full-length sequence of the C931P colon tumor protein cDNA by LifeSeq Gold Datamining.

The original sequence for C931P (disclosed herein as SEQ ID NO:1861) was used as a query sequence in a BlastN search of the LifeSeq Gold database (December 2000 release). C931P matched a single LifeSeq Gold gene bin (#475113) that contained 5 template sequences. The 5 template sequences were aligned with C931P in order to determine a consensus, full-length cDNA sequence for C931P that encodes a 371 amino acid ORF (SEQ ID NO:2232 and 2235, respectively). Multiple splice variants were discovered in the LifeSeq Gold database. Two of these splice

WO 01/96388

PCT/US01/18557

96

variants are disclosed herein, one of which encodes the 371 amino acid open reading frame.

The original clone isolated for C931P (443 bp) was used as a query sequence in a BlastN search of the LifeSeq Gold "LGtemplatesSep2000" search database. This search was done using the LifeSeq gold Web interface provided by Incyte. There was an identical match to a single LifeSeq Gold template sequence, number 475113.7. Then, information regarding gene bin 475113 (to which the 475113.7 sequence belongs) was obtained from the LifeSeq Gold database. This 10 475113 gene bin consisted of 5 template sequences and 176 clones. The 5 template sequences were aligned with the C931P sequence using the DNASTar Seqman program. Alignment of these sequences showed that each of the 5 template sequences represented an alternative splice form--each sequence had a unique multiple base pair deletion relative to the other sequences. This multiple sequence alignment was used to derive a single sequence that should represent the mature mRNA for the C931P gene, as well as 15 a single open reading frame. This predicted mature mRNA sequence was obtained by incorporating all multiple base pair deletions that were present in the 5 template sequences. The C931P original isolate sequence corresponds to a portion of the gene that is deleted in the predicted fully processed mRNA sequence. Thus, herein 3 sequences obtained from LifeSeq are disclosed. One corresponds to a predicted 20 partially spliced form of the gene (SEQ ID NO:2233) that will align with the C931P original isolate sequence. The second corresponds to the predicted, fully processed mRNA sequence (SEQ ID NO:2232) that will not align with the C931P original isolate sequence. The third sequence corresponds to the predicted coding portion of the sequence only (SEQ ID NO:2234). A single protein sequence is disclosed herein--the 25 predicted C931P full-length protein sequence (SEQ ID NO:2235).

EXAMPLE 3

MRNA EXPRESSION ANALYSIS OF THE C931P COLON TUMOR ANTIGEN USING REAL-TIME PCR

30 The colon tumor candidate gene C931P (full length cDNA set forth in SEQ ID NO:2232) was analyzed by real-time PCR, as described below, using the short

and extended colon panel. This gene was found to have increased expression in about 50% of colon tumors. Some expression was also observed in lymph nodes and thymus.

The first-strand cDNA to be used in the quantitative real-time PCR was synthesized from 20µg of total RNA that had been treated with DNase I (Amplification
5 Grade, Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD), using Superscript Reverse
Transcriptase (RT) (Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD). Real-time PCR
was performed with a GeneAmp™ 5700 sequence detection system (PE Biosystems,
Foster City, CA). The 5700 system uses SYBR™ green, a fluorescent dye that only
intercalates into double stranded DNA, and a set of gene-specific forward and reverse
10 primers. The increase in fluorescence is monitored during the whole amplification
process. The optimal concentration of primers was determined using a checkerboard
approach and a pool of cDNAs from breast tumors was used in this process.

The PCR reaction was performed in 25µl volumes that include 2.5µl of
SYBR green buffer, 2µl of cDNA template and 2.5µl each of the forward and reverse
15 primers for the gene of interest. The cDNAs used for RT reactions were diluted 1:10
for each gene of interest and 1:100 for the β-actin control. In order to quantitate the
amount of specific cDNA (and hence initial mRNA) in the sample, a standard curve is
generated for each run using the plasmid DNA containing the gene of interest.
Standard curves were generated using the Ct values determined in the real-time PCR
20 which were related to the initial cDNA concentration used in the assay. Standard
dilution ranging from 20-2x10⁹ copies of the gene of interest was used for this purpose.
In addition, a standard curve was generated for β-actin ranging from 200fg-2000fg.
This enabled standardization of the initial RNA content of a tissue sample to the amount
of β-actin for comparison purposes. The mean copy number for each group of tissues
25 tested was normalized to a constant amount of β-actin, allowing the evaluation of the
over-expression levels seen with each of the genes.

EXAMPLE 4

PEPTIDE PRIMING OF T-HELPER LINES

Generation of CD4⁺ T helper lines and identification of peptide epitopes derived from tumor-specific antigens that are capable of being recognized by CD4⁺ T cells in the context of HLA class II molecules, is carried out as follows:

Fifteen-mer peptides overlapping by 10 amino acids, derived from a tumor-specific antigen, are generated using standard procedures. Dendritic cells (DC) are derived from PBMC of a normal donor using GM-CSF and IL-4 by standard protocols. CD4⁺ T cells are generated from the same donor as the DC using MACS beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and negative selection. DC are pulsed overnight with pools of the 15-mer peptides, with each peptide at a final concentration of 0.25 µg/ml. Pulsed DC are washed and plated at 1×10^4 cells/well of 96-well V-bottom plates and purified CD4⁺ T cells are added at 1×10^5 /well. Cultures are supplemented with 60 ng/ml IL-6 and 10 ng/ml IL-12 and incubated at 37°C. Cultures are restimulated as above on a weekly basis using DC generated and pulsed as above as antigen presenting cells, supplemented with 5 ng/ml IL-7 and 10 U/ml IL-2. Following 4 *in vitro* stimulation cycles, resulting CD4⁺ T cell lines (each line corresponding to one well) are tested for specific proliferation and cytokine production in response to the stimulating pools of peptide with an irrelevant pool of peptides used as a control.

20

EXAMPLE 5

GENERATION OF TUMOR-SPECIFIC CTL LINES USING IN VITRO WHOLE-GENE PRIMING

Using *in vitro* whole-gene priming with tumor antigen-vaccinia infected DC (see, for example, Yee et al, *The Journal of Immunology*, 157(9):4079-86, 1996), human CTL lines are derived that specifically recognize autologous fibroblasts transduced with a specific tumor antigen, as determined by interferon-γ ELISPOT analysis. Specifically, dendritic cells (DC) are differentiated from monocyte cultures derived from PBMC of normal human donors by growing for five days in RPMI medium containing 10% human serum, 50 ng/ml human GM-CSF and 30 ng/ml human IL-4. Following culture, DC are infected overnight with tumor antigen-recombinant vaccinia virus at a multiplicity of infection (M.O.I) of five, and matured overnight by

30

WO 01/96388

PCT/US01/18557

99

the addition of 3 $\mu\text{g/ml}$ CD40 ligand. Virus is then inactivated by UV irradiation. CD8+ T cells are isolated using a magnetic bead system, and priming cultures are initiated using standard culture techniques. Cultures are restimulated every 7-10 days using autologous primary fibroblasts retrovirally transduced with previously identified tumor antigens. Following four stimulation cycles, CD8+ T cell lines are identified that specifically produce interferon- γ when stimulated with tumor antigen-transduced autologous fibroblasts. Using a panel of HLA-mismatched B-LCL lines transduced with a vector expressing a tumor antigen, and measuring interferon- γ production by the CTL lines in an ELISPOT assay, the HLA restriction of the CTL lines is determined.

10

EXAMPLE 6

GENERATION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-TUMOR ANTIGEN MONOCLONAL

ANTIBODIES

Mouse monoclonal antibodies are raised against *E. coli* derived tumor antigen proteins as follows: Mice are immunized with Complete Freund's Adjuvant (CFA) containing 50 μg recombinant tumor protein, followed by a subsequent intraperitoneal boost with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) containing 10 μg recombinant protein. Three days prior to removal of the spleens, the mice are immunized intravenously with approximately 50 μg of soluble recombinant protein. The spleen of a mouse with a positive titer to the tumor antigen is removed, and a single-cell suspension made and used for fusion to SP2/O myeloma cells to generate B cell hybridomas. The supernatants from the hybrid clones are tested by ELISA for specificity to recombinant tumor protein, and epitope mapped using peptides that spanned the entire tumor protein sequence. The mAbs are also tested by flow cytometry for their ability to detect tumor protein on the surface of cells stably transfected with the cDNA encoding the tumor protein.

20

25

EXAMPLE 7

SYNTHESIS OF POLYPEPTIDES

This Example discloses an exemplary methodology for the preparation of colon tumor proteins.

30

Polypeptides may be synthesized on a Perkin Elmer/Applied Biosystems Division 430A peptide synthesizer using FMOC chemistry with HPIU (O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate) activation. A Gly-Cys-Gly sequence may be attached to the amino terminus of the peptide to provide a method of conjugation, binding to an immobilized surface, or labeling of the peptide. Cleavage of the peptides from the solid support may be carried out using the following cleavage mixture: trifluoroacetic acid:ethanedithiol:thioanisole:water:phenol (40:1:2:2:3). After cleaving for 2 hours, the peptides may be precipitated in cold methyl-t-butyl-ether. The peptide pellets may then be dissolved in water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and lyophilized prior to purification by C18 reverse phase HPLC. A gradient of 0%-60% acetonitrile (containing 0.1% TFA) in water (containing 0.1% TFA) may be used to elute the peptides. Following lyophilization of the pure fractions, the peptides may be characterized using electrospray or other types of mass spectrometry and by amino acid analysis.

15

From the foregoing it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the invention is not limited except as by the appended claims.

CLAIMS

What is claimed is:

1. An isolated polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of:
 - (a) sequences provided in SEQ ID NO:1-2234;
 - (b) complements of the sequences provided in SEQ ID NO:1-2234;
 - (c) sequences consisting of at least 20 contiguous residues of a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234;
 - (d) sequences that hybridize to a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234, under moderately stringent conditions;
 - (e) sequences having at least 75% identity to a sequence of SEQ ID NO:1-2234;
 - (f) sequences having at least 90% identity to a sequence of SEQ ID NO:1-2234; and
 - (g) degenerate variants of a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234.

2. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - (a) sequences encoded by a polynucleotide of claim 1; and
 - (b) sequences having at least 70% identity to a sequence encoded by a polynucleotide of claim 1; and
 - (c) sequences having at least 90% identity to a sequence encoded by a polynucleotide of claim 1; and
 - (d) sequences provided in SEQ ID NO:2235.

3. An expression vector comprising a polynucleotide of claim 1 operably linked to an expression control sequence.

4. A host cell transformed or transfected with an expression vector according to claim 3.
5. An isolated antibody, or antigen-binding fragment thereof, that specifically binds to a polypeptide of claim 2.
6. A method for detecting the presence of a cancer in a patient, comprising the steps of:
 - (a) obtaining a biological sample from the patient;
 - (b) contacting the biological sample with a binding agent that binds to a polypeptide of claim 2;
 - (c) detecting in the sample an amount of polypeptide that binds to the binding agent; and
 - (d) comparing the amount of polypeptide to a predetermined cut-off value and therefrom determining the presence of a cancer in the patient.
7. A fusion protein comprising at least one polypeptide according to claim 2.
8. An oligonucleotide that hybridizes to a sequence recited in SEQ ID NO:1-2234 under moderately stringent conditions.
9. A method for stimulating and/or expanding T cells specific for a tumor protein, comprising contacting T cells with at least one component selected from the group consisting of:
 - (a) polypeptides according to claim 2;
 - (b) polynucleotides according to claim 1; and
 - (c) antigen-presenting cells that express a polynucleotide according to claim 1,under conditions and for a time sufficient to permit the stimulation and/or expansion of T cells.

10. An isolated T cell population, comprising T cells prepared according to the method of claim 9.

11. A composition comprising a first component selected from the group consisting of physiologically acceptable carriers and immunostimulants, and a second component selected from the group consisting of:

- (a) polypeptides according to claim 2;
- (b) polynucleotides according to claim 1;
- (c) antibodies according to claim 5;
- (d) fusion proteins according to claim 7;
- (e) T cell populations according to claim 10; and
- (f) antigen presenting cells that express a polypeptide according to claim 2.

12. A method for stimulating an immune response in a patient, comprising administering to the patient a composition of claim 11.

13. A method for the treatment of a cancer in a patient, comprising administering to the patient a composition of claim 11.

14. A method for determining the presence of a cancer in a patient, comprising the steps of:

- (a) obtaining a biological sample from the patient;
- (b) contacting the biological sample with an oligonucleotide according to claim 8;
- (c) detecting in the sample an amount of a polynucleotide that hybridizes to the oligonucleotide; and
- (d) compare the amount of polynucleotide that hybridizes to the oligonucleotide to a predetermined cut-off value, and therefrom determining the presence of the cancer in the patient.

15. A diagnostic kit comprising at least one oligonucleotide according to claim 8.

16. A diagnostic kit comprising at least one antibody according to claim 5 and a detection reagent, wherein the detection reagent comprises a reporter group.

17. A method for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising the steps of:

(a) incubating CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells isolated from a patient with at least one component selected from the group consisting of: (i) polypeptides according to claim 2; (ii) polynucleotides according to claim 1; and (iii) antigen presenting cells that express a polypeptide of claim 2, such that T cell proliferate;

(b) administering to the patient an effective amount of the proliferated T cells,

and thereby inhibiting the development of a cancer in the patient.

【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
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96388 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EF, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, 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, SF, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/18557
- (22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60210,899 9 June 2000 (09.06.2000) US
64270,216 20 February 2001 (20.02.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): CORDA CORPORATION (US/US); Suite 200, 1124 Columbia Street, Seattle, WA 98104 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): JIANG, Yugu (CN/US); 5001 S. 232nd Street, Kent, WA 98032 (US); HARLOCKER, Susan, L. (US/US); 7522 13th Avenue W., Seattle, WA 98117 (US); SECRIST, Heather (US/US); 3844 35th Avenue W., Seattle, WA 98199 (US).
- (74) Agents: POTTER, Jane, E., R.; Seed Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104-7092 et al. (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EF, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, 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, SF, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- (48) Date of publication of this corrected version: 21 March 2002
- (15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 12/2002 of 21 March 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.*

WO 01/96388 A2

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE THERAPY AND DIAGNOSIS OF COLON CANCER

(57) Abstract: Compositions and methods for the therapy and diagnosis of cancer, such as colon cancer, are disclosed. Compositions may comprise one or more colon tumor proteins, immunogenic portions thereof, or polynucleotides that encode such portions. Alternatively, a therapeutic composition may comprise an antigen presenting cell that expresses a colon tumor protein, or a T cell that is specific for cells expressing such a protein. Such compositions may be used, for example, for the prevention and treatment of disease such as colon cancer. Diagnostic methods based on detecting a colon tumor protein, or mRNA encoding such a protein, in a sample are also provided.

【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
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/096388 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/47,
A782, C12N 15/12, 15/62

(21) International Application Number: PCT/US01/18557

(22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 9 June 2000 (09.06.2000) US
60/270,216 20 February 2001 (20.02.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): COREXA
CORPORATION (US/US); Suite 200, 1124 Columbia
Street, Seattle, WA 98104 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): JIANG, Yugu
[CN/US]; 5001 S. 232nd Street, Kent, WA 98032 (US);
HARLOCKER, Susan, L. [US/US]; 7522 15th Ave-
nue W., Seattle, WA 98117 (US); SEGRIST, Heather
[US/US]; 3844 35th Avenue W., Seattle, WA 98199 (US).(74) Agents: POTTER, James, E., R.; Seed Intellectual Prop-
erty Law Group P.L.L.C., Suite 6300, 704 Fifth Avenue, Seat-
tle, WA 98104 7002 et al. (US).(81) Designated States (optional): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GD, GE, GH,
GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, ME, NA, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SI, TL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (optional): ARIPO patent (GH, GM,
RU, US, MW, BZ, 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, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI,
CG, CL, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

with international search report
with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau(88) Date of publication of the international search report:
3 October 2002

(15) Information about Correction:

Previous Correction:
see PCT Gazette No. 12/2002 of 21 March 2002, Section
IIFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/096388 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE THERAPY AND DIAGNOSIS OF COLON CANCER

(57) Abstract: Compositions and methods for the therapy and diagnosis of cancer, such as colon cancer, are disclosed. Compo-
sitions may comprise one or more colon tumor proteins, immunogenic portions thereof, or polynucleotides that encode such portions.
Alternatively, a therapeutic composition may comprise an antigen-presenting cell that expresses a colon tumor protein, or a T cell
that is specific for cells expressing such a protein. Such compositions may be used, for example, for the prevention and treatment of
diseases such as colon cancer. Diagnostic methods based on detecting a colon tumor protein, or mRNA encoding such a protein, in
a sample are also provided.

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/US 01/18557 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C07K14/82 C12N15/12 C12N15/62 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBL, WPI Data, PAJ | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | SIMON B ET AL: "EPITHELIAL GLYCOPROTEIN IS A MEMBER OF A FAMILY OF EPITHELIAL CELL SURFACE ANTIGENS HOMOLOGOUS TO NIDOGEN, A MATRIX ADHESION PROTEIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 87, no. 7, 1 April 1990 (1990-04-01), pages 2755-2759, XP000651084 ISSN: 0027-8424 figure 3 --- -/-- | 1-9, 11-17 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 priority date of another claim or other special reason (as specified)) "O" document referring to an oral disclosure, i.e., exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 7 January 2002 | | 13.05.02 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 18, Patentlaan 2 NL-2200 HV The Hague Tel: (+31-70) 340 2040, Tx: 01 651 epo NL Fax: (+31-70) 340 2016 | | Authorized officer Grosskopf, R |

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/18557

| C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No |
| X | PEREZ M S ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A CDNA ENCODING THE KSL1/4 EPITHELIAL CARCINOMA MARKER" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 142, no. 10, 15 May 1989 (1989-05-15), pages 3662-3667, XP000651096 ISSN: 0022-1767 figure 2 --- | 1-9, 11-17 |
| X | EP 0 326 423 A (LILLY CO ELI) 2 August 1989 (1989-08-02) page 9 page 16, line 27 -page 17, line 18 --- | 1-9, 11-17 |
| X | SZALA S ET AL: "MOLECULAR CLONING OF CDNA FOR THE CARCINOMA-ASSOCIATED ANTIGEN GA 733-2" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 87, no. 9, 1 May 1990 (1990-05-01), pages 3542-3546, XP000566331 ISSN: 0027-8424 see the whole document ----- | 1-9, 11-17 |

Form PCT/ISA/210 (Continuation of report sheet) (July 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | International application No. PCT/US 01/18557 |
|--|--|
| Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet) | |
| This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: | |
| <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 9, 12, 13 and 17 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p> | |
| <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 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</p> | |
| <p>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).</p> | |
| Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet) | |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows: | |
| see additional sheet | |
| <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p> | |
| <p>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.</p> | |
| <p>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.:</p> | |
| <p>4. <input checked="" 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.:</p> <p>1-9, 11-17 (all partially)</p> | |
| <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p> | |

International Application No. PCT/US 01 A8557

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-9, 11-17 (all partially)

The claims insofar as they relate to SEQ ID NO: 1

2. Claims: 1-9, 11-17 (all partially)

Inventions 2 to 2235; Claims insofar as they relate to SEQ ID NO:s 2 to 2235

3. Claims: 10 and 11-13 (partially)

Invention 2236: A T-cell population and the use thereof

International Application No. PCT/US 01 48557

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Items (d) to (g) of Claim 1 are directed to a multitude of undefined nucleotide fragments which are neither defined by their function nor by their length. Thus, the scope of Claim 1 in this respect (and consequently the scope of all other claims relating to these items) is totally unclear and unlimited and renders a meaningful or complete research impossible.

The same applies for the oligonucleotides according to Claim 8 (and consequently the method and the diagnostic kit according to Claims 14 and 15).

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

International Application No
PCT/US 01/18557

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---------------------------|
| EP 0326423 | A | 02-08-1989 | CA 1340221 A1 15-12-1998 |
| | | | DE 68922757 D1 29-06-1995 |
| | | | DE 68922757 T2 16-11-1995 |
| | | | DK 35189 A 31-07-1989 |
| | | | EP 0326423 A2 02-08-1989 |
| | | | JP 2005867 A 10-01-1990 |
| | | | JP 2774298 B2 09-07-1998 |
| | | | US 5348887 A 20-09-1994 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 K 39/39 | A 6 1 K 48/00 | 4 C 0 8 7 |
| A 6 1 K 48/00 | A 6 1 P 35/00 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 P 35/00 | A 6 1 P 37/04 | |
| A 6 1 P 37/04 | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| A 6 1 P 43/00 | C 0 7 K 16/30 | |
| C 0 7 K 16/30 | C 0 7 K 19/00 | |
| C 0 7 K 19/00 | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/15 | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/19 | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 1/21 | G 0 1 N 33/53 | D |
| C 1 2 N 5/06 | G 0 1 N 33/566 | |
| C 1 2 N 5/10 | G 0 1 N 33/574 | Z |
| G 0 1 N 33/53 | C 1 2 N 5/00 | A |
| G 0 1 N 33/566 | C 1 2 N 5/00 | E |
| G 0 1 N 33/574 | A 6 1 K 37/02 | |

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

(72)発明者 セクリスト, ヘザー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 9 9 , シアトル, 3 5 ティーエイチ アベニュー ダブルユー . 3 8 4 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 BA61 CA04 CA12 DA01 DA02 DA05
DA11 EA02 GA01 GA11 HA08 HA12
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 AC20 CA24 CA25 CA44
CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA19 BA01 BA02 BA35 BA41 BA44
CA26 CA53 CA56 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA31
MA35 MA36 MA37 MA41 MA44 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60
MA65 MA66 NA14 ZB01 ZB09 ZB26 ZC41
4C085 AA03 AA38 BB01 CC03 DD62 EE03 EE06 FF01 FF02 FF03
FF12 FF13 FF14 FF17 FF18 FF20 GG02 GG03 GG04 GG06
GG08
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 MA13 MA17 MA22 MA23
MA24 MA31 MA35 MA36 MA37 MA41 MA44 MA52 MA56 MA57
MA59 MA60 MA65 MA66 NA14 ZB01 ZB09 ZB26 ZC41
4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 CA05 DA32 MA02 MA13 MA17
MA22 MA23 MA24 MA31 MA35 MA36 MA37 MA41 MA44 MA52
MA56 MA57 MA59 MA60 MA65 MA66 NA14 ZB01 ZB09 ZB26
ZC41
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA41 CA40 CA41 DA75 DA76 DA86
EA31 EA51 FA34 FA74

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2004512022A5 | 公开(公告)日 | 2008-08-07 |
| 申请号 | JP2002510525 | 申请日 | 2001-06-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 科里克萨有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Corixa公司公司 | | |
| [标]发明人 | ジアンユーキュー ハーロッカースーザンエル セクリストヘザー | | |
| 发明人 | ジアン, ユーキュー ハーロッカー, スーザン エル. セクリスト, ヘザー | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 A61K31/7088 A61K35/12 A61K39/00 A61K39/39 A61K48/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K16/30 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53 G01N33/566 G01N33 /574 C12N5/10 C12N5/06 A61K38/00 | | |
| CPC分类号 | C07K14/4748 A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/505 C07K2319/00 C12Q1/6886 C12Q2600/158 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/12 A61K39/00.H A61K39/39 A61K48/00 A61P35/00 A61P37 /04 A61P43/00.111 C07K16/30 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/574.Z C12N5/00.A C12N5/00.E A61K37/02 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024 /DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC20 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084 /AA07 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA35 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/CA26 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/MA02 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084 /MA23 4C084/MA24 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA36 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA44 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084 /NA14 4C084/ZB01 4C084/ZB09 4C084/ZB26 4C084/ZC41 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF01 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085 /FF12 4C085/FF13 4C085/FF14 4C085/FF17 4C085/FF18 4C085/FF20 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086 /MA02 4C086/MA05 4C086/MA13 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA24 4C086/MA31 4C086/MA35 4C086/MA36 4C086/MA37 4C086/MA41 4C086/MA44 4C086/MA52 4C086/MA56 4C086 /MA57 4C086/MA59 4C086/MA60 4C086/MA65 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB01 4C086/ZB09 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB64 4C087/CA04 4C087 /CA05 4C087/DA32 4C087/MA02 4C087/MA13 4C087/MA17 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA24 4C087/MA31 4C087/MA35 4C087/MA36 4C087/MA37 4C087/MA41 4C087/MA44 4C087/MA52 4C087 /MA56 4C087/MA57 4C087/MA59 4C087/MA60 4C087/MA65 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB01 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045 /BA41 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA51 4H045/FA34 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 60/210899 2000-06-09 US 60/270216 2001-02-20 US | | |
| 其他公开文献 | JP2004512022A | | |

摘要(译)

披露了用于治疗 and 诊断癌症（例如结肠癌）的组合物和方法。该组合物可以包含一种或多种结肠肿瘤的蛋白质，编码该免疫原性蛋白质或这样的蛋白质的多核苷酸。或者，治疗组合物可包含表达结肠肿瘤蛋白的抗原呈递细胞，或对表达此类蛋白的细胞特异的T细胞。这种组合物可用于预防和治疗疾病，例如结肠癌。还提供了基于结肠肿瘤蛋白样品或编码这种蛋白质的mRNA的检测的诊断方法。