

(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2004-532629

(P2004-532629A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(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 3
A 6 1 K	35/12	A 6 1 K	35/12		4 B O 6 4
A 6 1 K	38/00	A 6 1 K	39/00	H	4 C O 8 4
A 6 1 K	39/00	A 6 1 K	39/39		4 C O 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全 284 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-576801 (P2002-576801)	(71) 出願人	500025570
(86) (22) 出願日	平成14年3月29日 (2002.3.29)		ルードヴィッヒ インスティテュート フ
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月30日 (2003.9.30)		ォー キャンサー リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/009808		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 5
(87) 国際公開番号	W02002/078526		8、ニューヨーク、サード アベニュー
(87) 国際公開日	平成14年10月10日 (2002.10.10)		6 0 5
(31) 優先権主張番号	60/280, 718	(71) 出願人	597119426
(32) 優先日	平成13年3月30日 (2001.3.30)		コーネル リサーチ ファウンデーション
(33) 優先権主張国	米国 (US)		インコーポレーテッド
(31) 優先権主張番号	60/285, 154		アメリカ合衆国 1 4 8 5 0 ニューヨー
(32) 優先日	平成13年4月20日 (2001.4.20)		ク州 イサカ スイート 1 0 5 ソーン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ウッド ドライブ 2 0 コーネル ビジ
(31) 優先権主張番号	60/327, 432		ネス アンド テクノロジー パーク
(32) 優先日	平成13年10月5日 (2001.10.5)	(74) 代理人	100102842
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌・精巣抗原

(57) 【要約】

腫瘍組織および一連の正常組織に発現する転写産物の公的データベースのスクリーニング、または、癌および精巣組織（他の正常組織ではない）に発現する遺伝子のスクリーニングにより癌・精巣（C T）抗原が同定された。本発明は、癌を患う患者において発現される C T 抗原である核酸およびコードされたポリペプチドを含む。本発明は、とりわけ、単離された核酸分子、それらの分子を含有する発現ベクター、およびそれらの分子でトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。本発明は、単離されたタンパク質およびペプチド、それらのタンパク質およびペプチドに対する抗体、ならびにタンパク質およびペプチドを認識する細胞傷害性 T リンパ球も提供する。機能的断片および変異体を含めた上記のものの断片も提供される。上記の分子を含有するキットも付加的に提供される。本発明により提供される分子は、1 つまたは 2 つ以上の C T 抗原の発現により特徴づけられる症状の診断、モニタリング、研究または処置に用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌の診断方法であって、

対象から単離された、精巣によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物、H L A 分子と複合されたその発現産物の断片或いはその発現産物または断片と結合する抗体と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、および前記剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定し、対象における癌を診断すること、

を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

剤が、

(a) 配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子またはその断片、

(b) 配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の発現産物に結合する抗体、

(c) H L A 分子および配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の発現産物の断片の複合体と結合する剤、および

(d) 前記発現産物または断片に結合する抗体に結合するポリペプチド、

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

癌が複数のヒト C T 抗原前駆体の発現により特徴づけられ、ここで、剤が、その各々が異なるヒト C T 抗原前駆体に特異的である複数の剤であり、そして前記複数の剤は、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9 または少なくとも 1 0 種のこのような剤である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

癌の診断方法であって、

対象から単離された、精巣、脳によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物、H L A 分子と複合されたその発現産物の断片または該発現産物または断片に結合する抗体と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号 3 2 で示されるヌクレオチド配列を含み、および、

前記剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、

を含む、前記方法。

30

【請求項 5】

癌の診断方法であって、

対象から単離された、精巣、卵巣、子宮頸部、肺によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物、H L A 分子と複合されたその発現産物の断片または該発現産物または断片に結合する抗体と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号 3 4 で示されるヌクレオチド配列を含み、および、

前記剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、

を含む、前記方法。

40

【請求項 6】

癌の診断方法であって、

対象から単離された、精巣、卵巣、肺、乳房、前立腺、大腸によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物、H L A 分子と複合されたその発現産物の断片または該発現産物または断片に結合する抗体と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号 3 6 で示されるヌクレオチド配列を含み、および、

50

前記剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、
を含む、前記方法。

【請求項 7】

癌の診断方法であって、
対象から単離された、精巣、胎盤、肺、乳房、前立腺によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物、H L A 分子と複合されたその発現産物の断片または該発現産物または断片に結合する抗体と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号 38 で示されるヌクレオチド配列を含み、および、
前記剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、
を含む、前記方法。

【請求項 8】

癌の診断方法であって、
対象から単離された、精巣、卵巣、胎盤、肺、前立腺、子宮頸部によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物、H L A 分子と複合されたその発現産物の断片または該発現産物または断片に結合する抗体と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号 40 で示されるヌクレオチド配列を含み、および、
前記剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、
を含む、前記方法。

【請求項 9】

癌の診断方法であって、
対象から単離された、精巣、卵巣、前立腺によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物、H L A 分子と複合されたその発現産物の断片または該発現産物または断片に結合する抗体と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号 51 で示されるヌクレオチド配列を含み、および、
前記剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、
を含む、前記方法。

【請求項 10】

配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の異常なレベルの発現により特徴づけられる癌の退行、進行または発症の決定方法であって、
癌を有するかまたは有することが疑われる対象から、異なる時期に得た精巣によるものではない複数個の試料を、
(i) タンパク質、
(i i) タンパク質由来のペプチド、
(i i i) タンパク質またはペプチドを選択的に結合する抗体、
(i v) タンパク質由来のペプチドおよび M H C 分子の複合体に特異的な細胞溶解性 T 細胞、および
(v) 配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子、
からなる群から選択されるパラメータに関して、モニタリングすること、および前記複数個の試料によるパラメータを比較することによって、癌の退行、進行または発症を決定すること、
を含む、前記方法。

【請求項 11】

試料が、体液、身体滲出液、細胞または組織である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

モニタリングの工程が、試料を、

(a) (i) のタンパク質または (i i) のペプチドを選択的に結合する抗体またはその断片、

(b) (i i i) の抗体と結合するタンパク質またはペプチド、

(c) (i v) のペプチドおよび M H C 分子の複合体を提示する細胞、および (d) (v) の核酸分子またはその相補体にハイブリダイズする少なくとも 1 つの核酸プローブまたはプライマー、

からなる群から選択される検出可能な剤と接触させること、

を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

10

抗体、タンパク質、ペプチド、細胞または核酸プローブまたはプライマーが放射性標識または酵素で標識された、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

タンパク質が複数のタンパク質であり、パラメータが複数のパラメータであり、該複数のパラメータの各々が複数のタンパク質の異なる 1 つに特異的であり、そのうちの少なくとも 1 つが配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる C T 抗原タンパク質である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

20

ヒト対象のための医薬製剤であって、

対象に投与された場合、H L A 分子およびヒト C T 抗原ペプチドの複合体の存在を選択的に豊富化する剤、および

薬学的に許容し得る担体、

を含み、

ここで、ヒト C T 抗原ペプチドは、配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるヒト C T 抗原の断片である、

前記医薬製剤。

【請求項 16】

30

剤が、その各々が H L A 分子および異なるヒト C T 抗原ペプチドの複合体を対象中で選択的に豊富化する複数の剤を含み、

ここで、ヒト C T 抗原の少なくとも 1 つは、配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる、

請求項 15 に記載の医薬製剤。

【請求項 17】

剤が、

(1) ヒト C T 抗原ペプチドを含む単離ポリペプチド、

(2) 単離ポリペプチドを発現するためのプロモーターに作動可能に連結された単離された核酸、

(3) 単離ポリペプチドを発現する宿主細胞、および

40

(4) ポリペプチドと H L A 分子との単離複合体、

からなる群から選択される、請求項 15 に記載の医薬製剤。

【請求項 18】

アジュバントをさらに含む、請求項 15 ～ 17 のいずれかに記載の医薬製剤。

【請求項 19】

剤が、ヒト C T 抗原ペプチドを含む単離ポリペプチドを発現する細胞であり、ここで、該細胞は、非増殖性である、請求項 15 に記載の医薬製剤。

【請求項 20】

剤が、ヒト C T 抗原ペプチドを含む単離ポリペプチドを発現する細胞であり、ここで、該細胞は、該ポリペプチドに結合する H L A 分子を発現する、請求項 15 に記載の医薬製剤

50

。

【請求項 2 1】

細胞が、組み換え的にポリペプチドおよび H L A 分子の一方または両方を発現する、請求項 2 0 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 2】

細胞が、非増殖性である、請求項 2 0 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 3】

配列番号 2 1、2 3、2 5、2 7、2 9、3 1、3 5 および 3 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに選択的に結合する、単離された剤を含む、組成物。

【請求項 2 4】

剤が、抗体またはその抗原結合断片である、請求項 2 3 に記載の物質の組成物。

【請求項 2 5】

抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

請求項 2 3 または 2 4 に記載の剤および治療剤または診断剤の結合体を含む物質の組成物。

【請求項 2 7】

結合体が、剤および毒素である治療剤または診断剤の結合体である、請求項 2 6 に記載の物質の組成物。

【請求項 2 8】

配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子、および
薬学的に許容し得る担体、
を含む、医薬組成物。

【請求項 2 9】

単離された核酸分子が、2 つの異なるポリペプチドをコードする少なくとも 2 つの単離された核酸分子を含み、各ポリペプチドが異なるヒト C T 抗原を含む、請求項 2 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

単離された核酸分子と作動可能に連結されたプロモーターを有する発現ベクターをさらに含む、請求項 2 8 または 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

単離された核酸分子を組み換え的に発現する宿主細胞をさらに含む、請求項 2 8 または 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子によってコードされるポリペプチドを含む単離ポリペプチド、
および
薬学的に許容し得る担体
を含む、医薬組成物。

【請求項 3 3】

単離ポリペプチドが、少なくとも 2 つの異なるポリペプチドを含み、各ポリペプチドは異なるヒト C T 抗原を含む、請求項 3 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

アジュバントをさらに含む、請求項 3 2 または 3 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

タンパク質マイクロアレイであって、

配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子によってコードされる少なくとも 1 つのポリペプチド、または

10

20

30

40

50

該ポリペプチドの抗原断片、
を含む、前記マイクロアレイ。

【請求項 36】

少なくとも1つのポリペプチドが、配列番号19、21、23、47、49および50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項35に記載のマイクロアレイ。

【請求項 37】

タンパク質マイクロアレイであって、
配列番号24、26、28および30からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む
単離された核酸分子によってコードされる少なくとも1つのポリペプチド、または
該ポリペプチドの抗原断片、
を含む、前記マイクロアレイ。

10

【請求項 38】

少なくとも1つのポリペプチドが、配列番号25、27、29および31からなる群から
選択されるアミノ酸配列を含む、請求項37に記載のマイクロアレイ。

【請求項 39】

タンパク質マイクロアレイであって、
配列番号32、34、36、38、40および51からなる群から選択されるヌクレオチ
ド配列を含む単離された核酸分子によってコードされる少なくとも1つのポリペプチド、
または

該ポリペプチドの抗原断片、
を含む、前記マイクロアレイ。

20

【請求項 40】

少なくとも1つのポリペプチドが、配列番号33、35、37、39、41および52から
なる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項39に記載のマイクロアレイ。

【請求項 41】

タンパク質マイクロアレイであって、
配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列
を含む核酸分子によりコードされる少なくとも1つのポリペプチドまたはそのポリペプ
チドの抗原断片に特異的に結合する、複数の抗体またはその抗原結合断片、
を含む、前記マイクロアレイ。

30

【請求項 42】

ポリペプチドが、配列番号19、21、23、47、49および50からなる群から選択
されるアミノ酸配列を含む、請求項41に記載のマイクロアレイ。

【請求項 43】

タンパク質マイクロアレイであって、
配列番号24、26、28および30からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む
核酸分子によりコードされる少なくとも1つのポリペプチドまたはそのポリペプチドの抗
原断片に特異的に結合する、複数の抗体またはその抗原結合断片、
を含む、前記マイクロアレイ。

【請求項 44】

ポリペプチドが、配列番号25、27、29および31からなる群から選択されるアミノ
酸配列を含む、請求項43に記載のマイクロアレイ。

40

【請求項 45】

タンパク質マイクロアレイであって、
配列番号32、34、36、38、40および51からなる群から選択されるヌクレオチ
ド配列を含む核酸分子によりコードされる少なくとも1つのポリペプチドまたはそのポリ
ペプチドの抗原断片に特異的に結合する、複数の抗体またはその抗原結合断片、
を含む、前記マイクロアレイ。

【請求項 46】

ポリペプチドが、配列番号33、35、37、39、41および52からなる群から選択

50

されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 5 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 4 7】

核酸マイクロアレイであって、

配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの核酸分子、または

生物学的試料において、その相補体を選択的にハイブリダイズする少なくとも 2 0 ヌクレオチドのその断片、

を含む、前記核酸マイクロアレイ。

【請求項 4 8】

核酸マイクロアレイであって、少なくとも 1 つの核酸分子が、

配列番号 2 4、2 6、2 8 および 3 0 からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または

生物学的試料において、その相補体を選択的にハイブリダイズする少なくとも 2 0 ヌクレオチドのその断片、

を含む、前記核酸マイクロアレイ。

【請求項 4 9】

核酸マイクロアレイであって、少なくとも 1 つの核酸分子が、

配列番号 2 4、2 6、2 8 および 3 0 からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または

生物学的試料において、その相補体を選択的にハイブリダイズする少なくとも 2 0 ヌクレオチドのその断片、

を含む、前記核酸マイクロアレイ。

【請求項 5 0】

H L A 分子またはヒト抗体に結合するヒト C T 抗原の単離断片であって、前記ヒト C T 抗原またはその一部が、配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる、前記断片。

【請求項 5 1】

断片が、H L A 分子との複合体の一部である、請求項 5 0 に記載の断片。

【請求項 5 2】

断片が、8 ～ 1 2 アミノ酸長である、請求項 5 0 に記載の断片。

【請求項 5 3】

1 つまたは 2 つ以上のヒト C T 抗原の発現の存在を検出するためのキットであって、各々の単離された核酸分子が、

(a) 配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 または 4 8 のいずれかのヌクレオチド配列の 1 2 ～ 3 2 ヌクレオチドコンティグセグメント、および

(b) (a) の相補体からなる群から選択される核酸分子、

から本質的になる、2 または 3 対以上の単離された核酸を含み、

ここで、前記コンティグセグメントは非重複性であり、各対の核酸分子は、ヒト C T 抗原に特異的である、前記キット。

【請求項 5 4】

単離された核酸分子の対が、構築され、配置されて、配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択される単離された核酸分子の少なくとも 1 つの断片を選択的に増幅する、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 5 5】

ヒト C T 抗原の発現により特徴づけられる癌を有する対象の処置方法であって、

疾患を改善するのに効果的な量の、H L A 分子およびヒト C T 抗原の複合体の存在を対象中で選択的に豊富化する剤を対象に投与することを含み、

ここで、前記ヒト C T 抗原ペプチドは、配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるヒト C T 抗原の断片である、前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 56】

癌が、複数のヒトCT抗原の発現により特徴づけられ、ここで、剤が、その各々がHLA分子および異なるヒトCT抗原ペプチドの複合体の存在を対象中で選択的に豊富化する複数の剤であり、および前記ヒトCT抗原の少なくとも1つが、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる、請求項55に記載の方法。

【請求項 57】

剤が、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる単離ポリペプチドである、請求項55に記載の方法。

10

【請求項 58】

対象の細胞のヒトCT抗原の発現により特徴づけられる癌を有する対象の処置方法であって、

(i) 対象から免疫反応性細胞含有試料を取り出すこと、

(ii) ヒトCT抗原の断片であるヒトCT抗原に対する細胞溶解性T細胞の産生に好都合な条件下で、宿主細胞に前記免疫反応性細胞含有試料を接触させること、

(iii) ヒトCT抗原を発現する細胞を溶解するのに有効な量で、対象に細胞溶解性T細胞を導入すること、を含む、

ここで、宿主細胞は、プロモーターと作動可能に連結された単離された核酸分子を含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされ、および前記単離された核酸分子は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、
前記方法。

20

【請求項 59】

宿主細胞が、ヒトCT抗原ペプチドと結合するHLA分子を組換え的に発現する、請求項58に記載の方法。

【請求項 60】

宿主細胞が、ヒトCT抗原と結合するHLA分子を内生的に発現する、請求項58に記載の方法。

【請求項 61】

対象の細胞中のヒトCT抗原の発現により特徴づけられる癌を有する対象の処置方法であって、

30

(i) 癌細胞により発現される核酸分子またはその断片を同定することであって、ここで、核酸分子は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、

(ii) (a) 同定された核酸分子、(b) ヒトCT抗原をコードするセグメントを含有する、同定された核酸の断片、(c) (a) または (b) の縮重からなる群から選択される核酸で宿主細胞をトランスフェクトすること、

(iii) トランスフェクトした前記宿主細胞を培養して、トランスフェクトした核酸分子を発現させること、および

40

(iv) 前記状態に関連する対象の細胞に対する免疫応答を増大するのに有効な量の前記宿主細胞またはその抽出物を対象に導入すること、
を含む、前記方法。

【請求項 62】

核酸分子の発現産物の一部分を提示するMHC分子を同定することをさらに含み、ここで、宿主細胞は、同定されたものと同じのMHC分子を発現し、および宿主細胞は、核酸分子の発現産物のMHC結合部分を提示する、請求項61に記載の方法。

【請求項 63】

免疫応答が、B細胞応答またはT細胞応答を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項 64】

50

応答が、核酸分子の発現産物の一部を提示する宿主細胞またはヒト C T 抗原を発現する対象の細胞に特異的な細胞溶解性 T 細胞の生成を含む T 細胞応答である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

核酸分子が、配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 6】

宿主細胞を処理してそれらを非増殖性にすることをさらに含む、請求項 6 1 または 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 7】

精巢以外の細胞または組織中の配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を処置、または診断もしくはモニタリングするための方法であって、

タンパク質またはそれに由来するペプチドと特異的に結合する抗体であって、治療的または診断的に有用な剤に結合される前記抗体を、前記状態を治療、診断またはモニタリングするのに有効な量で対象に投与すること、

を含む、前記方法。

【請求項 6 8】

抗体が、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片である、請求項 6 7 に記載の方法。 20

【請求項 6 9】

モノクローナル抗体が、キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

精巢以外の細胞または組織中の配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を処置するための方法であって、

対象における前記状態を防止し、その発症を遅延し、または抑制するのに有効な量で、1 つまたは 2 つ以上の前記医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 7 1】

精巢ではない組織内で異常量の前記タンパク質を対象が発現することを最初に同定することを含む、請求項 7 0 に記載の方法。 30

【請求項 7 2】

精巢以外の細胞または組織中の配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を処置するための方法であって、

(i) 異常量のタンパク質を発現する細胞を対象から同定すること、

(i i) 前記細胞の試料を単離すること、

(i i i) 前記細胞を培養すること、および

(i v) 前記、細胞に対する免疫応答を惹起するのに有効な量で対象に前記細胞を導入すること、

を含む、前記方法。 40

【請求項 7 3】

対象にそれらを導入する前に、細胞を非増殖性にすることをさらに含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

精巢以外の細胞または組織中の配列番号 1 8、2 0、2 2、4 6 および 4 8 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる病理学的細胞症状の処置方法であって、

それを必要とする対象に、前記タンパク質の発現または活性を抑制する有効量の剤を投与することを含む、前記方法。 50

【請求項 75】

剤が、選択的にタンパク質に結合する阻害抗体または抗体断片であって、該抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

剤が、タンパク質をコードする核酸分子と選択的に結合するアンチセンス核酸分子である、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 77】

配列番号 19、21、23、47、49 および 50 からなる群から選択されるアミノ酸を含む複数のタンパク質に対する免疫応答を刺激するのに有用な物質の組成物であって、タンパク質の断片である複数のペプチドを含み、ここで、該ペプチドは、精巢によるものではない細胞の表面に提示される 1 つまたは 2 つ以上の MHC 分子と結合する、前記組成物。 10

【請求項 78】

複数のペプチドの少なくとも一部分が MHC 分子と結合し、それに対する細胞溶解性応答を引き出す、請求項 77 に記載の組成物。

【請求項 79】

少なくとも 1 つのタンパク質が、配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されたヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる、請求項 77 に記載の組成物。

【請求項 80】

アジュバントをさらに含む、請求項 77 に記載の物質の組成物。 20

【請求項 81】

アジュバントが、サポニン、GM-CSF、インターロイキンおよび免疫増強性オリゴヌクレオチドである、請求項 80 に記載の物質の組成物。

【請求項 82】

単離された抗体であって

(i) 配列番号 19、21、23、47、49 および 50 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質の断片であるペプチド、および

(i i) 前記ペプチドと結合して複合体を形成する MHC 分子、
の複合体と選択的に結合し、 30

(i) または (i i) 単独とは結合しない、前記抗体。

【請求項 83】

抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはそれらの抗原結合断片である、請求項 82 に記載の抗体。

【請求項 84】

精巢以外の細胞または組織中の配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択ヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を、処置、診断またはモニタリングするための方法であって、前記状態を処置、診断またはモニタリングするのに効果的な量で、請求項 82 に記載の治療的または診断的に有用な剤と結合する抗体を、対象に投与することを含む、前記方法。 40

【請求項 85】

精巢以外の細胞または組織中の配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択ヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を、処置、診断またはモニタリングするための方法であって、前記状態を処置、診断またはモニタリングするのに効果的な量で、請求項 83 に記載の治療的または診断的に有用な剤と結合する抗体を、対象に投与することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、35 U.S.C § 119 (e) の下で、2001年3月30日付の米国仮出願番号60/280,718、2001年4月20日付の米国仮出願番号60/285,154および2001年10月5日付の米国仮出願番号60/327,432による優先権を主張する、現在係属中の2002年1月22日付の出願番号10/054,683の一部継続出願である。

【0002】

技術分野

本発明は、種々の癌に発現する新規な癌・精巣抗原 (cancer/testis antibody) である核酸およびコードされたポリペプチドに関する。本発明はまた、該核酸またはポリペプチドに結合する試薬にも関する。核酸分子、かかる分子によりコードされるポリペプチド、そこから得られるペプチド並びに関連抗体および細胞溶解性Tリンパ球は、とりわけ、診断および治療状況において有用である。 10

【0003】

背景技術

腫瘍免疫学の研究が、癌関連および非癌関連分野において、非常に重要な多くの発見をもたらしたことは、ある程度認識されている事実である。例えば、腫瘍抗原の調査により、CD8 T細胞抗原 (1) および分化抗原 (2) (および細胞表面抗原を類別するCDシステム) 並びにp53 (3) を発見することとなった。ウイルス性白血病誘発に対する抵抗性の免疫原性分析は、MHCと疾患感受性との最初の掛け橋となり (4)、癌への非特異的な免疫に基づく関心により、TNFを発見した (5)。

【0004】

有望な腫瘍免疫学の他の分野としては、癌・精巣 (CT) 抗原に関するカテゴリーであり、これは、自己由来のヒトメラノーマ細胞のCD8 T細胞認識に対する標的として最初に認識された (6、7)。これら抗原の分子的な定義は、従来の努力が成就することにより、自己由来の腫瘍細胞 (自己由来の形別) への体液性 (8) および細胞性 (9) 免疫反応の明白な分析におけるシステムおよび方法を確立し、そして、自己由来の形別のこのアプローチはまた、体液性免疫反応を誘発する腫瘍抗原の分子構造を決定するためのSEREX (cDNA発現ライブラリーの血清分析) を開発した (10)。 20

【0005】

癌の診断および治療における既知のCT抗原の有用性は認められているが、様々な種類およびソースの腫瘍におけるこれら抗原の発現は、一般的なものではない。したがって、癌の診断および治療をターゲットとしたさらなるCT抗原を同定し、診断的および治療的な用途において有用な医薬の開発が希求されている。 30

【0006】

発明の要約

配列データベースのバイオインフォマティクス分析を適用して、癌・精巣抗原のプロファイルにフィットする発現特性を有する配列を同定した。いくつかの新規な癌・精巣抗原および癌関連抗原を同定した。本発明は、とりわけ、単離された核酸分子、それらの分子を含有する発現ベクターおよびそれらの分子によってトランスフェクトされる宿主細胞を提供する。本発明はまた、単離されたタンパク質およびペプチド、それらのタンパク質およびペプチドに対する抗体ならびにタンパク質およびペプチドを認識するCTLも提供する。上記のものの断片および変異体も提供する。付加的に上記の分子を含有するキットも提供する。上記のものは、1つまたは2つ以上の癌・精巣および/または癌関連抗原の発現により特徴づけられる状態の診断、モニタリング、研究または処置に用いることができる。 40

【0007】

本発明の前、過去20年で同定されたのは少数の癌関連遺伝子に過ぎない。本発明は、数個の遺伝子の意外な発見を含み、そのうちのいくつかは従来既知であり、いくつかは従来未知であって、これらは癌を有する個体中で発現される。これらの個体はすべて、これらの遺伝子によりコードされるタンパク質 (またはそれらの断片) に対する血清抗体を有する。したがって、異常発現遺伝子は、宿主の免疫系により認識され、したがって診断、モニタリングおよび治療のための基礎を形成し得る。 50

【0008】

本発明は、単一物質、複数の異なる物質、そして物質の大型パネルおよび組合せの使用さえも含む。例えば単一遺伝子、遺伝子によりコードされる単一タンパク質、その単一機能的断片、それに対する単一抗体等は、本発明の方法および製品に用いることができる。同様に、これらの物質の対、群、そしてパネルでさえ、ならびに任意にその他の癌関連抗原遺伝子および／または遺伝子産物は、診断、モニタリングおよび治療のために用いることができる。対、群またはパネルは、2、3、4、5またはそれ以上の遺伝子、遺伝子産物、その断片またはこのような物質を認識する剤を含み得る。複数のこのような物質は、このような遺伝子を異常に発現する細胞をモニタリングし、類型分類し、特徴づけ、そして診断するのに有用なだけでなく、複数のこのような物質は治療的にも用いることができる。このような遺伝子を発現しているかまたは発現するであろう癌細胞の予防、発症の遅延、改善等のための複数のこのような物質の使用の一例は、予防的または短期的である。遺伝子、遺伝子産物、ならびに遺伝子および遺伝子産物を認識する物質の任意のおよびすべての組合せが試験され、本発明による使用に関して同定することができる。このような組合せをすべて列挙するのはあまりに冗長過ぎる。当業者は、特に本明細書中に含入された教示に鑑みて、組合せがどの状況に最も適しているかを容易に決定し得る。

【0009】

以下の考察から明らかになるように、本発明は、治療的、診断的、モニタリングおよび研究目的のためを含めて、in vivoおよびin vitro用途を有する。本発明の一態様は、例えばこのような遺伝子産物の発現を定量することによる本発明にしたがって同定される多数の遺伝子を発現する細胞をフィンガープリントする能力である。このようなフィンガープリントは、例えば癌の段階、癌の種類の特性を、または癌に及ぼす治療の動物モデルにおける影響の特性さえ示す。このような細胞が本発明により同定された遺伝子を異常に発現するか否かを決定するために、細胞はさらにスクリーニングすることができる。

【0010】

本発明は、一態様において、核酸分子によりコードされる癌関連抗原前駆体の発現により特徴づけられる障害の診断方法である。本方法は、対象から単離された生物学的試料を、核酸分子、その発現産物またはMHC、好ましくはHLA分子と複合されたその発現産物の断片と特異的に結合する剤に接触させる工程であって、ここで、核酸分子は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、および、剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定し、対象の癌を診断すること、を含む。

【0011】

ある態様においては、(a)配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子またはその断片、(b)配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の発現産物に結合する抗体、(c)HLA分子および配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の発現産物の断片の複合体と結合する剤、および(d)発現産物または断片に結合する抗体に結合するポリペプチド、からなる群から選択される。

【0012】

他の態様においては、癌は複数のヒトCT抗原前駆体の発現により特徴づけられ、ここで、剤が、その各々が異なるヒトCT抗原前駆体に特異的である複数の剤であり、そして前記複数の剤が、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10のこのような剤である癌は複数のヒトCT抗原前駆体の発現により特徴づけることができる。

【0013】

本発明の別の側面では、癌の診断方法を提供する。該方法は、対象から単離された精巣、脳によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物またはHLA分子と複合

10

20

30

40

50

されたその発現産物の断片と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号32で示されるヌクレオチド配列を含み、および、剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、を含む。

【0014】

本発明のさらなる側面では、他の癌の診断方法を提供する。該方法は、対象から単離された精巣、卵巣、子宮頸部、肺によるではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物またはHLA分子と複合されたその発現産物の断片と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号34で示されるヌクレオチド配列を含み、および、剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、を含む。

10

【0015】

本発明はまた、他の癌の診断方法を提供する。該方法は、対象から単離された精巣、卵巣、肺、乳房、前立腺、大腸によるではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物またはHLA分子と複合されたその発現産物の断片と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号36で示されるヌクレオチド配列を含み、および、剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、を含む。

【0016】

本発明の別の側面では、他の癌の診断方法を提供する。該方法は、対象から単離された精巣、胎盤、肺、乳房、前立腺によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物またはHLA分子と複合されたその発現産物の断片と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号38で示されるヌクレオチド配列を含み、および、剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、を含む。

20

【0017】

本発明のさらなる別の側面では、他の癌の診断方法を提供する。該方法は、対象から単離された精巣、卵巣、胎盤、肺、前立腺によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物またはHLA分子と複合されたその発現産物の断片と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号40で示されるヌクレオチド配列を含み、および、剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、を含む。

30

【0018】

本発明のまた別の側面では、他の癌の診断方法を提供する。該方法は、対象から単離された精巣、卵巣、前立腺によるものではない生物学的試料を、核酸分子、その発現産物またはHLA分子と複合されたその発現産物の断片と特異的に結合する剤とを接触させること、ここで、核酸分子は、配列番号51で示されるヌクレオチド配列を含み、および、剤と核酸分子または発現産物との間の相互作用を決定して、対象の癌を診断すること、を含む。

【0019】

本発明の他の側面においては、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の異常レベルの発現により特徴づけられる癌の退行、進行または発症の決定方法を提供する。該方法は、癌を有するかまたは有することが疑われる対象から、異なる時期において得られる精巣によるものではない複数個の試料を、(i)タンパク質、(ii)タンパク質由来のペプチド、(iii)タンパク質またはペプチドを選択的に結合する抗体、(iv)タンパク質由来のペプチドおよびMHC分子の複合体に特異的な細胞溶解性T細胞、および(v)配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子、からなる群から選択されるパラメータに関して、モニタリングする方法を含む。該方法はまた、複数個の試料によるパラメータを比較することによって、癌の退行、進行または発症を決定することを含む。

40

50

【0020】

いくつかの態様においては、試料が、体液、身体滲出液、細胞または組織である。他の態様においては、モニタリングの工程は、試料を、(a) (i) のタンパク質または (i i) のペプチドを選択的に結合する抗体、(b) (i i i) の抗体と結合するタンパク質またはペプチド、(c) (i v) のペプチドおよび M H C 分子の複合体を提示する細胞、および (d) (v) の核酸分子またはその相補体にハイブリダイズする少なくとも 1 つの核酸プローブまたはプライマー、からなる群から選択される検出可能な剤と接触させることを含む。好ましくは、抗体、タンパク質、ペプチドまたは細胞が放射性標識または酵素で標識される。さらなる態様においては、タンパク質が複数のタンパク質であり、パラメータが複数のパラメータであり、複数のパラメータの各々が複数のタンパク質の異なる 1 つに特異的であり、そのうちの少なくとも 1 つが配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる C T 抗原タンパク質である。

【0021】

本発明のさらに別の側面では、ヒト対象のための医薬製剤を提供する。該医薬製剤は、対象に投与された場合、H L A 分子およびヒト C T 抗原ペプチドの複合体の存在を選択的に豊富化する剤、および薬学的に許容し得る担体を含む。ヒト C T 抗原ペプチドは、配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるヒト C T 抗原の断片である。

【0022】

いくつかの態様において、前記医薬製剤は、その各々が H L A 分子および異なるヒト C T 抗原ペプチドの複合体を対象中で選択的に豊富化する複数の剤を含み、ここで、ヒト C T 抗原の少なくとも 1 つは、配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる。

【0023】

前記医薬製剤の他の態様においては、剤が、(1) ヒト C T 抗原ペプチドを含む単離ポリペプチド、(2) 単離ポリペプチドを発現するためのプロモーターに作動可能に連結された単離された核酸、(3) 単離ポリペプチドを発現する宿主細胞、および (4) ポリペプチドと H L A 分子の単離複合体、からなる群から選択される。

【0024】

さらなる他の態様において、剤が、ヒト C T 抗原ペプチドを含む単離ポリペプチドを発現する細胞であるか、または、ヒト C T 抗原ペプチドを含む単離ポリペプチドおよびポリペプチドに結合する H L A 分子を発現する細胞である。ある態様においては、該細胞は、組み換え的に (recombinantly) ポリペプチドおよび／または H L A 分子を発現する。好ましくは、前記細胞は非増殖性である。

前記医薬製剤はまた、好ましくは、アジュバントを含む。

【0025】

本発明の別の側面では、組成物を提供する。該組成物は、配列番号 21、23、25、27、29、31、35 および 37 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに選択的に結合する単離された剤を含む。好ましくは、剤は、抗体またはその抗原結合断片である。さらに好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体である、キメラ抗体またはヒト化抗体である。また、前記剤および治療または診断剤の 1 つまたは 2 つ以上の複合体を含む物質の組成物を提供する。好ましくは、治療剤または診断剤は毒素である、

【0026】

本発明の別の側面では、医薬組成物を提供する。該組成物は、配列番号 18、20、22、46 および 48 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子および薬学的に許容し得る担体を含む。いくつかの態様において、単離された核酸分子は、2 つの異なるポリペプチドをコードする少なくとも 2 つの単離された核酸分子を含み、各ポリペプチドが異なるヒト C T 抗原を含む。他の態様において、前記医薬製剤はまた、単離された核酸分子と作動可能に連結されたプロモーターを有する発現ベクターをさらに

含む。また、他の態様においては、前記医薬製剤はまた、単離された核酸分子を組換え的に発現する宿主細胞をさらに含む。

【0027】

本発明のさらなる側面においては、さらなる医薬組成物を提供する。該組成物は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子によってコードされるポリペプチドを含む単離ポリペプチドおよび薬学的に許容し得る担体を含む。ある態様においては、単離された核酸分子は、2つの異なるポリペプチドを含む単離された核酸分子を含み、各ポリペプチドは異なるヒトCT抗原を含む。また、他の態様においては、前記医薬組成物はまたアジュバントを含む。

【0028】

さらに、本発明の別の側面では、タンパク質マイクロアレイを提供する。タンパク質マイクロアレイは、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子によってコードされる少なくとも1つのポリペプチド、または少なくとも1つのポリペプチドの抗原断片を含む。好ましい態様においては、少なくとも1つのポリペプチドは、配列番号19、21、23、47、49および50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0029】

また、本発明の別の側面では、タンパク質マイクロアレイを提供する。タンパク質マイクロアレイは、配列番号24、26、28および30からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子によってコードされる少なくとも1つのポリペプチド、または少なくとも1つのポリペプチドの抗原断片を含む。好ましくは、少なくとも1つのポリペプチドは、配列番号25、27、29および31からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0030】

本発明の別の側面では、さらなるタンパク質マイクロアレイを提供する。該マイクロアレイは、配列番号32、34、36、38、40および51からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子によってコードされる少なくとも1つのポリペプチド、または少なくとも1つのポリペプチドの抗原断片を含む。好ましくは、少なくとも1つのポリペプチドは、配列番号33、35、37、39、41および52からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0031】

本発明の別の側面においては、(i)配列番号18、20、22、46および48、(ii)24、26、28および30または(iii)32、34、36、38、40および51からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する、複数の抗体またはその抗原結合断片、或いは前記ポリペプチドの抗原断片を含む、マイクロアレイを提供する。好ましくは、該ポリペプチドは、(i)配列番号19、21、23、47、49(ii)配列番号25、27、29および31または(iii)配列番号33、35、37、39、41および52からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。

【0032】

さらに、本発明の別の側面では、(i)配列番号18、20、22、46および48、(ii)24、26、28および30または(iii)32、34、36、38、40および51からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子、または生物学的試料において、その相補体を選択的にハイブリダイズする少なくとも20ヌクレオチドのその断片を含む、核酸マイクロアレイを提供する。

【0033】

また、本発明の他の側面では、HLA分子またはヒト抗体に結合する単離ヒトCT抗原またはその一部を提供する。前記ヒトCT抗原は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる。いくつかの態様において、断片はHLAとの複合体の一部である。好ましくは、断片は、8

10

20

30

40

50

～12アミノ酸長である。

【0034】

本発明のさらに別の側面では、1つまたは2つ以上のヒトCT抗原の発現の存在を検出するためのキットを提供する。該キットは、各々の単離された核酸分子が、(a) 配列番号18、20、22、46または48のいずれかのヌクレオチド配列の12～32ヌクレオチドコンティグセグメント (contig segment) および (b) (a) の相補体からなる群から選択される核酸分子から本質的になる、2または3対以上の単離された核酸を含み、ここで、コンティグセグメントが非重複性であり、各対の核酸分子は、ヒトCT抗原に特異的である。ある態様において、単離された核酸分子の対が構築され、配置されて、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択される単離された核酸分子の少なくとも断片を選択的に増幅する。 10

【0035】

また、本発明のさらなる側面では、ヒトCT抗原の発現により特徴づけられる癌を有する対象の処置方法を提供する。該方法は、疾患を改善するのに効果的な量の、HLA分子およびヒトCT抗原の複合体の存在を対象中で選択的に豊富化する剤を対象に投与することを含む。ヒトCT抗原ペプチドは、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるヒトCT抗原の断片である。ある態様において、癌は、複数のヒトCT抗原の発現により特徴づけられ、剤が、その各々がHLA分子および異なるヒトCT抗原の複合体の存在を対象中で選択的に豊富化する複数の剤であり、ヒトCT抗原の少なくとも1つが、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる。他の態様において、剤は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされる単離ポリペプチドである。 20

【0036】

さらに、本発明の別の側面では、対象の細胞のヒトCT抗原の発現により特徴づけられる癌を有する対象の処置方法を提供する。該方法は、(i) 対象から免疫反応性細胞含有試料を取り出すこと、(ii) ヒトCT抗原の断片であるヒトCT抗原に対する細胞溶解性T細胞の産生に好都合な条件下で宿主細胞に免疫反応性細胞含有試料を接触させること、(iii) ヒトCT抗原を発現する細胞を溶解するのに有効な量で対象に細胞溶解性T細胞を導入すること、を含む。これらの方法においては、宿主細胞がプロモーターと作動可能に連結された単離された核酸分子を含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされ、単離された核酸分子は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。前記方法の他の態様においては、宿主細胞が、ヒトCT抗原と結合するHLA分子を内生的に発現する。 30

【0037】

さらに、本発明の別の側面においては、対象の細胞中のヒトCT抗原の発現により特徴づけられる癌を有する対象の処置方法を提供する。(i) 癌細胞により発現される核酸分子を同定することであって、ここで、核酸分子は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、(ii) (a) 同定された核酸分子、(b) ヒトCT抗原をコードするセグメントを含有する同定された核酸の断片、(c) (a) または (b) の縮重からなる群から選択される核酸で宿主細胞をトランスフェクトすること、(iii) トランスフェクトした宿主細胞を培養して、トランスフェクトした核酸分子を発現させること、および (iv) 該状態に関連する対象の細胞に対する免疫応答を増大するのに有効な量の宿主細胞またはその抽出物を対象に導入すること、を含む。 40

【0038】

ある態様において、前記方法は、核酸分子の発現産物の一部分を提示するMHC分子を同定することを含み、ここで、宿主細胞は、同定されたものと同じのMHC分子を発現し、および宿主細胞は、核酸分子の発現産物のMHC結合部分を提示する。他の態様において 50

、免疫応答は、B細胞応答またはT細胞応答を含む。好ましくは、応答は、核酸分子の発現産物の一部を提示する宿主細胞またはヒトC T抗原を発現する対象の細胞に特異的な細胞溶解性T細胞の生成を含むT細胞応答である、

【0039】

いくつかの態様において、核酸分子は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択される。さらに、他の態様においては、該方法はまた、宿主細胞を処理してそれらを非増殖性にさせることを含む。

【0040】

また、本発明の別の側面においては、精巣以外の細胞または組織中の配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を処置し、または診断し、またはモニタリングするための方法を提供する。該方法は、タンパク質またはそれに由来するペプチドと特異的に結合する抗体であって、治療的または診断的に有用な剤に結合される抗体を、該状態を治療、診断またはモニタリングするのに有効な量で対象に投与すること、を含む。

10

【0041】

いくつかの態様において、抗体は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片である。好ましくは、モノクローナル抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体である。

【0042】

本発明の別の側面においては、精巣以外の細胞または組織中の配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を処置するための方法を提供する。該方法は、対象における状態を防止し、その発症を遅延し、または抑制するのに有効な量で、1つまたは2つ以上の前記医薬組成物を投与することを含む。いくつかの態様において、該方法はまた、精巣でない組織内で異常量のタンパク質を対象が発現することを最初に同定することを含む。

20

【0043】

本発明の別の側面では、精巣以外の細胞または組織中の配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を処置するための方法を提供する。該方法は、(i) 異常量のタンパク質を発現する細胞を対象から同定すること、(ii) 前記細胞の試料を単離すること、(iii) 前記細胞を培養すること、および(iv) 前記細胞に対する免疫応答を惹起するのに有効な量で対象に前記細胞を導入すること、を含む。ある態様において、該方法はまた、対象にそれらを導入する前に前記細胞を非増殖性にすることを含む。

30

【0044】

本発明の別の側面では、精巣以外の細胞または組織中の配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる病理学的細胞症状の治療方法を提供する。該方法は、それを必要とする対象に、タンパク質の発現または活性を抑制する有効量の剤を投与することを含む。いくつかの態様において、剤は、タンパク質と選択的に結合する抑制抗体であり、ここで、抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。他の態様においては、タンパク質をコードする核酸分子と選択的に結合するアンチセンス核酸分子である。

40

【0045】

また、本発明のさらなる側面では、配列番号19、21、23、47、49および50からなる群から選択されるアミノ酸を含む複数のタンパク質に対する免疫応答を刺激するのに有用な物質の組成物を提供する。該組成物は、タンパク質の断片である複数のペプチドを含み、ここで、該ペプチドは、精巣によるものではない細胞の表面に提示される1つまたは2つ以上のMHC分子と結合する。該組成物のある態様においては、複数のペプチド

50

の少なくとも一部分がMHC分子と結合し、それに対する細胞溶解性応答を引き出す。他の態様においては、タンパク質は、配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択ヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされる。好ましくは、該組成物は、アジュバントをさらに含む。好ましいアジュバントは、サポニン、GM-CSF、インターロイキンおよび免疫増強性オリゴヌクレオチドである。

【0046】

本発明の別の側面では、(i)配列番号19、21、23、47、49および50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質の断片であるペプチド、および(ii)ペプチドと結合して複合体を形成するMHC分子の複合体と選択的に結合する単離された抗体を提供し、ここで(i)または(ii)単独とは結合しない。好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはそれらの抗原結合断片である。

10

【0047】

本発明のさらなる側面では、精巣以外の細胞または組織中の配列番号18、20、22、46および48からなる群から選択ヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされるタンパク質の発現により特徴づけられる癌を有する対象を、処置、診断またはモニタリングするための方法を提供する。該方法は、該状態を処置、診断またはモニタリングするのに効果的な量で、前記抗体を、対象に投与することを含む。好ましくは、抗体は、1つまたは2つ以上の治療的または診断的に有用な剤と結合する。

【0048】

本発明はまた、医薬の調製における遺伝子、遺伝子産物、それらの断片、それらと結合する剤等の使用も含む。好ましくは、医薬は、癌の処置に関するものである。

20

【0049】

これらおよびその他の側面は、以下の発明の詳細な説明に沿って、さらに詳しく記載される。

【0050】

発明の詳細な説明

T細胞のエピトープクローニングおよびSEREX分析の結果、癌・精巣(CT)抗原の成長数が決定した。表1およびその中の引用文献を参照されたい。推定の癌・精巣抗原をコードする同定された14の遺伝子または遺伝子ファミリーが存在する。

【0051】

30

【表1】

表1 癌・精巣 (CT) 抗原

CT*	システム	遺伝子数	染色体上の位置	検出システム**	文献番号
1	MAGE	16	Xq28/Xp21	T, Ab	7, 10, 12, 13
2	BAGE	2	Unknown	T	14
3	GAGE	9	Xp11	T	15, 16
4	SSX	>5	Xp11	Ab	10, 17
5	NY-ESO-1	2	Xq28	Ab, T, RDA	18, 19
	LAGE-1				
6	SCP-1	3	1p12-p13	Ab	20
7	CT7/MAGE-C1	1	Xq26	Ab, RDA	21, 22
8	CT8	1	Unknown	Ab	23
9	CT9	1	1p	Ab	24
10	CT10/MAGE-C2	1	Xq27	RDA, Ab	25, 26
11	CT11p	1	Xq26-Xq27	***	27
12	SAGE	1	Xq28	RDA	28
13	cTAGE-1	1	18p11	Ab	29
14	OY-TES-1	2	12p12-p13	Ab	30

*OldおよびChenにより提案されたCT命名法による番号

**Ab=抗体、T=CD8⁺T細胞、RDA=発現差解析法

***親と転移性メラノーマ細胞変異体における異なるmRNA発現により決定

10

20

30

40

50

【0052】

これら遺伝子分析を通して、以下の特性を有する産物をコードすることが明らかになる。

i) 正常組織のmRNA発現は、精巣、胎児性の卵巣および胎盤に限定され、成熟した卵巣においては、ほとんどまたは全く検出されない。

ii) 種々の源の癌におけるmRNA発現は、一般的であり、複数の異なる癌種、例えば、メラノーマ、膀胱癌、肉腫の30～40%が、1つまたは2つ以上のCT抗原を発現する。

iii) X染色体は、CT抗原の大部分をコードするが、最近定義されたCTコード遺伝子の大部分は、非X染色体座を有する。

iv) 正常な成熟した卵巣においては、CT抗原の発現は、本質的に、未熟な生殖細胞、例えば、精原細胞(31)に制限される。しかしながら、最近定義されたCT抗原、OY-TES-1は、明らかに精子の成熟の後期段階に含まれる(下記を参照)。胎児性の卵巣においては、未熟な生殖細胞(卵原細胞/一次卵母細胞)は、CT抗原を発現するが、増殖していない原始卵胞の卵母細胞は発現しない(32)。胎児性の胎盤においては、細胞栄養芽層および合体体層は共にCT抗原を発現するが、満期(term)の胎盤においては、CT抗原発現は、ほとんどまたは全く見られない(33)。

【0053】

v) CT抗原発現の高可変パターンは、一般的に同質的な発現パターンを有する他の腫瘍に対する唯一の単一陽性細胞陽性または陽性細胞の小さなクラスターを示す腫瘍とは異なる癌において確認された(31、34)。

vi) 調整遺伝子発現におけるいくつかの役割は明らかになっているが、多くのCT抗原の機能は知られていない。しかしながら、2つのCT抗原は、配偶子の発達-SCP-1(シナプトネマ構造タンパク質)において役割を有し、減数分裂における染色体還元に関与し(35)、OY-TES-1は、精子頭部(sperm head)のアクロソームのアクロシンのパッケージングに関与すると考えられるプロアクロシン結合タンパク質sp32前駆体である(36)。

vii) CT発現は、腫瘍発達および悪性の可能性が高い腫瘍と相関することの証拠となる。例えば、高頻度のMAGE mRNA発現は、転移性と原発性メラノーマ(37)お

よび侵略性と表在性膀胱癌（38）および膀胱癌のNY-ESO-1発現は、核異型度と相関する（39）。

vii) 異なるCT抗原の固有の免疫原性の多数の変化は、抗原陽性腫瘍を有する患者の特異的なCD8⁺ T細胞そして抗体応答により示される。今日まで、NY-ESO-1は、任意のCT抗原の最も強い自発的な免疫原性を有し、例えば、進行したNY-ESO-1⁺腫瘍を有する患者の50%までは、NY-ESO-1に対する体液性および細胞性免疫を発達させる（40、41）。

【0054】

これらの特性は、診断剤および治療剤における使用に癌・精巣抗原が望ましいことを示す。これらの特性はまた、さらなる癌・精巣抗原の同定の基礎を提供する。

10

【0055】

他に、公的なデータベースにおいて、バイオインフォマティクス技術の使用により、癌関連配列の同定がなされた（例えば、データベースマイニングおよび蛍光-PCR発現による迅速スクリーニング：Loging et al., Genome Res 10 (9): 1393-402, 2000）が、これら技術は、好ましい癌・精巣抗原をプロファイルする核酸配列の同定を中心とするものではなかった。特に、本発明は、一層厳格な基準により癌・精巣配列の同定を含む。癌・精巣抗原配列のためのデータベース分析基準は、配列が、少なくとも2つの異なる組織による癌に発現されることを必要とし、そして好ましくは、少なくとも3つの異なる組織による癌に発現される。さらに、該配列は、好ましくは、精巣、胎盤および卵巣（好ましくは、胎児の卵巣のみ）からなる群から選択される1つまたは2つ以上の組織に制限される正

20

【0056】

上記の概要および以下の説明において、配列のリストが提供される。リストは、各々の単一配列を別々に、2つまたはそれ以上の配列が同一遺伝子の一部を形成する場合にはそれらを一緒に、各々及びすべての組合せが別々にかつ特定の列挙されるかのように、リスト上の総数を含めてその数までの異なる遺伝子に関連がある2つまたはそれ以上の配列の任意の組合せを含むよう意図される。同様に、断片サイズを記述する場合、各々及びすべての断片長が特定の列挙されるかのように意図される配列（それが断片であるよう1ヌクレオチドまたはアミノ酸より小さい）の言及した最小断片から全長までを一範囲が含むよう意図される。したがって、断片が長さ10～15であり得る場合、それは長さ10、

30

【0057】

要約および特許請求の範囲は、抗原前駆体および抗原を記述する。概要および特許請求の範囲で用いる場合、前駆体は、単離DNAのコード領域によりコードされる実質的に全長のタンパク質であり、抗原は、MHC、好ましくはHLAと複合体をなし、その複合体の一部として免疫応答に関与するペプチドである。このような抗原は、典型的には9アミノ酸長であるが、これはわずかに変わり得る。

【0058】

本明細書中で用いる場合、対象は、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたは齧歯類である。全実施態様において、現在同定された癌関連抗原と同一の実質的なヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列を有するヒト癌抗原およびヒト対象が好ましい。

40

【0059】

一側面において、本発明は、癌および正常細胞に独占的に発現された転写産物に対するデータベースマイニング（例えば、ユニジーン）によりヒトCT遺伝子産物の同定を含む。続く、候補転写産物のmRNA発現分析により高く制限されたmRNA発現パターンを有するいくつかの遺伝子産物を同定し、これらのいくつかはCT抗原として分類された。本明細書に記載の方法により同定されたCT抗原遺伝子を表す配列は、添付の配列表に示される。本発明の他の側面は、癌を有する対象の自己由来の抗血清を用いるヒトCT抗原の同定を含む。癌患者の免疫システムにより認識されるCT抗原をコードする配列の性質は

50

、当然ながら、予期することはできない。

【0060】

したがって、本発明の一側面においては、C T 抗原ポリペプチド、それらポリペプチドをコードする遺伝子、機能的な修飾および前記の変異体、前記の有用な断片並びにそれらに関する診断剤および治療剤を含む。

【0061】

本発明のC T 抗原核酸のホモログおよびアレレは、実施例で用いられる技術を含む慣用的な方法により同定することができる。したがって、本発明の一側面は、それらC T 抗原前駆体をコードする核酸配列である。

【0062】

「ストリンジェントな条件」という用語は、本明細書中で用いる場合、当分野において精通されているパラメータを指す。核酸ハイブリダイゼーションパラメータは、このような方法を編集する参考文献、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989またはCurrent Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに見出され得る。特に、ストリンジェントな条件は、本明細書中で用いる場合、例えば、ハイブリダイゼーション緩衝液（3.5 x SSC、0.02%フィコール、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5mMの NaH_2PO_4 （pH 7）、0.5%SDS、2mMのEDTA）中での65℃でのハイブリダイゼーションを指す。SSCは、0.15Mの塩化ナトリウム／0.15Mのクエン酸ナトリウム、pH 7であり、SDSはドデシル硫酸ナトリウムであり、EDTAはエチレンジアミン四酢酸である。ハイブリダイゼーション後、DNAが転移された膜を、例えば2 x SSC中で室温で洗浄し、次に0.1～0.5 x SSC／0.1 x SDS中で68℃までの温度で洗浄する。

【0063】

使用できる、同程度のストリンジェンシーを生じるその他の条件、試薬などが存在する。当業者はこのような条件に精通しており、したがって、それらはここでは示されない。しかしながら、当業者は、本発明の癌関連抗原核酸の相同体および対立遺伝子の明白な同定を可能にするような方法で（例えば、より低いストリンジェントな条件を用いて）条件を操作し得る、と理解されるであろう。当業者は、このような分子の発現のための細胞およびライブラリーをスクリーニングし、次にルーチンに単離した後、関連する核酸分子を単離し、そしてシーケンシングするための方法にも精通している。

【0064】

概して、相同体および対立遺伝子は、典型的にはそれぞれ、癌関連抗原核酸およびポリペプチドの配列と少なくとも75%のヌクレオチド同一性および／または少なくとも90%のアミノ酸同一性を共有し、いくつかの場合には、少なくとも90%のヌクレオチド同一性および／または少なくとも95%のアミノ酸同一性を共有し、そしてさらに他の場合には、少なくとも95%のヌクレオチド同一性および／または少なくとも99%のアミノ酸同一性を共有するであろう。相同性は、インターネット（ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/）を介して得られるNCBI（Bethesda, Maryland）により開発された種々の公的に利用可能なソフトウェアツールを用いて算定され得る。ツールの例としては、デフォルト設定を用いて、http://www.ncbi.nlm.nih.govにて利用可能なBLASTシステムが挙げられる。Pairwise and ClustalWアラインメント（BLOSUM30マトリックス設定）ならびにKyte-Doolittle水治療法分析は、Mac Vector配列分析ソフトウェア（Oxford Molecular Group）を用いて得られる。前記の核酸のワトソン－クリック相補体も本発明に包含される。

【0065】

癌関連抗原遺伝子に関するスクリーニングにおいて、サザンブロットは、放射性プローブとともに前記の条件を用いて実施され得る。DNAが最終的に転移された膜を洗浄後、その膜は、放射性シグナルを検出するためにX線フィルムに接触するように置かれる。癌関連抗原核酸の発現に関するスクリーニングにおいて、前記の条件を用いるノーザンブロッ

10

20

30

40

50

トハイブリダイゼーションは、癌患者から、または癌関連抗原遺伝子の発現により特徴づけられる症状を有する疑いのある対象から採取された試料に対して実施され得る。示された配列とハイブリダイズするプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応のような増幅プロトコルも、癌関連抗原遺伝子またはその発現の検出のために用いられ得る。

【0066】

本発明は、ネイティブ物質中に存在するものに対する代替的コドンを含む縮重核酸も含む。例えば、セリン残基は、コドンTCA、AGT、TCC、TCG、TCTおよびAGCによりコードされる。6つのコドンの各々は、セリン残基をコードする目的に関して等価である。したがって、延長癌関連抗原ポリペプチドにin vitroまたはin vivoでセリン残基を組み入れるようセリンコードヌクレオチドトリプレットのいずれかを、タンパク質合成装置を指図するために用いることができる、ということは当業者には明らかである。同様に、他のアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列トリプレットとしては、CCA、CCC、CCGおよびCCT（プロリンコドン）；CGA、CGC、CGG、CGT、AGAおよびAGG（アルギニンコドン）；ACA、ACC、ACGおよびACT（トレオニンコドン）；AACおよびAAT（アスパラギンコドン）；ならびにATA、ATCおよびATT（イソロイシンコドン）が挙げられるが、これらに限定されない。その他のアミノ酸残基は、多重ヌクレオチド配列により同様にコードされる。したがって、本発明は、遺伝暗号の縮重のためにコドン配列中の生物学的単離された核酸とは異なる縮重核酸を含む。

【0067】

本発明は、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの付加、置換および欠失を含む修飾核酸分子も提供する。好ましい実施態様では、これらの修飾核酸分子および／またはそれらがコードするポリペプチドは、非修飾核酸分子および／またはポリペプチドの少なくとも1つの活性または機能、例えば抗原性、酵素活性、受容体結合、MHCクラスIおよびクラスII分子によるペプチドの結合による複合体の形成等を保持する。ある種の実施態様では、修飾核酸分子は、修飾ポリペプチド、好ましくは本明細書中に別記されているような保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする。修飾核酸分子は、非修飾核酸分子と構造的に関連があり、好ましい実施態様では、修飾および非修飾核酸分子が当業者に既知のストリンジェントな条件下でハイブリダイズするよう、非修飾核酸分子と十分に構造的に関連がある。

【0068】

例えば、単一のアミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする修飾核酸分子を調製することができる。これらの核酸分子は各々、本明細書中に記載するような遺伝暗号の縮重に対応するヌクレオチド変化と相容れない1、2または3つのヌクレオチド置換を有し得る。同様に、2つのアミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする修飾核酸分子を調製することができるが、これらは例えば2～6のヌクレオチド変化を有する。例えばアミノ酸2および3、2および4、2および5、2および6等をコードするコドンのヌクレオチドの置換を含めたこれらと同様の多数の修飾核酸分子が当業者により容易に想像される。上記の例では、2つのアミノ酸の各組合せは、修飾核酸分子組に、ならびにアミノ酸置換をコードするすべてのヌクレオチド置換に含まれる。当業者に容易に想像されるように、さらなる置換（即ち、3またはそれ以上）、付加または欠失（例えば、停止コドンまたはスプライス部位（単数または複数）の導入による）を有するポリペプチドをコードする付加的核酸分子も調製することができるし、本発明に包含される。上記の核酸またはポリペプチドはいずれも、本明細書中に開示される核酸および／またはポリペプチドに対する構造的関連または活性の保持に関して、ルーチン実験により試験することができる。

【0069】

本発明は、CT抗原核酸配列またはその相補体の単離断片、好ましくは非反復断片も提供する。非反復断片は、大型核酸に関する「特徴」である断片である。それは、例えば、上記のCT抗原核酸外のヒトゲノム（およびヒト対立遺伝子）内の分子中にその正確な配列が見出されないことを保証するのに十分な長さである。当業者は、断片がヒトゲノム内で

非反復(unique)であるか否かを決定するためにルーチン手法を適用することができ、例えば、ヒトゲノムの他の配列から対象の配列断片を選択的に区別するための、公的に利用することができる配列比較ソフトウェアを用いることができるが、in vitroにおける確認ハイブリダイゼーションおよびシーケンシング分析も実施できる。

【0070】

断片、好ましくは非反復断片は、このような核酸を同定するために、サザンおよびノーザンブロット検定におけるプローブとして用いることができ、あるいはPCRを用いる検定のような増幅検定に用いることができる。当業者には既知のように、大型プローブ、例えば200、250、300またはそれ以上のヌクレオチドが、ある種の用途、例えばサザンおよびノーザンブロットには好ましいが、一方、小型断片は、PCRのような用途のために好ましい。断片は、抗体を生成するか、またはポリペプチド断片の結合を決定するために、あるいはイムノ検定構成成分を生成するために融合タンパク質を産生するためにも用いることができる。同様に、断片は、例えば抗体の調製に、およびイムノ検定に有用なCT抗原ポリペプチドの非融合断片を産生するために用いることができる。断片はさらに、特に以下でより詳細に記載されるような治療目的のために、CT抗原核酸およびポリペプチドの発現を抑制するためのアンチセンス分子として用いることができる。

10

【0071】

上記のように、本開示は、第1ヌクレオチドから開始して、第2ヌクレオチドと、最後の8ヌクレオチドまでの長さで、各配列に関して第8、9、10から最後のヌクレオチドまで、あらゆる場所で終わる、各配列の各々のおよびすべての断片を含むよう意図する。好ましい断片は増幅プライマーとして有用なもの、例えば、塩基長が、典型的には12~32ヌクレオチド間（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31および32）のものである。

20

【0072】

当業者は、典型的に必要なすべてである既知のデータベース上の配列に対する断片のヒトゲノム中の他の配列から、当該配列を選択的に区別する非反復断片の能力に典型的に基づいて、かかる配列を選択する方法によく精通しているが、in vitro確認ハイブリダイゼーションおよびシーケンシング分析を実施しても良い。

【0073】

特に好ましい核酸分子としては、「ポリトープ」として既知の一連のエピトープをコードする核酸が挙げられる。エピトープは、天然フランキング配列を用いて、または用いずに、シーケンシャルまたはオーバーラップ方式で整列することができる（例えば、Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15:1280-1284, 1997を参照）し、所望により、非関連リンカー配列により分離することができる。ポリトープは、免疫応答の発生のための免疫系により認識される個々のエピトープを生成するようプロセッシングされる。

30

【0074】

したがって、例えば本明細書中に開示された核酸の1つによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド由来のペプチドであって、MHC分子により提示され、CTLまたはTヘルパーリンパ球により認識されるペプチドは、1つまたはそれ以上のその他のCT抗原からのペプチドと併合されて（例えば、ハイブリッド核酸またはポリペプチドの調製により）、「ポリトープ」を形成し得る。2つまたは3つ以上のペプチド（またはペプチドをコードする核酸）は、本明細書中に記載されたものから選択され得るか、あるいはそれらは、従来から知られているCT抗原の1つまたは2つ以上のペプチドを含み得る。免疫応答を誘導または強化するために投与することができる癌関連ペプチド抗原の例は、腫瘍関連遺伝子およびコードされたタンパク質、例えばMAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GA

40

50

G E - 6、G A G E - 7、G A G E - 8、B A G E - 1、R A G E - 1、L B 3 3 / M U M - 1、P R A M E、N A G、M A G E - B 2、M A G E - B 3、M A G E - B 4、チロシナーゼ、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、メラニン-A、M A G E - C 1、M A G E - C 2、M A G E - C 3、M A G E - C 4、M A G E - C 5、N Y E S O - 1、L A G E - 1、S S X - 1、S S X - 2 (H O M - M E L - 4 0)、S S X - 4、S S X - 5、S C P - 1 および C T - 7 から得られる (例えば、P C T 出願公開第 W O 9 6 / 1 0 5 7 7 号を参照)。その他の例は、当業者に既知であり、本明細書に開示されたような同様の方式で本発明に用いることができる。H L A クラス I および H L A クラス I I 結合ペプチドの他の例は、当業者に既知であるであろう。

【 0 0 7 5 】

10

例えば、以下の文献を参照することができる：

【 表 2 】

Coulie, *Stem Cells* 13:393-403, 1995; Traversari et al., *J. Exp. Med.* 176:1453-1457, 1992; Chaux et al., *J. Immunol.* 163:2928-2936, 1999; Fujie et al., *Int. J. Cancer* 80:169-172, 1999; Tanzarella et al., *Cancer Res.* 59:2668-2674, 1999; van der Bruggen et al., *Eur. J. Immunol.* 24:2134-2140, 1994; Chaux et al., *J. Exp. Med.* 189:767-778, 1999; Kawashima et al., *Hum. Immunol.* 59:1-14, 1998; Tahara et al., *Clin. Cancer Res.* 5:2236-2241, 1999; Gaugler et al., *J. Exp. Med.* 179:921-930, 1994; van der Bruggen et al., *Eur. J. Immunol.* 24:3038-3043, 1994; Tanaka et al., *Cancer Res.* 57:4465-4468, 1997; Oiso et al., *Int. J. Cancer* 81:387-394, 1999; Herman et al., *Immunogenetics* 43:377-383, 1996; Manici et al., *J. Exp. Med.* 189:871-876, 1999; Duffour et al., *Eur. J. Immunol.* 29:3329-3337, 1999; Zorn et al., *Eur. J. Immunol.* 29:602-607, 1999; Huang et al., *J. Immunol.* 162:6849-6854, 1999; Boël et al., *Immunity* 2:167-175, 1995; Van den Eynde et al., *J. Exp. Med.* 182:689-698, 1995; De Backer et al., *Cancer Res.* 59:3157-3165, 1999; Jäger et al., *J. Exp. Med.* 187:265-270, 1998; Wang et al., *J. Immunol.* 161:3596-3606, 1998; Aarnoudse et al., *Int. J. Cancer* 82:442-448, 1999; Guilloux et al., *J. Exp. Med.* 183:1173-1183, 1996; Lupetti et al., *J. Exp. Med.* 188:1005-1016, 1998; Wölfel et al., *Eur. J. Immunol.* 24:759-764, 1994; Skipper et al., *J. Exp. Med.* 183:527-534, 1996; Kang et al., *J. Immunol.* 155:1343-1348, 1995; Morel et al., *Int. J. Cancer* 83:755-759, 1999; Brichard et al., *Eur. J. Immunol.* 26:224-230, 1996; Kittlesen et al., *J. Immunol.* 160:2099-2106, 1998; Kawakami et al., *J. Immunol.* 161:6985-6992, 1998; Topalian et al., *J. Exp. Med.* 183:1965-1971, 1996; Kobayashi et al., *Cancer Research* 58:296-301, 1998; Kawakami et al., *J. Immunol.* 154:3961-3968, 1995; Tsai et al., *J. Immunol.* 158:1796-1802, 1997; Cox et al., *Science* 264:716-719, 1994; Kawakami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6458-6462, 1994; Skipper et al., *J. Immunol.* 157:5027-5033, 1996; Robbins et al., *J. Immunol.* 159:303-308, 1997; Castelli et al., *J. Immunol.* 162:1739-1748, 1999; Kawakami et al., *J. Exp. Med.* 180:347-352, 1994; Castelli et al., *J. Exp. Med.* 181:363-368, 1995; Schneider et al., *Int. J. Cancer* 75:451-458, 1998; Wang et al., *J. Exp. Med.* 183:1131-1140, 1996; Wang et al., *J. Exp. Med.* 184:2207-2216, 1996; Parkhurst et al., *Cancer Research* 58:4895-4901, 1998; Tsang et al., *J. Natl Cancer Inst* 87:982-990, 1995; Correale et al., *J Natl Cancer Inst* 89:293-300, 1997; Coulie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7976-7980, 1995; Wölfel et al., *Science* 269:1281-1284, 1995; Robbins et al., *J. Exp. Med.* 183:1185-1192, 1996; Brändle et al., *J. Exp. Med.* 183:2501-2508, 1996; ten Bosch et al., *Blood* 88:3522-3527, 1996; Mandruzzato et al., *J. Exp. Med.* 186:785-793, 1997; Guéguen et al., *J. Immunol.* 160:6188-6194, 1998; Gjertsen et al., *Int. J. Cancer* 72:784-790, 1997; Gaudin et al., *J. Immunol.* 162:1730-1738, 1999; Chiari et al., *Cancer Res.* 59:5785-5792, 1999; Hogan et al., *Cancer Res.* 58:5144-5150, 1998; Pieper et al., *J. Exp. Med.* 189:757-765, 1999; Wang et al., *Science* 284:1351-1354, 1999; Fisk et al., *J. Exp. Med.* 181:2109-2117, 1995; Brossart et al., *Cancer Res.* 58:732-736, 1998; Röpke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14704-14707, 1996; Ikeda et al., *Immunity* 6:199-208, 1997; Ronsin et al., *J. Immunol.* 163:483-490, 1999; Vonderheide et al., *Immunity* 10:673-679, 1999.

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

当業者は、1つまたは2つ以上のCT抗原ペプチドおよび1つまたは2つ以上の上記の癌

関連ペプチドを含むポリペプチド、あるいはこのようなポリペプチドをコードする核酸を、分子生物学の標準手法にしたがって、調製することができる。

【0077】

したがって、ポリトープは、種々の配列で（例えば連鎖状、オーバーラッピング）ともに接合することができる2つまたはそれ以上の潜在性免疫原性または免疫応答刺激性ペプチドの群である。ポリトープ（またはポリトープをコードする核酸）は、免疫応答を刺激し、強化し、および／または惹起する場合のポリトープの有効性を試験するために、標準免疫処置プロトコルで、例えば動物に投与することができる。

【0078】

ペプチドは、直接的に、またはフランキング配列の使用を介して、ともに接合されポリトープを形成することができる。ワクチンとしてのポリトープの使用は当分野で周知である（例えば、Thomson et al., Proc. Acad. Natl. Acad. Sci. USA 92 (13) :5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15 (12) :1280-1284, 1997; Thomson et al., J. Immunol. 157 (2) :822-826, 1996; Tam et al., J. Exp. Med. 171 (1) :299-306, 1990を参照）。例えば、Tamは、MHCクラスIおよびクラスII結合エピトープの両方からなるポリトープがマウスモデルにおいて抗体および防御免疫を首尾よく生成することを示した。Tamは、エピトープの「列」を含むポリトープがプロセッシングされて、MHC分子により提示されCTLにより認識される個々のエピトープを産生することも実証した。したがって、種々の数および組合せのエピトープを含有するポリトープが調製され、CTLによる認識に関して、および免疫応答を増大する効力に関して試験することができる。

10

20

【0079】

腫瘍は一組の腫瘍抗原を発現し、そのうちのある種のサブセットのみが任意の所与の患者の腫瘍で発現され得ることが知られている。特定の患者に発現される腫瘍拒絶抗原のサブセットを示すエピトープの異なる組合せに対応するポリトープを調製することができる。ポリトープは、腫瘍型により発現されることが知られているより広範囲の腫瘍拒絶抗原を反映するよう調製することができる。ポリトープは、ポリペプチド構造物として、または当分野で既知の核酸送達系の使用を介して、かかる処置を必要とする患者に導入することができる（例えば、Allsopp et al., Eur. J. Immunol. 26 (8) :1951-1959, 1996を参照）。アデノウイルス、ポックスウイルス、Ty-ウイルス様粒子、アデノ関連ウイルス、プラスミド、細菌等を、このような送達に用いることができる。ポリトープ送達系の効力を決定するために、マウスモデルにおいて該送達系を試験し得る。この系は、ヒト臨床試験においても試験することができる。

30

【0080】

HLAクラスI分子がCT抗原から得られる腫瘍拒絶抗原を提示する場合、発現ベクターは、これらの核酸およびポリペプチドに由来する任意の特定の腫瘍拒絶抗原を提示するMHC分子をコードする核酸配列も含み得る。あるいは、このようなMHC分子をコードする核酸分子は、別個の発現ベクター内に含入することができる。ベクターが両コード配列を含有する状況では、単一ベクターは、いずれか一方を正常に発現しない細胞をトランスフェクトするために用いることができる。CT抗原前駆体、およびそれを提示するMHC分子をコードする配列が別個の発現ベクターに含有される場合、発現ベクターは共トランスフェクトされ得る。CT抗原前駆体コード配列は、例えば宿主細胞がすでに前駆体分子由来のCT抗原を提示するMHC分子を発現している場合には、単独で用いることができる。当然ながら、用いることができる特定の宿主細胞に関して制限はない。2つのコード配列を含有するベクターは所望により任意の抗原提示細胞に用いることができるので、CT抗原前駆体に関する遺伝子は、CT抗原を提示するMHC分子を発現しない宿主細胞で用いることができる。さらに、無細胞転写系を、細胞の代わりに用いることができる。

40

【0081】

上述したように、本発明はCT抗原ポリペプチドをコードする核酸分子と選択的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、CT抗原の発現を減少させる。これは、CT

50

抗原の発現の減少が望ましい実質的にあらゆる医療状態において、例えば癌治療において望ましい。これはまた、1つまたはそれ以上のCT抗原の発現の減少の効果をin vitroまたはin vivoにて試験するのに有用である。

【0082】

本明細書中で用いる場合、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または「アンチセンス」という用語は、生理学的条件下で、特定の遺伝子を包含するDNAと、またはその遺伝子のmRNA転写体とハイブリダイズして、それによりその遺伝子の転写および／またはそのmRNAの翻訳を抑制するオリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、修飾オリゴリボヌクレオチドまたは修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドを表現する。アンチセンス分子は、標的遺伝子または転写体とのハイブリダイゼーション時に標的遺伝子の転写または翻訳を妨げるよう設計される。アンチセンスオリゴヌクレオチドの正確な長さおよびその標的とのその相補性の程度は、標的の配列、ならびにその配列を包含する特定の塩基を含めて、選択される特異的な標的に依存すると当業者は認識するであろう。生理学的条件下で標的と選択的に結合するよう、即ち、生理学的条件下で標的細胞中の他のいかなる配列とよりも実質的に多く、標的配列とハイブリダイズするように、アンチセンスオリゴヌクレオチドが構築され、配列されるのが好ましい。CT抗原をコードする核酸の配列を基礎にして、あるいは対立遺伝子または相同性ゲノムおよび／またはcDNA配列を基礎にして、当業者は、本発明にしたがって用いるための任意の多数の適切なアンチセンス分子を容易に選定し、合成し得る。

10

【0083】

抑制に対して十分に選択的で、かつ効力があるようにするために、このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的と相補的である少なくとも10、さらに好ましくは少なくとも15の連続した塩基を包含すべきであるが、場合によっては、7塩基長という短い修飾オリゴヌクレオチドがアンチセンスオリゴヌクレオチドとして首尾よく用いられている(Wagner et al., Nature Biotechnol. 14:840-844, 1996)。最も好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、20～30塩基の相補的配列を包含する。

20

【0084】

遺伝子またはmRNA転写体の任意の領域に対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドを選択してもよいが、好ましい実施態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドはN-末端または5'上流部位、例えば翻訳開始、転写開始またはプロモーター部位に対応する。さらに、3'-非翻訳領域を標的化してもよい。mRNAスプライシング部位に対する標的化も当分野で用いられてきたが、代替的mRNAスプライシングが起こる場合には、あまり好ましくないこともある。さらに、アンチセンスは、好ましくは、mRNA二次構造が予期されず(例えば、Sainio et al., Cell Mol. Neurobiol. 14(5):439-457, 1994を参照)、かつタンパク質が結合することが予期されない部位に対して標的化される。好適なアンチセンス分子は、CT抗原核酸に対応するオーバーラップオリゴヌクレオチドが合成され、発現を阻害する能力を試験し、センス転写産物の劣化の引き起こす「ジーンウォーク(gene walk)実験により同定することができる。最後に、列挙した配列はcDNA配列であるが、当業者は、CT抗原のcDNAに対応するゲノムDNAを容易に得る場合がある。したがって、本発明は、CT抗原をコードする核酸に対応するゲノムDNAと相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドも提供する。同様に、対立遺伝子cDNA、相同性cDNA(例えば、ヒト)およびゲノムDNAに対するアンチセンスは、過度の実験を伴わずに与えられる。

30

40

【0085】

一組の実施態様では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、「天然」デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはそれらの任意の組合せで構成することができる。即ち、天然系における場合と同様に、ホスホジエステルヌクレオシド間結合により、あるネイティブヌクレオチドの5'末端および別のネイティブヌクレオチドの3'末端は共有結合することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、手動で実行することができる、当分野で認識された方法により、または自動合成機により調製することができる。該オ

50

リゴヌクレオチドはまた、ベクターにより組換え的に生産することができる。

【0086】

しかしながら、好ましい実施態様では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、「修飾」オリゴヌクレオチドも含み得る。即ち、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがそれらの標的とハイブリダイズしないようにするが、それらの安定性または標的化を強化する、あるいはそうでなければそれらの治療的有効性を強化する多数の方法で修飾することができる。

【0087】

「修飾オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書中で用いられる場合、(1) そのヌクレオチドのうちの少なくとも2つが合成ヌクレオシド間結合（即ち、あるヌクレオチドの5'末端および別のヌクレオチドの3'末端間のホスホジエステル結合以外の結合）により共有結合され、および／または(2) 核酸と正常に連合されない化学基がオリゴヌクレオチドと共有結合されたオリゴヌクレオチドを記述する。好ましい合成ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロジチオエート、ホスフェートエステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホルアミデート、カルバメート、カルボネート、ホスフェートトリエステル、アセトアミデート、カルボキシメチルエステルおよびペプチドである。

【0088】

「修飾オリゴヌクレオチド」という用語は、共有的修飾塩基および／または糖を有するオリゴヌクレオチドも含む。例えば、修飾オリゴヌクレオチドは、3'位置のヒドロキシル基以外の、および5'位置のホスフェート基以外の低分子量有機基と共有結合される主鎖糖を有するオリゴヌクレオチドを含む。したがって、修飾オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキル化リボース基を含み得る。さらに、修飾オリゴヌクレオチドは、リボースの代わりにアラビノースのような糖を含み得る。例えば、C-5プロピン修飾塩基などの類似塩基もまた包含される(Nature Biotechnol. 14:840-844, 1996)。したがって本発明は、CT抗原ポリペプチドをコードする核酸と、相補的であり、かつ生理学的条件下で、それらとハイブリダイズすることができる修飾アンチセンス分子を、薬学的に許容し得る担体とともに含有する医薬製剤を意図する。

【0089】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬組成物の一部として投与することができる。かかる医薬組成物は、当業者に公知の標準的な生理学的および／または薬学的に許容し得る担体と組み合わせたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み得る。該組成物は、滅菌され、患者への投与において適切な重量または容量単位の治療的に有効な量のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有すべきである。「薬学的に許容し得る」という用語は、活性成分の生物学的活性の有効性を妨げない非毒性物質を意味する。「生理学的に許容し得る」という用語は、例えば、細胞、細胞培養、組織、生物体などの生物学的な系に適合する非毒性物質を意味する。該担体の特性は、投与経路に依存するであろう。生理学的および薬学的に許容し得る担体は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、防腐剤、可溶化剤およびさらに以下で記載される当業者に十分に既知の他の材料を含む。

【0090】

本明細書中で用いる場合、「ベクター」とは、異なる遺伝子環境間の輸送のための、または宿主細胞中での発現のための制限および連結により所望の配列を挿入することができる多数の核酸のいずれかであり得る。ベクターは、典型的にはDNAで構成されるが、RNAベクターも利用可能である。ベクターとしては、プラスミド、ファージミドおよびウイルスゲノムが挙げられるが、これらに限定されない。クローニングベクターは、宿主細胞中で自律的に複製可能であるか、またはゲノム中に組み込まれ得るものであって、かつ新規の組換えベクターが宿主細胞中で複製するその能力を保持するようにベクターが決定可能な様式で切断され、そしてこれに所望のDNA配列を連結することができる1つまたは2つ以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によりさらに特徴づけられるものである。プラスミドの場合、所望の配列の複製は、プラスミドが宿主細菌内でコピー数を増大する場合は

多数回起こるし、あるいは宿主が有糸分裂により繁殖する前には宿主当たり1回だけ起こり得る。ファージの場合は、複製は、溶菌期中は能動的に起こり、溶原期中は受動的に起こり得る。発現ベクターは、調節配列に作動可能に連結され、そしてRNA転写体として発現することができるように、所望のDNA配列を制限および連結により挿入することができるものである。ベクターは、細胞がベクターで形質転換またはトランスフェクトされていたかあるいはされていなかったかを同定する際に用いるのに適した1つまたはそれ以上のマーカー配列をさらに含有し得る。マーカーとしては、例えば、抗生物質またはその他の化合物に対する耐性または感受性を増大または低減するタンパク質をコードする遺伝子、その活性が当分野で既知の標準検定により検出可能である酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼまたはアルカリ性ホスファターゼ）をコードする遺伝子、ならびに形質転換したまたはトランスフェクトした細胞、宿主、コロニーまたはプラークの表現型に視覚的に作用する遺伝子（例えば、グリーン蛍光タンパク質）が挙げられる。好ましいベクターは、それらが作動可能に連結されているDNAセグメント中に存在する構造遺伝子産物の自律的複製および発現が可能なベクターである。

【0091】

本明細書中で用いる場合、コード配列および調節配列は、調節配列の影響または制御下にコード配列の発現または転写を置くような方法でそれらが共有結合される場合、「作動可能に (operably)」連結されると言われている。コード配列が機能性タンパク質に翻訳されるのが望ましい場合、5'調節配列中のプロモーターの誘導がコード配列の転写を生じ、二つのDNA配列間の結合の性質が(1)フレームシフト突然変異の導入を生じない、(2)コード配列の転写を指図するプロモーター領域の能力を妨げない、または(3)タンパク質に翻訳されるべき対応するRNA転写体の能力を妨げないならば、二つのDNA配列は作動可能に連結されると言われている。したがって、結果的に生じる転写体が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳することができるようにプロモーター領域がそのDNA配列の転写を実行可能であった場合には、プロモーター領域はコード配列と作動可能に連結されるであろう。

【0092】

遺伝子発現に必要とされる調節配列の的確な性質は種または細胞型間で変わり得るが、概して、必要な場合には、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列等のような、それぞれ転写および翻訳の開始に関与する5'非転写化および5'非翻訳化配列を含むであろう。特に、このような5'非転写調節配列は、作動可能に連結された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含むであろう。調節配列は、望ましい場合には、エンハンサー配列または上流アクチベーター配列も含み得る。本発明のベクターは、5'リーダーまたはシグナル配列を任意に含む得る。適切なベクターの選定および設計は、当業者の能力および自由裁量の範囲内である。

【0093】

発現のための必要な要素をすべて含有する発現ベクターは市販されており、当業者に既知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照）。細胞は、癌関連抗原ポリペプチドあるいはその断片または変異体をコードする異種DNA (RNA) の細胞への導入により遺伝子工学処理される。その異種DNA (RNA) は、宿主細胞中での異種DNAの発現を可能にするために転写性素子の操作可能制御下に置かれる。

【0094】

哺乳類細胞中でのmRNA発現のための好ましい系は、G418耐性を付与する遺伝子（安定トランスフェクトした細胞系の選択を促す）、およびヒトサイトメガロウイルス (CMV) エンハンサープロモーター配列のような選択可能マーカーを含有するpCDNA3.1およびpRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CAから入手可能) のような系である。さらに、霊長類またはイヌ細胞系中での発現に適しているのは、エプスタインバーウイルス (EBV) 複製起点を含有し、多重コピー染色体外要素としてのプラスミドの保持を促すpCEP4ベクター (Invitrogen) である。別の発現ベクターは、in vitroでの

転写を効率的に刺激するポリペプチド延長因子1 α のプロモーターを含有するpEF-BOSプラスミドである。本プラスミドは、Mishizuma and Nagata (Nuc. Acids Res. 18:5322, 1990) により記載されており、トランスフェクション実験におけるその使用は、例えばDemoulin (Mol. Cell. Biol. 16:4710-4716, 1996) により開示されている。さらに別の好ましい発現ベクターは、Stratford-Perricaudetにより記載されたアデノウイルスであり、これはE1およびE3タンパク質を欠いている (J. Clin. Invest. 90:626-630, 1992)。抗原の発現のためのAdeno.P1A組換え体としてのアデノウイルスの使用は、P1Aに対する免疫処置のためのマウスにおける皮内注射において、Warnier等により開示されている (Int. J. Cancer, 67:303-310, 1996)。

【0095】

本発明は、当業者が所望の単数または複数の発現ベクターを調製するのを可能にするいわゆる発現キットも含む。かかる発現キットは、少なくとも別々の部分のベクターおよび1つまたは2つ以上の上述のCT抗原核酸分子を含む。その他の構成成分は、必要とされる上述の核酸分子が含まれる限り、所望により添加することができる。本発明は、CT抗原核酸とハイブリダイズする少なくとも一对の増幅プライマーを含めた癌関連抗原核酸の増幅のためのキットも含む。プライマーは、好ましくは12～32のヌクレオチド長であり、「プライマー二量体」の形成を防止するために非重複性である。CT抗原核酸の増幅を可能にする配列で、プライマーの1つは、CT抗原核酸の一方の鎖とハイブリダイズし、第二プライマーはCT抗原核酸の相補的鎖とハイブリダイズする。適切なプライマー対の選択は、当分野の標準である。例えば、選択は、このような目的のために設計されたコンピュータープログラムの助けを借りて、任意にその後、増幅特異性および効率に関してプライマーを検査することによりなすことができる。

【0096】

本発明は、細胞および動物におけるCT抗原遺伝子「ノックアウト」および「ノックイン」の構築およびトランスジェニックも可能にして、癌および癌に対する免疫系応答のある種の態様を試験するための物質を提供する。

【0097】

本発明は、上記のCT抗原核酸によりコードされる単離ポリペプチド（全タンパク質および部分タンパク質を含む）も提供する。かかるポリペプチドは、例えば単独で、または抗体を生成するための融合タンパク質として、イムノ検定または診断検定の構成成分として、あるいは治療薬として有用である。CT抗原ポリペプチドは、組織または細胞ホモジネートを含めた生物学的試料から単離されて、発現系に適した発現ベクターを構築し、発現系に発現ベクターを導入し、かつ組換え発現タンパク質を単離することにより、種々の原核生物および真核生物発現系中で組換え的に発現することができる。タンパク質断片および抗原性ペプチド（免疫認識のために細胞の表面のMHC分子により提示されるような）を含めた短いポリペプチドも、ペプチド合成の十分に確立された方法を用いて化学的に合成することができる。

【0098】

CT抗原ポリペプチドの非反復断片は、概して、核酸と関連して上記のような非反復断片の特徴および特性を有する。当業者に認識されるように、非反復断片のサイズは、断片が保存タンパク質ドメインの一部を構成するか否かといったような剤に依存している。したがって、CT抗原のいくつかの領域は、より長いセグメントが非反復であるよう求めるが、その他は、典型的には5～12アミノ酸（例えば、全長までの各整数を含めた5、6、7、8、9、10、11または12アミノ酸、または全長までのそれぞれの整数値を含むより長いアミノ酸）の短いセグメントのみを要する。

【0099】

CT抗原ポリペプチドの断片は、好ましくはポリペプチドの機能的容量を保持する断片である。ポリペプチドの断片において、保持することができる機能的容量は、抗体との相互作用、他のポリペプチドまたはその断片との相互作用、核酸またはタンパク質の選択的結合、および酵素活性を含む。重要な一活性は、ポリペプチドを同定するための徴候として

10

20

30

40

50

作用する能力である。別のものは、MLAと複合体をなし、ヒトにおいて免疫応答を惹起する能力である。当業者は、典型的には、非ファミリー構成要素から当該配列を選択的に区別する非反復断片の能力に基づいて、非反復アミノ酸配列を選択するための方法に精通している。典型的に、断片の配列と既知のデータベース上の配列との比較が、必要なすべてである。

【0100】

本発明は、上記のCT抗原ポリペプチドの変異体を含む。本明細書中で用いる場合、癌関連抗原ポリペプチドの「変異体」とは、CT抗原ポリペプチドの一次のアミノ酸配列に対する1つまたはそれ以上の修飾を含有するポリペプチドである。CT抗原変異体を作り出す修飾は、CT抗原ポリペプチドに対してなされて、1) CT抗原ポリペプチドの活性を低減または排除し、2) CT抗原ポリペプチドの特性、例えば発現系におけるタンパク質安定性またはタンパク質-タンパク質結合の安定性を強化し、3) CT抗原ポリペプチドに対する新規の活性または特性、例えば抗原性エピトープの付加または検出可能部分の付加を提供し、あるいは4) MHC分子との等価のまたはより良好な結合を提供する。CT抗原ポリペプチドに対する修飾は、典型的にはCT抗原ポリペプチドをコードする核酸に対してなされ、欠失、点突然変異、切頭化、アミノ酸置換およびアミノ酸または非アミノ酸部分の付加を含み得る。あるいは、修飾は、例えば切断、リンカー分子の付加、ビオチンのような検出可能部分の付加、脂肪酸の付加等により、ポリペプチドに対して直接なすことができる。修飾は、CT抗原アミノ酸配列の全部または一部を含む融合タンパク質も含む。当業者は、タンパク質配列における変化のタンパク質配座に及ぼす作用の予測方法に精通しており、したがって、既知の方法により変異体CT抗原ポリペプチドを「設計」し得る。このような方法の一例は、Dahiyat and MayoによりScience 278: 82-87, 1997に記載されており、それによりタンパク質は新規に設計することができる。本方法は、既知のタンパク質に適用されて、ポリペプチド配列の一部分のみを変更し得る。DahiyatとMayoの計算方法を適用することにより、CT抗原ポリペプチドの特定の変異体が提唱され、その変異体が所望の配座を保持するか否かを決定するために試験することができる。

10

20

【0101】

概して、変異体は、その所望の生理学的活性に関連しないポリペプチドの特徴を変更するために特異的に修飾されるCT抗原ポリペプチドを含む。例えば、システイン残基は、置換または欠失されて、望ましくないジスルフィド結合を防止し得る。同様に、ある種のアミノ酸は、発現系におけるプロテアーゼによるタンパク質分解を排除することによりCT抗原ポリペプチドの発現を強化するよう変更することができる（例えば、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母発現系中の二塩基性アミノ酸残基）。

30

【0102】

CT抗原ポリペプチドをコードする核酸の突然変異は、好ましくはコード配列のアミノ酸リーディングフレームを保存し、好ましくは、ハイブリダイズして変異体ポリペプチドの発現に有害であり得るヘアピンまたはループのような二次構造を形成すると思われる核酸中の領域を作製しない。

【0103】

突然変異は、アミノ酸置換を選択することにより、またはポリペプチドをコードする核酸中の選定部位のランダム突然変異誘発によりなすことができる。次に変異体ポリペプチドが発現され、1つまたはそれ以上の活性に関して試験されて、どの突然変異が所望の特性を有する変異体ポリペプチドを提供するか否かを決定する。ポリペプチドのアミノ酸配列についてサイレントであるが、特定の宿主中での翻訳のための好ましいコドンを提供するさらに別の突然変異が、変異体に対して（または非変異体CT抗原ポリペプチドに対して）なすことができる。例えば大腸菌中での核酸の翻訳のための好ましいコドンは、当業者には周知である。CT抗原遺伝子またはcDNAクローンの非コード配列に対して、さらに他の突然変異がなされて、ポリペプチドの発現を強化し得る。CT抗原ポリペプチドの変異体の活性は、細菌または哺乳類発現ベクター中に変異体CT抗原ポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングし、このベクターを適切な宿主細胞に導入し、変異体C

40

50

T抗原ポリペプチドを発現させ、そして本明細書中に開示した上記のようなC T抗原ポリペプチドの機能的能力に関して試験することにより、試験することができる。例えば、変異体C T抗原ポリペプチドは、実施例に開示されているような自系および同種異系血清との反応に関して試験することができる。その他の変異体ポリペプチドの調製は、当業者には理解されるように、その他の活性の試験に好都合であり得る。

【0104】

当業者は、C T抗原ポリペプチドで保存的アミノ酸置換がなされて、上記のポリペプチドの機能的均等な変異体、即ち、C T抗原ポリペプチドの機能的能力を保持する変異体を提供し得るということも認識するであろう。本明細書中で用いる場合、「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸置換がなされるタンパク質の相対的電荷またはサイズ特徴を変更しないアミノ酸置換を指す。変異体は、当業者に既知のポリペプチド配列を変更するための方法をまとめた参考文献中に、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989またはCurrent Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに見出されるような方法により調製することができる。C T抗原ポリペプチドの機能的均等な変異体の例としては、本明細書中に開示したタンパク質のアミノ酸配列の保存的アミノ酸置換が挙げられる。アミノ酸の保存的置換としては、以下の群内のアミノ酸間でなされる置換が挙げられる：(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；および(g) E、D。

10

20

【0105】

例えば、癌関連抗原ポリペプチド由来のペプチドがMHC分子により提示され、CTLにより認識されることを決定する際に（以下の例において記載されるように）、ペプチドのアミノ酸配列に対して、特にMHC分子との直接接点ではないと考えられる残基での、保存的アミノ酸置換をなし得る。当業者は、マーキングした変異体のペプチドのこれら残基を知っており、そして、選択的に他のアミノ酸残基を置換するであろう。また、特定のアンカー残基のコンセンサスアミノ酸の他のメンバーを用いることもできる。例えば、HLA-B*35に対するコンセンサスアンカー残基は、2位置のPおよび9位置のY、F、M、LまたはIである。したがって、ペプチドの9位置のチロシン（Y）の場合は、フェニルアラニン（F）、メチオニン（M）、ロイシン（L）またはイソロイシン（I）を置換し、該ペプチドのアンカー残基の位置のコンセンサスアミノ酸を維持することができる。

30

【0106】

概して、変種ポリペプチドを調製する場合は、全アミノ酸よりも少ない範囲で変えることが好ましい。特に、アミノ酸残基が機能を与えることが知られている場合は、例えば、置換されないまたは代替的に保存的アミノ酸置換により置換される場合である。変異体ペプチドを調製する場合、好ましくは、1、2、3、4、5、6、7、8などのペプチド長よりも1つ短い範囲で変える。一般に、最も少ない置換が好ましい。したがって、変種ポリペプチドの1つの作製方法としては、特定の単一アミノ酸以外のすべてのアミノ酸を置換し、次いで、該変種体の活性を調査し、そして、最善の活性を有する1つまたは2つ以上のポリペプチドによってそのプロセスを繰り返すことである。

40

【0107】

別の例としては、例えば、HLAクラスII結合ペプチドの機能的変異体の同定方法は、StromingerとWucherpfennigの公開済PCT出願（PCT/US96/03182）に提供されている。1つまたは2つ以上のアミノ酸置換を保有するペプチドも、例えばD'AmaroとDrijfhout（D'Amaro et al., Human Immunol. 43: 13-18, 1995; Drijfhout et al., Human Immunol. 43: 1-12, 1995）により記載されたコンピュータプログラムを用いた合成の前に、既知のHLA/MHCモチーフとの一致に関して試験することができる。次に置換ペプチドは、MHC分子との結合、ならびにMHCに結合された場合には抗体またはCTLによる認識に関して試験することができる。これらの変異体は、改良された安定性に関して試験され、とりわけワクチン組成物中で有用である。

50

【0108】

C T 抗原ポリペプチドの機能的均等な変異体を産生するためのC T 抗原ポリペプチドのアミノ酸配列中の保存的アミノ酸置換は、典型的には、C T 抗原ポリペプチドをコードする核酸の変更によりなされる。このような置換は、当業者に既知の種々の方法によりなすることができる。例えば、アミノ酸置換は、Kunkel (Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. A. 82: 488-492, 1985) の方法によるP C R 特異的突然変異、部位特異的突然変異誘発により、あるいはC T 抗原ポリペプチドをコードする遺伝子の化学合成によりなすることができる。アミノ酸置換が、自系または同種異系血清あるいは細胞溶解性Tリンパ球により認識される抗原性エピトープのようなC T 抗原ポリペプチドの小非反復断片に対してなされる場合、置換は、ペプチドを直接合成することによりなすることができる。C T 抗原ポリペプチドの機能的等価断片の活性は、細菌または哺乳類発現ベクターに改変されたC T 抗原ポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングし、ベクターを適切な宿主細胞に導入し、改変されたC T 抗原ポリペプチドを発現させ、そして本明細書中に開示したようなC T 抗原ポリペプチドの機能的能力に関して試験することにより、試験することができる。化学的に合成されたペプチドは、機能に関して、例えば関連抗原を認識する抗血清との結合に関して直接試験することができる。

【0109】

本発明は、ある実施態様では、癌関連抗原ポリペプチド由来の「優性ネガティブ」ポリペプチドも提供する。優性ネガティブポリペプチドは、細胞機構との相互作用により、細胞機構とのその相互作用からの活性タンパク質を置き換え、あるいは活性タンパク質と競合し、それにより活性タンパク質の作用を低減するタンパク質の不活性変異体である。例えば、リガンドを結合するが、リガンドの結合に応答してシグナルを伝達しない優性ネガティブ受容体は、リガンドの発現の生物学的作用を低減し得る。同様に、標的タンパク質と正常に相互作用するが、標的タンパク質をリン酸化しない優性ネガティブ触媒的不活性キナーゼは、細胞シグナルに応答して標的タンパク質のリン酸化を低減し得る。同様に、遺伝子の制御領域におけるプロモーター部位と結合するが、遺伝子転写を増大しない優性ネガティブ転写因子は、転写の増大を伴わずにプロモーター結合部位を占めることにより、正常転写因子の作用を低減し得る。

【0110】

細胞中の優性ネガティブポリペプチドの発現の最終結果は、活性タンパク質の機能の低減である。当業者は、タンパク質の優性ネガティブ変異体に関する潜在性を査定することができ、標準的な突然変異誘発技法を用いて1つまたはそれ以上の優性ネガティブ変異体ポリペプチドを作製する。例えば、C T 抗原、特に既知の活性を有する既知のタンパク質と同様であるものについて本明細書中に含入された教示を前提として、当業者は、部位特異的突然変異誘発、走査突然変異誘発、部分遺伝子欠失または切頭化等によりC T 抗原の配列を修飾できる（例えば、米国特許第5,580,723号およびSambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989参照）。次に当業者は、選定された活性の縮小および／またはこのような活性の保持に関して突然変異ポリペプチドの集団を試験し得る。タンパク質の優性ネガティブ変異体を作製し、試験するためのその他の同様の方法は、当業者には明らかであろう。

【0111】

本発明は、本明細書中に記載されているように多数の用途を有し、そのいくつかは本明細書中の他の箇所に記載されている。第一に、本発明は、C T 抗原タンパク質分子の単離を可能にする。当業者に周知の種々の方法は、単離されたC T 抗原分子を得るために利用することができる。ポリペプチドは、クロマトグラフィー的手段または免疫学的認識によりポリペプチドを天然に産生する細胞から精製することができる。あるいは、発現ベクターが細胞中に導入されて、ポリペプチドの産生を生じ得る。別の方法では、m R N A 転写体が微量注射され、または他の方法が細胞中に導入されて、コードされたポリペプチドの産生を生じ得る。無細胞抽出物、例えば網状赤血球溶解物系におけるm R N A の翻訳も、ポリペプチドを産生するために用いることができる。当業者は、C T 抗原ポリペプチドを単離

するための既知の方法にも容易に従い得る。これらには、免疫クロマトグラフィー、HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよび免疫アフィニティークロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0112】

本発明はまた、本明細書に記載のと通りのCT抗原に結合するタンパク質を単離することを可能にし、これは、抗体およびCT抗原の結合パートナーを含む。さらなる用途を以下でさらに記載する。

【0113】

CT抗原遺伝子の単離および同定は、癌関連抗原の発現により特徴づけられる障害を当業者が診断することも可能にする。これらの方法は、1つまたは2つ以上のCT抗原核酸および／またはコードされたCT抗原ポリペプチドおよび／またはそれらに由来するペプチドの発現を決定することを含む。前者の場合には、かかる決定は、ポリメラーゼ連鎖反応を含めた任意の標準核酸決定検定、あるいは標識化ハイブリダイゼーションプローブを用いた検定により実行することができる。後者の場合には、かかる決定は、例えば、CT抗原に対するELISA、組織試料の免疫組織化学を含む免疫アッセイそして、ポリペプチドの認識に関して患者抗血清をスクリーニングすることにより実行することができる。

【0114】

本発明はまた、対象の癌の発症、進行または退行を、例えば、連続的な時間で、対象から細胞または組織試料を得ること、そして、かかる試料に関して本発明の癌関連ポリペプチドの存在および／または発現レベルを試験することによって、モニタリングするための方法も含む。対象が癌を有する疑いがあるかまたは有しないと考えられるかを判断でき、そして、試料は、対象による次の細胞または組織試料のベースラインとして機能する。

【0115】

状態の発症は、対象の生理学的変化または状態に関連する特徴が開始することである。かかる変化は、生理学的症候によって証拠づけられるか、または臨床的に無症候であってもよい。例えば、その時に臨床的な症状が明らかでなくても、癌の発症が、対象の癌に関連する生理学的特徴が見られる期間があってもよい。状態の進行は、発症に続く、該状態の生理学的特徴の発達であり、臨床的な症候の増加が、見られても、見られなくてもよい。また、状態の退行は、該状態の生理学的特徴の減衰であり、恐らく、症候の平行的な(parallel)減衰を有し、そして、該状態の処置または自然的な回復によりもたらされてもよい。

【0116】

対象から得られる細胞または組織試料の癌関連核酸またはポリペプチドの存在は、対象の癌に対するマーカーとなる、その核酸またはポリペプチドの上記ベースラインレベルで決定される。例えば、癌のマーカーは、癌関連ポリペプチドの結合に特異的であり得る。癌の状態の徴候は、前もって決定されたかかるマーカーがない対象の試料において、かかるマーカーの出現によって示され得る。例えば、対象による第一の試料に癌のマーカーが存在しない場合、対象による第二の試料または後続の試料における癌マーカーの存在の確認は、対象の癌の徴候の示唆となる。

【0117】

癌状態の進行または退行は、それぞれ、長期に渡る対象の試料中のマーカーの増大または減少により示される。例えば、対象による第一の試料において癌のマーカーが存在し、そして、対象による第二の試料または後続の試料において追加的なマーカーまたは当初以上のマーカーの存在が確認された場合、それは、癌の進行を示す。癌の退行は、対象による試料においてマーカーが発見されない、または対象による第二の試料または後続の試料において、その量が少なくなったことが確認されることによって示される。

【0118】

癌状態の進行および退行はまた、対象の決定された癌関連ポリペプチドの発言の特性に基づいて示される。例えば、癌の特定のステージ（例えば、初期ステージの癌関連ポリペプチド、中期ステージの癌関連ポリペプチドおよび後期ステージの癌関連ポリペプチド）に

10

20

30

40

50

においては、いくつかの癌関連ポリペプチドは、異常的に発現されてもよい。別の例としては、限定ではないが、癌関連ポリペプチドは、差別的に転移巣（metastase）に対する原発腫瘍において、発現されてもよく、従って、疾患のステージおよび／または診断レベルを、対象試料の選択された癌関連ポリペプチドの同定に基づいて確定することができる。

【0119】

単一組織種の異なる種類の癌は、異なる癌関連ポリペプチドおよびそのコード核酸分子または異なる空間的なまたは一時的なパターンを有してもよい。かかる変化により、癌特異性を診断し、そして、患者の特定状態に対する後続の処置を調整することができる。発現のこれらの差異は、医師による癌関連ポリペプチドおよび本発明のコード核酸分子の差別的な発現またはそれに対する免疫応答（例えば、血清抗体）に基づく癌の診断を可能にし、そして、差別的な発現に基づいて、特定の処置の選択および投与させることができる。

【0120】

癌関連核酸およびポリペプチドの単離および同定はまた、癌関連ポリペプチドの発現に特徴づけられる、好ましくは、癌関連ポリペプチドに対する免疫応答によって特徴づけられる障害を、当業者が診断することも可能にする。本明細書で示されるように、癌を有する対象の癌関連ポリペプチドの発現により、対象の癌関連ポリペプチドへの免疫応答の測定が可能となる。この免疫応答の評価は、1つまたは2つ以上の本発明の癌関連ポリペプチドを発現する対象の癌の診断に有用である。

【0121】

癌関連ポリペプチド免疫応答に関連する本発明の方法は、1つまたは2つ以上癌関連ポリペプチドに対する免疫応答（抗体または細胞性）の決定を含む。免疫応答は、当業者に公知の種々の免疫学的検定法の手順で調査することができる。例えば、抗原性癌関連ポリペプチドは、イムノアッセイ、例えば、ELISAアッセイにおいて、試料、例えば、患者から取り出した血液試料による捕捉抗体を標的とすることができる。したがって、本発明は、1つまたは2つ以上の本明細書に記載される癌関連ポリペプチドへの免疫応答の存在を決定することによって対象の癌を診断またはモニタリングするいくつかの側面に関与する。好ましい態様において、この決定は、対象から得られる体液、例えば、血液、リンパ節液を調査することによって実施し、1つまたは2つ以上の癌関連ポリペプチドに対する抗体存在または癌関連ポリペプチドをコードする核酸分子、或いは本明細書に記載されるような、癌関連ポリペプチドの1つに対する抗体の存在を決定することができる。

【0122】

長期間に渡る連続的な決定による本明細書に記載の1つまたは2つ以上の癌関連ポリペプチドに対する免疫応答の測定は、処置の経過から得られる癌の徴候、進行または退行のモニタリングに有用である。例えば、血液またはリンパ節液などの試料を対象から得て、本発明の癌関連ポリペプチドに接触させることができ、そして、試料中の剤（例えば、抗体）と癌関連ポリペプチドとを結合させ、癌関連ポリペプチドへの免疫応答の示唆となる。二回目、後続の時間、別の試料を、対象から得ることができ、同様に試験する。第一および第二試験（および／または後続の試験）の結果、癌の徴候、退行または進行の測定として比較することができ、または、試料を採取の間に癌の処置がなされない場合には、処置の効果を、2つの試験の結果を比較することによって評価することができる。

【0123】

対象の癌のステージは、本発明の癌関連ポリペプチドへの患者の免疫応答の変化に基づいて決定することができる。該ポリペプチドへの免疫応答の変動性は、対象の癌の示唆に用いることができる。例えば、いくつかの癌関連ポリペプチドは、他の癌関連ポリペプチドにより誘発されるものよりも、異なるステージの癌において免疫応答を誘発することができる。本明細書に記載の癌特異性診断もまた、異なる癌関連ポリペプチドへの免疫応答の変化に基づくことができる。

【0124】

本発明は、癌関連ポリペプチドおよび／または癌関連ポリペプチドに特異的に結合する抗体を調査するためのキットを含む。キットの例としては、癌関連ポリペプチドに特異的に

結合する抗体またはその抗原結合断片を含み得る。抗体またはその抗原結合断片は、癌を有する、癌を有する疑いがあるまたは癌がないと思われる患者の組織または細胞試料に適用することができ、次いで、その試料を処理し、抗体およびポリペプチドまたは試料の他の成分の間に特異的な結合が存在するか否かを評価することができる。

【0125】

かかるキットの別の例としては、基板、例えば、ディップスティックに結合する上記ポリペプチドを含み、これは、対象の血液または体液試料に浸漬することによって得られる。次いで、基板の表面を、当業者に十分に公知の手順によって処理し、対象の試料中のポリペプチドと剤（例えば抗体）との間に特異的な結合が存在するか否かを評価する。例えば、手順は、限定ではないが、二次抗体との接触または特異的な結合の存在を示す他の方法を含む。 10

【0126】

さらに、抗体またはその抗原結合断片は、癌を有する疑いがある、癌を有すると診断された、または癌がないと考えられる対象による体液試料、例えば、血液またはリンパ節液に適用することができる。当業者に理解されるであろうが、かかる結合試験はまた、試料または抗体および／または癌関連ポリペプチドによって接触された対象を用いて、例えば、96ウェルプレート中で、または対象表面に直接適用することができる。

【0127】

本発明のキットの別の例としては、1つまたは2つ以上の本発明の癌関連核酸分子の発現レベルを決定するのに必要な部品を提供するキットである。かかる部品は、1つまたは2つ以上の癌関連核酸分子の増幅および／またはPCR増幅のための他の化学物質の増幅に有用である。 20

【0128】

本発明のキットの別の例としては、本発明の1つまたは2つ以上の癌関連核酸分子の発現レベルを、ハイブリダイゼーションの方法を用いて決定するのに必要な部品を提供するキットである。

【0129】

前記キットは、診断用キットの種々の部品の使用法する説明書または他の印刷資料を含む。

【0130】

本発明は、さらに、核酸或いはポリペプチドをコードする核酸またはCT抗原を有するタンパク質マイクロアレイを含む。本発明の他の態様においては、タンパク質マイクロアレイ技術の標準的な技法は、CT抗原の発現を評価すること、および／またはそのようなタンパク質およびペプチドを結合する生物学的構成成分を同定することに活用される。生物学的試料の構成成分は、抗体、リンパ球（特にTリンパ球）などを含む。タンパク質マイクロアレイ技術、これはタンパク質チップ技術および固相タンパク質アレイ技術を含む他の名前でも知られているが、これは当業者によく知られており、次に限定されるものではないが、固定基材上に同定したペプチドまたはタンパク質のアレイを得ること、該ペプチドと標的分子または生物学的構成成分を結合すること、およびそのような結合を評価することに基づく。例えば、G. MacBeath and S. L. Schreiber, "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination," Science 289(5485):1760-1763, 2000を参照。核酸アレイ、特にCT抗原に結合するアレイはまた、診断用途、例えばCT抗原発現によって特徴付けられる状態を有する対象の同定に用いることができる。 40

【0131】

マイクロアレイの基材は、限定されないが、ガラス、シリカ、アルミノケイ酸塩、ホウケイ酸塩、アルミナおよびニッケル酸化物などの金属酸化物、種々のクレイ、ニトロセルロースまたはナイロンを含む。マイクロアレイの基材は、基材上のプローブ（ペプチドまたは核酸）の合成を増強するように化合物でコートされる。基板上のカップリング剤または基は、基材への第一のヌクレオチドまたはアミノ酸の共有的に結合されるために用いることができる。多種もカップリング剤または基は、当業者に既知である。したがって、ペプ 50

チドまたは核酸プローブは、所定のグリッドの基材上で直接的に合成することができる。これらの態様において、合成されたプローブは、基材にプローブを接触プリント法またはインクジェットもしくはピエゾ電気分配などの非接触法で適用するためにコンピュータで制御されたロボットを利用し、正確に、予め決定された量とグリッドパターンで基材へ適用される。プローブは、基材と共有的に結合され得る。

【0132】

標的は、天然または合成であってよい。組織は、対象から得ることができ、または培養によって（例えば、癌細胞系から）増殖させ得る。

【0133】

いくつかの態様において、1または2以上の対照ペプチドまたはタンパク質が基材へ付着する。好ましくは、対照ペプチドまたはタンパク質分子により、ペプチドまたはタンパク質の質および結合特性、試薬の質および効果、結合成功率および分析の閾値および成功率などの因子の決定が可能になる。 10

【0134】

他の態様において、1または2以上の対照ペプチドまたは核酸分子が基材へ付着する。好ましくは、対照核酸分子により、ペプチドまたは核酸の質および結合特性、試薬の質および効果、結合成功率および分析の閾値および成功率などの因子の決定が可能になる。

【0135】

核酸マイクロアレイ技術は、核酸マイクロアレイ技術、これはDNAチップ技術、遺伝子チップ技術、そして固相核酸アレイ技術を含む他の名前でも知られているが、これは当業者によく知られており、次に限定されるものではないが、固定基材上に同定した核酸プローブのアレイを得ること、レポーター分子（例えば、フルオレセイン、Cye3-dUTPまたはCye5-dUTPなどの、放射能性、化学蛍光性または蛍光性のタグ）で標的分子を標識すること、標的核酸とプローブとをハイブリダイズすること、および標的-プローブハイブリダイゼーションを評価することに基づく。標的配列に完全に合致する核酸配列を備えたプローブは、一般的に、あまり完全に合致しないプローブよりも強いレポーター分子シグナルの検出をもたらす。核酸マイクロアレイ技術に活用される多くの成分および技法は、"The Chipping Forecast", Nature Genetics, Vol. 21, 1999年1月に示されており、ここにその完全な内容を参照によって組み込む。 20

【0136】

本発明により、マイクロアレイの基材は、限定されないが、ガラス、シリカ、アルミノケイ酸塩、ホウケイ酸塩、アルミナおよびニッケル酸化物などの金属酸化物、種々のクレイ、ニトロセルロースまたはナイロンを含む。すべての実施態様において、ガラス基材が好ましい。本発明により、プローブは、限定されないが、DNA、ゲノムDNA、cDNAおよびオリゴヌクレオチドを含む核酸の群から選択され、天然であっても合成であってもよい。オリゴヌクレオチドプローブは好ましくは、20~25-merのオリゴヌクレオチドであり、DNA/cDNAプローブは、他の長さも用い得るが、好ましくは500~5000塩基長である。好適なプローブの長さは、以下の技術的に知られた方法により当業者によって決定されてもよい。一態様において、好ましい核酸プローブは、本明細書で述べるCT抗原核酸分子の2つまたは3つ以上のセットである。プローブは、ゲル濾過または沈降などの当業者に知られた標準的な方法を用いて混入物を除去するために精製してもよい。 30 40

【0137】

一態様において、マイクロアレイの基材は、基材上でプローブの合成を高めるための化合物で被覆されていてもよい。このような化合物には、限定されないが、オリゴエチレングリコールを含む。他の実施態様において、基材上に剤または基を結合することは、基材へ第一のヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを共有的に結合することに用いることができる。これらの剤または基は、例えば、アミノ、ヒドロキシ、プロモおよびカルボキシル基を含んでもよい。これらの反応基は、好ましくは、アルキレンまたはフェニレンの2価のラジカルなどのヒドロカルビル基を介して基材に付着し、一価の位置が鎖状結合(chain bonding)により占められ、残りが官能基に付着する。これらヒドロカルビル基は、約 50

10までの炭素原子を含んでもよく、好ましくは、約6までの炭素原子を含んでもよい。アルキレンラジカルは、常に主鎖に2～4炭素原子を含むことが好ましい。該方法およびそのさらなる詳細は、例えば、全体が参照文献により組み込まれる米国特許第4,458,066号に開示されている。

【0138】

一態様において、プローブは、光誘導(light-directed)化学合成、光化学脱保護、またはヌクレオチド前駆体を基材へ運搬と、それに続くプローブ産生などの方法を用いて、所定のグリッドパターンで基材上に直接合成する。

【0139】

他の実施態様において、基材はプローブの基材への結合を高めるために化合物で被覆してもよい。このような化合物は、限定されないが、ポリリシン、アミノシラン、アミノ反応性シラン(Chipping Forecast, 1999)またはクロムを含む。この実施態様において、予め合成されたプローブは、基材にプローブを接触プリント法またはインクジェットもしくはピエゾ電気分配などの非接触法で適用するためにコンピュータで制御されたロボットを利用し、正確に、予め決定された量とグリッドパターンで基材へ適用される。プローブは、限定されないが、UV-照射を含む方法で、基材と共有的に結合され得る。他の実施態様において、プローブは熱で基材と結合される。

10

【0140】

標的は、限定されないが、DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、mRNAを含む核酸であり、天然または合成によるものであってよい。すべての態様において、ヒト組織からの核酸標的分子が好ましい。該組織は、対象から得ることができ、または培養によって(例えば、癌細胞系から)増殖させ得る。

20

【0141】

本発明の態様においては、対照核酸分子が基材へ付着する。好ましくは、対照核酸分子により、核酸の質および結合特性、試薬の質および効果、結合成功率および分析の閾値および成功率などの因子の決定が可能になる。対照核酸は、限定されないが、ハウスキーピング遺伝子などの遺伝子またはその断片の発現産物を含む。

【0142】

いくつかの態様においては、1つまたは2つ以上の対照ペプチドまたは核酸分子が基材へ付着する。好ましくは、対照ポリペプチドまたは核酸分子により、ポリペプチドまたは核酸の質および結合特性、試薬の質および効果、結合成功率および分析の閾値および成功率などの因子の決定が可能になる。

30

【0143】

CT抗原ポリペプチドの発現もまた、タンパク質測定法によって決定できる。タンパク質の特異的および定量的な測定の好ましい方法は、限定ではなく、例えば、表面増強レーザー脱着/イオン化(SELDI:例えば、Ciphergen Proteinchip System, Ciphergen Biosystems, Fremont CA)などの質量分析に基づく方法、非質量分析に基づく方法および、例えば、二次元ゲル電気泳動などの免疫組織化学に基づく方法を含む。

【0144】

SELDI方法論は、当業者に知られた方法であるが、微量の癌組織を蒸発し、個々のタンパク質の「フィンガープリント」をつくり、これにより、1つの試料の多くのタンパク質の存在量の同時の測定を可能にするように用いられる。好ましくは、SELDIに基づく分析は、腫瘍を同定および/または分類することに活用してもよい。このような分析は、限定されないが、好ましくは以下の例を含む。核酸マイクロアレイで分析された核酸にコードされる遺伝子産物は、SELDIタンパク質ディスクに対する特異的な(抗体関連の)キャプチャー(例えば、選択的SELDI)によって、選択的に測定され得る。タンパク質スクリーニング(例えば、2-Dゲル)によって発見された遺伝子産物は、本明細書中に記載のCT抗原の中から対象のこれら特定マーカーを視覚化するのに最適化された「全タンパク質SELDI」により解明され得る。

40

【0145】

50

腫瘍は、多様なC T抗原の測定に基づいて分類することができる。C T抗原発現に基づく分類は、疾患をステージングし、疾患の進行または退行をモニタリングし、そして、癌患者のための処置計画を選択することに用いることができる。

【0146】

本発明は、C T抗原ポリペプチドと結合するポリペプチドのような剤も含む。かかる結合剤は、例えばC T抗原ポリペプチドおよびC T抗原ポリペプチドとそれらの結合相手との複合体の存在または非存在を検出するためのスクリーニング検定に、ならびに単離されたC T抗原ポリペプチドおよびC T抗原ポリペプチドとそれらの結合相手との複合体のための精製プロトコルに用いることができる。かかる剤は、例えばこのようなポリペプチドとの結合により、C T抗原ポリペプチドのネイティブ活性を抑制するためにも用いることができる。 10

【0147】

したがって、本発明は、例えばC T抗原ポリペプチドと選択的に結合する能力を有する抗体または抗体の断片であり得るペプチド結合剤を含む。抗体は、慣用的方法により調製されるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む。

【0148】

有意には、当分野で周知のように、抗体分子の小部分のみ、即ちパラトープが、抗体のそのエピトープとの結合に関与する（概して、Clark, W.R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology* 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford参照）。例えば 20 p F c ' および F c 領域は相補体カスケードのエフェクターであるが、抗原結合に関与しない。p F c ' 領域が酵素的に切断されていた、またはp F c ' 領域を伴わずに産生されていた、F (a b ')₂ 断片と呼ばれる抗体は、無傷抗体の抗原結合部位の両方を保持する。同様に、F c 領域が酵素的に切断されていた、またはF c 領域を伴わずに産生されていた、F a b 断片と呼ばれる抗体は、無傷抗体分子の抗原結合部位の一方を保持する。さらに続けると、F a b 断片は、共有結合された抗体軽鎖、およびF d と示される抗体重鎖の一部分からなる。F d 断片は、抗体特異性の主要決定因子であり（単一F d 断片は、抗体特異性の変化を伴わずに10までの異なる軽鎖と会合することができる）、F d 断片は単離した状態でエピトープ結合能力を保持する。

【0149】

当分野で周知であるように、抗体の抗原結合部分内には、相補性決定領域が（C D R）が存在し、これが抗原のエピトープ、およびパラトープの三次構造を保持する枠組み構造領域（F R）と直接相互作用する（概して、Clark, 1986; Roitt, 1991参照）。I g G免疫グロブリンの重鎖F d 断片および軽鎖の両方において、3つの相補性決定領域（C D R 1 ~ C D R 3）により別々に分けられる4つの枠組み構造領域（F R 1 ~ F R 4）が存在する。C D R、特にC D R 3 領域、より詳細には重鎖C D R 3 は、抗体特異性に大いに寄与する。 30

【0150】

哺乳類抗体の非C D R 領域は、元の抗体のエピトープ特異性を保持しながら、同種異系抗体または異種抗体の同様領域と置換することができる、ということは、当分野で目下十分に確立されている。これは、非ヒトC D R がヒトF R および／またはF c / p F c ' 領域と共有結合されて機能性抗体を産生する「ヒト化」抗体の開発および使用において最も明白に示される（例えば、米国特許第4, 816, 567号、第5, 225, 539号、第5, 585, 089号、第5, 693, 762号および第5, 859, 205号参照）。 40

【0151】

十分なモノクローナル抗体もまた、ヒト免疫グロブリンの重鎖および軽鎖遺伝子座の大部分に対してトランスジェニックなマウスに免疫を与えることによって調整できる。例えば、米国特許第5, 545, 806号、第6, 150, 584号および本明細書に記載の文献を参照されたい。これらのマウス（例えば、XenoMouse (Abgenix)、HuMAbマウス (Medrarex/GenPharm)）の免疫化に続き、モノクローナル抗体は、標準的なハイブリドーマ技術によ 50

って調製できる。これらのモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有し、したがって、ヒトに投与した場合には、ヒト抗マウス抗体（HAMA）応答を引き起さないであろう。

【0152】

したがって、当業者には明らかなように、本発明は、 $F(ab')_2$ 、Fab、FvおよびFd断片；Fcおよび／またはFRおよび／またはCDR1および／またはCDR2および／または軽鎖CDR3領域が相同性ヒトまたは非ヒト配列により置き換えられたキメラ抗体；FRおよび／またはCDR1および／またはCDR2および／または軽鎖CDR3領域が相同性ヒトまたは非ヒト配列により置き換えられたキメラ $F(ab')_2$ 断片抗体；FRおよび／またはCDR1および／またはCDR2および／または軽鎖CDR3領域が相同性ヒトまたは非ヒト配列により置き換えられたキメラFab断片抗体；ならびにFRおよび／またはCDR1および／またはCDR2領域が相同性ヒトまたは非ヒト配列により置き換えられたキメラFd断片抗体も提供する。本発明は、いわゆる一本鎖抗体も含む。 10

【0153】

したがって、本発明は、CT抗原ポリペプチド、ならびにCT抗原ポリペプチドとそれらの結合相手との複合体と特異的に結合する多数のサイズおよび種類のポリペプチドを含む。これらのポリペプチドは、抗体技術以外の供給源からも得られる。例えば、かかるポリペプチド結合剤は、溶液中で、固定化態様でまたはファージディスプレイライブラリーとして容易に調製することができる縮重ペプチドライブラリーにより提供することができる。 20

1つまたは2つ以上のアミノ酸を含有するペプチドの組合せライブラリーも合成することができる。ペプトイドおよび非ペプチド合成部分のライブラリーをさらに合成することができる。

【0154】

ファージディスプレイは、本発明により有用な結合ペプチドを同定するのに特に有効であり得る。要するに、慣用的手法を用いて、4～約80個のアミノ酸残基の挿入物を表示するファージライブラリー（例えば、m13、fdまたはλファージを用いる）を調製する。挿入物は、例えば完全縮重またはバイアス化アレイを表し得る。次に、CT抗原ポリペプチドと結合するファージ保有挿入物を選択し得る。この過程は、CT抗原ポリペプチドと結合するファージの、数サイクルの再選択により反復することができる。反復回数は、ファージ保有特定配列の豊富化をもたらす。DNA配列分析を実行して、発現されたポリペプチドの配列を同定し得る。CT抗原ポリペプチドと結合する配列の最小線状部分を決定することができる。最小線状部分の一部または全部を含有する挿入物＋それらの上流または下流の1つまたはそれ以上の付加的縮重残基を含有するバイアス化ライブラリーを用いて、当該手法を反復し得る。癌関連抗原ポリペプチドと結合するポリペプチドを同定するために、酵母2ハイブリッドスクリーニング法も用いることができる。したがって、本発明のCT抗原ポリペプチドまたはそれらの断片を用いて、ファージディスプレイライブラリーを含めたペプチドライブラリーをスクリーニングして、本発明のCT抗原ポリペプチドのペプチド結合相手を同定し、選定し得る。かかる分子は、上記のように、スクリーニング検定に、精製プロトコルに、癌関連抗原の機能の直接的妨害に、ならびに当業者には 40

明らかであろうその他の目的に用いることができる。

【0155】

本明細書中に記載されているように、上記の抗体およびその他の結合分子は、例えばタンパク質を発現する組織を同定し、またはタンパク質を精製するために用いることができる。抗体はさらに標準カップリング手法により、癌関連抗原を発現する細胞および組織の画像化のための特異的診断用標識剤と、あるいは治療的に有用な剤と結合することができる。診断剤としては、硫酸バリウム、ヨーセタム酸、ヨーパン酸、イポデートカルシウム、ジアトリゾアートナトリウム、ジアトリゾアートメグルミン、メトリザマイド、チロパノエートナトリウムおよび放射線診断剤、例えば陽電子放出体、例えばフッ素-18および炭素-11、γ放出体、例えばヨウ素-123、テクネチウム-99m、ヨウ素-131お 50

よびインジウム-111、ならびに核磁気共鳴のための核種、例えばフッ素およびガドリニウムが挙げられるが、これらに限定されない。本発明で有用なその他の診断剤は、当業者には明らかであろう。

【0156】

本明細書中で用いる場合、「治療的に有用な剤」は、望ましくは、本明細書中に開示された癌抗原のうちの1つを発現する細胞を選択的に標的とする任意の治療用分子を含み、それらの例としては、抗腫瘍剤、放射性ヨウ素化合物、毒素、その他の細胞増殖抑制剤または細胞溶解剤等が挙げられる。抗腫瘍性治療薬は周知であり、その例としては以下のものが挙げられる：アミノグルテチミド、アザチオプリン、硫酸ブレオマイシン、ブスルファン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シクロスポリン、シタラビジン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、タキソール、エトポシド、フルオロウラシル、インターフェロン- α 、ロムスチン、メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトタン、プロカルバジン HCl、チオグアニン、硫酸ビンブラスチンおよび硫酸ビンクリスチン。さらに別の抗腫瘍剤としては、Anti neoplastic Agents (Paul Calabresi and Bruce A. Chabner) の52章およびその序文、Godman and Gilmanの“The Pharmacological Basis of Therapeutics,” Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division) の1202~1263頁に開示されているものが挙げられる。毒素は例えばアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質のようなタンパク質、コレラ毒素、百日咳毒素、リシン、ゲロニン(gelonin)、アブリン、ジフテリア体外毒素、またはシュードモナス体外毒素であり得る。毒素部分は、コバルト60のような高エネルギー放出放射性核種でもあり得る。

【0157】

いくつかの態様において、本発明により調整される抗体は、本明細書に記載されるMHC分子とCT抗原の複合体に特異的である。

【0158】

「障害」という用語が本明細書中で用いられる場合、それは、癌関連抗原が発現される任意の病理学的症状を指す。このような障害の一例が癌であり、制限されないが、胆道癌、膀胱癌、乳癌、膠芽腫と髄芽腫を含む脳癌、子宮頸癌、絨毛膜癌腫、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、頭および首部の癌、白血病および骨髄性白血病、多発性骨髄腫、AIDSに関連する白血病および成人T細胞白血病リンパ腫を含む血液の新生物(neoplasms)、ボーエン病とパジェット病を含む上皮内の新生物、肝臓癌、小さな細胞肺癌および小さな細胞肺癌を含む肺癌、ホジキン病を含むリンパ腫およびリンパ球性リンパ腫、神経芽細胞腫、扁平上皮細胞癌を含む口腔癌、上皮細胞、ストロマ細胞、生殖細胞および間充織の細胞から生じるものを含む卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、繊維肉腫、骨液肉腫および骨肉腫を含む肉腫、メラノーマ、Kaposi肉腫、塩基性細胞(basocelluer)癌、扁平上皮細胞癌を含む皮膚癌、精上皮腫のような胚腫瘍、非精上皮腫(奇形種、絨毛膜癌腫)、ストロマの腫瘍および生殖細胞腫瘍を含む精巣癌、アデノカルチノーマ(adenocarcinoma)および髄様癌を含む甲状腺癌、腺癌およびWilms腫瘍を含む移行(transitional)の癌および腎臓癌を含む。

【0159】

本明細書中に記載した種々の方法に用いるための組織および／または細胞の試料は、パンチ生検および細胞掻き取りを含めた組織生検、ならびに吸引またはその他の方法による血液またはその他の体液の収集のような標準的方法により採取することができる。

【0160】

本発明のある態様では、免疫反応性細胞試料が対象から取り出される。「免疫反応性細胞」とは、適切な刺激時に、免疫細胞(例えば、B細胞、ヘルパーT細胞または細胞溶解性T細胞)中で成熟し得る細胞を意味する。したがって、免疫反応性細胞としては、CD34⁺造血性幹細胞、未熟T細胞および未熟B細胞が挙げられる。CT抗原を認識する細胞溶解性T細胞を産生するのが望ましい場合、免疫反応性細胞は、細胞溶解性T細胞の産生、分化および／または選択に好都合な条件下でCT抗原を発現する細胞と接触させられる

。抗原への曝露時のT細胞前駆体の細胞溶解性T細胞への分化は、免疫系のクローン選択と同様である。

【0161】

本開示に基づいたいくつかの治療的アプローチは、対象の免疫系による応答が前提であって、1つまたは2つ以上のCT抗原を提示する癌細胞のような抗原提示細胞の溶解をもたらす。かかるアプローチの1つは、問題の表現型の異常細胞を有する対象へのCT抗原／MHC複合体に特異的な自系CTLの投与である。in vitroでのこのようなCTLを開発することは、当業者の能力の範囲内である。T細胞分化のための方法の一例は、国際出願第PCT／US96／05607号に示されている。一般に血液細胞のような対象から採取される細胞の試料は、複合体を提示する細胞であって、CTLが増殖するのを惹起することが可能な細胞と接触させられる。標的細胞は、COS細胞のようなトランスフェクト体であり得る。これらのトランスフェクト体はそれらの表面に所望の複合体を提示し、当該CTLと組合されると、その増殖を刺激する。COS細胞は、他の適切な宿主細胞と同様に、広範に利用可能である。CTLクローンの特異的産生は、当分野で周知である。クローン拡張性自系CTLは次に対象に投与される。

【0162】

抗原特異的CTLクローンを選択するための別の方法が近年記載されており (Altman et al., Science 274:94-96, 1996; Dunbar et al., Curr. Biol. 8:413-416, 1998)、この場合、特異的CTLクローンを検出するために、MHCクラスI分子／ペプチド複合体の蛍光原性四量体が用いられる。要するに、 β_2 -ミクログロブリン、およびクラスI分子を結合するペプチド抗原の存在下で、可溶性MHCクラスI分子がin vitroで折り畳まれる。精製後、MHC／ペプチド複合体が精製され、ビオチンで標識される。ビオチニル化ペプチド-MHC複合体を標識化アビジン (例えば、フィコエリトリン) と4:1のモル比で混合することにより四量体を形成する。四量体は次に、末梢血またはリンパ節のようなCTLの供給源と接触させられる。四量体は、ペプチド抗原／MHCクラスI複合体を認識するCTLを結合する。四量体により結合された細胞は、蛍光活性化細胞分類により分類されて、反応性CTLを単離し得る。次いで、単離されたCTLは、本明細書中に記載するような使用のためにin vitroで拡張することができる。

【0163】

養子移入 (Greenberg, J. Immunol. 136 (5):1917, 1986; Riddel et al., Science 257:238, 1992; Lynch et al., Eur. J. Immunol. 21:1403-1410, 1991; Kast et al., Cell 59:603-614, 1989) と呼ばれる治療方法論を詳述するために、所望の複合体を提示する細胞 (例えば樹状細胞) はCTLと組合されて、それに特異的なCTLの増殖をもたらす。増殖したCTLは次に、特定の複合体を提示するある種の異常細胞により特徴づけられる細胞異常を有する対象に投与される。次いで、CTLは、異常細胞を溶解し、それにより所望の治療目的を達成する。

【0164】

上記の治療は、対象の異常細胞の少なくともいくつかに関連HLA／CT抗原複合体を提示することを想定する。これは、特定のHLA分子を提示する細胞を同定するための方法、ならびに関連する配列、この場合は癌関連抗原配列のDNAを発現する細胞の同定方法に当分野が精通しているので、非常に容易に決定することができる。いったん関連複合体を提示する細胞が上記のスクリーニング方法論により同定されれば、細胞は患者からの試料と組合せることができるが、この場合、試料はCTLを含有する。複合体提示細胞が、混合されたCTL試料により溶解される場合には、CT抗原が提示されていること、および対象がここで述べる治療的アプローチのための適切な候補者であることが想定することができる。

【0165】

養子移入は、本発明により利用可能な治療の唯一の態様であるというわけではない。CTLは、多数のアプローチを用いて、in vivoでも惹起することができる。一アプローチは、複合体を発現する非増殖性細胞の使用である。本アプローチに用いられる細胞は、複合

体を正常に発現する細胞、例えば照射腫瘍細胞、あるいは複合体の提示に必要な遺伝子の一方または両方でトランスフェクトされた細胞（即ち、抗原性ペプチドおよび提示MHC分子）であり得る。Chen等（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:110-114, 1991）はこのアプローチを例証して、治療レジメンにおけるHPV7ペプチドを発現するトランスフェクトした細胞の使用を示している。種々の細胞型を用いることができる。同様に、当該遺伝子の一方または両方を保有するベクターを用いることができる。ウイルスまたは細菌ベクターが特に好ましい。例えば、CT抗原ポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸は、ある種の組織または細胞型における癌関連抗原ポリペプチドまたはペプチドの発現を導くプロモーターおよびエンハンサー配列と作動可能に連結することができる。核酸は、発現ベクター中に組み入れられ得る。発現ベクターは、本明細書中の他の箇所に記載されているように、CT抗原をコードする核酸のような外因性核酸の挿入を可能にするよう構築されまたは修飾されたウイルスゲノム、プラスミド、または非修飾細胞外染色体核酸であり得る。CT抗原をコードする核酸は、レトロウイルスゲノム中にも挿入されることが可能であり、それにより標的組織または細胞型のゲノムへの核酸の組込みを促し得る。これらの系では、当該遺伝子は、微生物、例えばワクシニアウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルスまたはアデノウイルス、ならびに事実上、宿主細胞を「感染」させる物質により保有される。結果として生じる細胞は、当該複合体を提示し、自系CTLにより認識され、その後、細胞が増殖する。

10

【0166】

同様の作用は、CT抗原またはその刺激断片をアジュバントと組合せてin vivoでの抗原提示細胞中への組み入れを促すことにより達成することができる。癌関連抗原ポリペプチドは、MHC分子のペプチド相手を産生するようプロセッシングされるが、一方、CT抗原ペプチドはさらなるプロセッシングを必要とせずに提示することができる。一般に、対象は、有効量のCT抗原の皮内注射を受けることができる。当分野での免疫処置プロトコル標準にしたがって、初期用量と、その後の追加免疫用量を投与することができる。

20

【0167】

本発明は、対象を「免疫処置する」ための、または「ワクチン」としての、本明細書中に開示された種々の物質の使用を含む。本明細書中で用いる場合、「免疫処置」または「予防接種」とは、抗原に対する免疫応答を増大または活性化することを意味する。それは症状の排除または根絶を必要とせず、むしろ抗原に対する免疫応答の臨床的に好都合な強化を意図する。一般的に許容される動物モデルは、CT抗原核酸を用いた癌に対する免疫処置の試験のために用いることができる。例えばヒト癌細胞は、マウスに導入されて、腫瘍を作り出し、1つまたは2つ以上のCT抗原核酸を本発明書中に記載された方法により送達することができる。癌細胞に及ぼす作用（例えば腫瘍サイズの低減）は、癌関連抗原核酸免疫処置の有効性の測定値として査定することができる。当然ながら、免疫処置のためのより慣用的な方法を用いた上記の動物モデルの試験には、免疫応答を高めるための、1つまたは2つ以上のCT抗原ポリペプチドまたはそれらに由来するペプチドの、任意に1つまたはそれ以上のアジュバントおよび／またはサイトカインと組合せた投与が挙げられる。ワクチン組成物の処方ならびに用量、投与経路および投与計画（例えば、初回および1回またはそれ以上の追加免疫投与）の選択を含めた免疫処置のための方法は、当分野で周知である。試験はヒトでも実施することができるが、この場合、終点は抗原を保有する細胞に対する増大レベルの循環CTLの存在に関して試験すること、抗原に対する循環抗体のレベルに関して試験すること、抗原を発現する細胞の存在に関して試験すること等である。

30

40

【0168】

免疫処置組成物の一部として、1つまたは2つ以上のCT抗原またはその刺激断片が、1つまたは2つ以上のアジュバントとともに投与されて、免疫応答を誘導するか、または免疫応答を高める。アジュバントは、抗原に組み入れられるかまたは抗原とともに投与される物質であり、これが免疫応答を増強する。アジュバントは、抗原の貯蔵所（細胞外またはマクロファージ内）を提供し、マクロファージを活性化し、かつ特定組のリンパ球を刺

50

激することにより、免疫学的応答を高め得る。多数の種類のアジュバントが、当分野で周知である。アジュバントの特定の例としては、モノホスホリルリピドA (MPL、SmithKline Beecham)、サルモネラ属の *Salmonella minnesota* Re 595 リポ多糖の精製および酸加水分解後に得られる同属体；サポニン、例えば QS 21 (SmithKline Beecham)、*Quilja saponaria* 抽出物から精製される純 QA-21 サポニン；PCT 出願 WO 96/33739 (SmithKline Beecham) に記載された DQS 21；QS-7、QS-17、QS-18 および QS-L1 (So et al., Mol. Cells 7:178-186, 1997)；フロイントの不完全アジュバント；フロイントの完全アジュバント；モンタニド；ミョウバン；CpG オリゴヌクレオチド (例えば、Kreig et al., Nature 374:546-9, 1995 を参照)；ならびにスクアレンおよび／またはトコフェロールのような生分解性油から調製される種々の油中水エマルションが挙げられる。好ましくは、ペプチドは、DQS 21/MPL の組合せと混合して投与される。DQS 21 対 MPL の比は、典型的には約 1:10~10:1、好ましくは約 1:5~5:1、さらに好ましくは約 1:1 である。典型的には、ヒト投与に関しては、DQS 21 および MPL は、約 1 μ g~約 100 μ g の範囲でワクチン処方物中に存在する。その他のアジュバントが当分野で既知であり、本発明に用いることできる (例えば、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd Ed., 1986 を参照)。ペプチドおよびアジュバントの混合物またはエマルションの製造方法は、予防接種の当業者には周知である。

10

【0169】

対象の免疫応答を刺激するその他の剤も、対象に投与することができる。例えばその他のサイトカインも、それらのリンパ球調節特性の結果として、予防接種プロトコルに有用である。このような目的のために有用な多数のその他のサイトカインは当業者に既知であり、その例としては、ワクチンの防御作用を強化することが示されている (例えば、Science 268:1432-1434, 1995 を参照) インターロイキン-12 (IL-12)、GM-CSF および IL-18 が挙げられる。したがって、サイトカインは抗原およびアジュバントと一緒に投与されて、抗原に対する免疫応答を増大し得る。

20

【0170】

予防接種プロトコルに用いることできる多数の免疫応答助長化合物が存在する。これらは、タンパク質または核酸態様で提供される共刺激分子を含む。このような共刺激分子としては、樹状細胞 (DC) で発現される分子であって、T 細胞で発現される CD28 分子と相互作用する B7-1 および B7-2 (それぞれ CD80 および CD86) 分子が挙げられる。この相互作用は、抗原/MHC/TCR 刺激 (シグナル1) T 細胞に共刺激 (シグナル2) を提供して、T 細胞増殖およびエフェクター機能を増大する。B7 は T 細胞で CTLA4 (CD152) とも相互作用し、CTLA4 および B7 リガンドを含む試験は、B7-CTLA4 相互作用が抗腫瘍免疫性および CTL 増殖を強化し得るということを示す (Zheng P., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (11):6284-6289 (1998))。

30

【0171】

B7 は、典型的には腫瘍細胞で発現されないため、それらは T 細胞に関する効率的抗原提示細胞 (APC) ではない。B7 発現の誘発は、CTL 増殖およびエフェクター機能を、より効率的に腫瘍細胞が刺激するのを可能にする。B7/IL-6/IL-12 共刺激の組合せは、T 細胞母集団中に IFN- γ および Th1 サイトカインプロファイルを誘導して、T 細胞活性のさらなる強化をもたらすことが示されている (Gajewski et al., J. Immunol, 154:5637-5648 (1995))。B7 による腫瘍細胞トランスフェクションは、Wang 等 (J. Immunol., 19:1-8 (1986)) による養子移入免疫治療に関する in vitro での CTL 拡張に関連して考察されている。B7 分子のためのその他の送達メカニズムは、核酸 (裸 DNA) 免疫処置 (Kim J., et al. Nat Biotechnol., 15:7:641-646 (1997)) および組換えウイルス、例えばアデノおよびポックス (Wendtner et al., Gene Ther., 4:7:726-735 (1997)) を含む。これらの系は、他の選定分子、例えば特に、本明細書中で考察される抗原または抗原の断片 (単数または複数) (ポリトープを含む) またはサイトカインとの B7 の同時発現のための発現カセットの構築および使用をすべて施し易い。これらの送

40

50

達系は、in vitroでの適切な分子の導入のために、ならびにin vivoでの予防接種の場合のために用いることができる。T細胞をin vitroおよびin vivoで直接刺激するための抗CD28抗体の使用も考慮することができる。同様に、外来抗原に対するT細胞応答を誘導する誘導可能共刺激分子ICOSは、例えば抗ICOS抗体の使用により調整することができる (Hutloff et al., Nature 397: 263-266, 1999)。

【0172】

リンパ球機能関連抗原-3 (LFA-3) はAPCおよびいくつかの腫瘍細胞で発現され、T細胞で発現されるCD2と相互作用する。この相互作用は、T細胞IL-2およびIFN- γ 産生を誘導し、したがってB7/CD28共刺激相互作用を補足し得るが、置換しない (Parra et al., J. Immunol., 158: 637-642 (1997), Fenton et al., J. Immunother., 21: 2: 95-108 (1998))。

【0173】

リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1) は白血球で発現され、APCおよびいくつかの腫瘍細胞で発現されるICAM-1と相互作用する。この相互作用は、T細胞IL-2およびIFN- γ 産生を誘導し、したがってB7/CD28共刺激相互作用を補足し得るが、置換しない (Fenton et al., J. Immunother., 21: 2: 95-108 (1998))。したがってLFA-1は、上記でB7に関して考察した種々の方法における予防接種プロトコルにおいて提供することができる共刺激分子のさらなる一例である。

【0174】

完全CTL活性化およびエフェクター機能は、Th細胞CD40L (CD40リガンド) 分子およびDCにより発現されるCD40分子間の相互作用によるTh細胞ヘルプを要する (Ridge et al., Nature, 393: 474 (1998), Bennett et al., Nature, 393: 478 (1998), Schoenberger et al., Nature, 393: 480 (1998))。この共刺激シグナルのこのメカニズムは、DC (APC) によるB7および関連IL-6/IL-12産生の上向き調節を含むと思われる。したがってCD40-CD40L相互作用は、シグナル1 (抗原/MHC-TCR) およびシグナル2 (B7-CD28) の相互作用を補足する。

【0175】

DC細胞を直接刺激するための抗CD40抗体の使用は、常態では炎症状況の外面で遭遇するかまたは非専門的APC (腫瘍細胞) により提示される腫瘍抗原に対する応答を増強すると予測される。これらの状況では、ThヘルプおよびB7同時刺激シグナルは、提供されない。このメカニズムは、抗原を間欠的に投与したDCベースの療法状況で、またはThエピトープが既知のTRA前駆体内に限定されなかった状況で用いられ得る。

【0176】

CT抗原ポリペプチドまたはその断片は、それらのネイティブ結合相手を単離するためにも用いることができる。このような結合相手の単離は、周知の方法により実施することができる。例えば単離されたCT抗原ポリペプチドは、支持体 (例えば、クロマトグラフィー媒質、例えばポリスチレンビーズまたはフィルター) に結合され、次に結合相手を含有する疑いのある溶液を支持体に適用することができる。CT抗原ポリペプチドと相互作用し得る結合相手が溶液中に存在する場合には、それは支持体結合CT抗原ポリペプチドと結合する。次に結合相手を単離することができる。

【0177】

本発明は、発現ベクター中のCT抗原cDNA配列の使用、ならびに宿主細胞および細胞株 (これらが原核生物 (例えば、大腸菌) または真核生物 (例えば、樹状細胞、B細胞、CHO細胞、COS細胞、酵母発現系および昆虫細胞中の組換えバキュロウイルス発現) である場合) をトランスフェクトすることを包含するということも認識されるであろう。特に有用なのは、哺乳類細胞、例えばヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、霊長類等である。それらは、広範な種々の組織型であり得るし、一次細胞および細胞株を含み得る。特定の例としては、樹状細胞、末梢血白血球、骨髓幹細胞および胚幹細胞が挙げられる。発現ベクターは、関連配列、即ち上記の核酸がプロモーターと作動可能に結合されることを必要とする。

【0178】

本発明は、予防接種のための核酸、ポリペプチドまたはペプチドの送達も意図する。ポリペプチドおよびペプチドの送達は、当分野で周知の標準予防接種プロトコルにしたがって成し遂げられ得る。別の実施態様では、核酸の送達は、*ex vivo*方法により、即ち対象から細胞を取り出し、細胞を遺伝子工学処理して、C T抗原を含有させ、そして工学処理細胞を対象に再導入することにより成し遂げられる。かかる手法の一例は、米国特許第5,399,346号に、そしてこの特許の包袋履歴に提出される参照書類に略記されている（これらはすべて、公的利用可能文書である）。概して、それは対象の細胞（単数または複数）中への遺伝子の機能的コピーの*in vitro*での導入、および遺伝子工学処理細胞（単数または複数）を対象に戻すことを包含する。遺伝子の機能的コピーは、遺伝子工学処理細胞（単数または複数）中の遺伝子の発現を可能にする調節要素の操作可能な制御下にある。多数のトランスフェクションおよび形質導入技法ならびに適切な発現ベクターは、当業者には周知であり、そのいくつかは、P C T出願W O 9 5 / 0 0 6 5 4に記載されている。ウイルスおよび標的リポソームのようなベクターを用いた*in vivo*核酸送達も、本発明により意図される。

10

【0179】

好ましい態様では、C T抗原をコードする核酸を送達するためのウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ポックスウイルス、例えばワクシニアウイルスおよび弱毒化ポックスウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルスおよびT yウイルス様粒子からなる群から選択される。外因性核酸を送達するために用いられてきたウイルスおよびウイルス様粒子の例としては、複製欠陥アデノウイルス（例えば、Xiang et al., *Virology* 219: 220-227, 1996; Eloit et al., *J. Virol.* 7: 5375-5381, 1997; Chengalvala et al., *Vaccine* 15: 335-339, 1997）、修飾レトロウイルス（Townsend et al., *J. Virol.* 71: 3365-3374, 1997）、非複製レトロウイルス（Irwin et al., *J. Virol.* 68: 5036-5044, 1994）、複製欠陥セムリキ森林熱ウイルス（Zhao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3009-3013, 1995）、カナリア痘ウイルスおよび高弱毒化ワクシニアウイルス誘導体（Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11349-11353, 1996）、非複製ワクシニアウイルス（Mos s, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11341-11348, 1996）、複製ワクシニアウイルス（M oss, *Dev. Biol. Stand.* 82:55-63, 1994）、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス（Davis e t al., *J. Virol.* 70: 3781-3787, 1996）、シンドビスウイルス（Pugachev et al., *Vir ology* 212: 587-594, 1995）およびT yウイルス様粒子（Allsopp et al., *Eur. J. Immu nol* 26: 1951-1959, 1996）が挙げられる。好ましい態様では、ウイルスベクターはアデノウイルスである。

20

30

【0180】

ある用途のための別の好ましいウイルスは、アデノ関連ウイルス、二本鎖D N Aウイルスである。アデノ関連ウイルスは、広範囲の細胞型および細胞種を感染させ得るし、複製欠損性になるよう工学処理することができる。それはさらに、熱および脂質溶媒安定性、造血細胞を含めた多様な系統の細胞における高形質導入頻度、ならびに重複感染抑制の欠如といった利点を有するため多数組みの形質導入を可能にする。アデノ関連ウイルスは、部位特異的様式でヒト細胞D N A中に組み込まれ、それにより挿入性突然変異誘発の可能性および挿入遺伝子発現の変動性を最小限にし得る。さらに、野生型アデノ関連ウイルス感染は、選定圧の非存在下で100より多い継代の間組織培養で継がれるが、これは、アデノ関連ウイルスゲノム組込みが相対的に安定した事象であることを意味する。アデノ関連ウイルスは、染色体外様式でも機能し得る。

40

【0181】

概して、その他の好ましいウイルスベクターは、非必須遺伝子が当該遺伝子に置き換えられた非細胞障害性真核生物ウイルスを基礎にしている。非細胞障害性ウイルスとしては、その生活環が、D N AへのゲノムウイルスR N Aの逆転写とその後の宿主細胞D N Aへのプロウイルス組込みを含むレトロウイルスが挙げられる。アデノウイルスおよびレトロウ

50

ウイルスは、ヒト遺伝子治療試験に関して承認されている。概して、レトロウイルスは、複製欠損性である（即ち、所望のタンパク質の合成を指示し得るが、感染性粒子を製造できない）。このような遺伝的に改変されたレトロウイルス発現ベクターは、*in vivo*での遺伝子の高効率性形質導入のための一般的実用性を有する。複製欠損性レトロウイルスを産生するための標準プロトコル（プラスミドへの外因性遺伝物質の組み入れの過程、プラスミドによるパッケージング細胞系のトランスフェクションの過程、パッケージング細胞系による組換えレトロウイルスの産生の過程、組織培地からのウイルス粒子の収集の過程、ならびにウイルス粒子による標的細胞の感染の過程を含む）は、Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual," W.H. Freeman Co., New York (1990) および Murry, E.J. Ed. "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991) に提示されている。 10

【0182】

好ましくは、上記の核酸送達ベクターは、（１）哺乳類細胞中へ転写され、翻訳されることができる、そして宿主中での免疫応答を誘導し得る外因性遺伝物質を含有し、ならびに（２）標的細胞、例えば哺乳類細胞の表面の受容体と選択的に結合し、それにより標的細胞への進入を獲得する配位子を表面に含有する。

【0183】

核酸が宿主中に *in vitro* で導入されるかまたは *in vivo* で導入されるかによって、細胞中に本発明の核酸を導入するための種々の技法を用いることができる。かかる技法としては、核酸-CaPO₄沈殿物のトランスフェクション、DEAEに関連した核酸のトランスフェクション、当該核酸を含めた上記のウイルスによるトランスフェクションまたは感染、リボソーム媒介性トランスフェクション等が挙げられる。ある種の用途のためには、特定の細胞に対して核酸を標的化するのが好ましい。このような場合、細胞中に本発明の核酸を送達するために用いられるビヒクル（例えば、レトロウイルスまたはその他のウイルス；リボソーム）は、それに結合されたターゲッティング分子を有し得る。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に特異的な抗体のような分子、または標的細胞上の受容体に対するリガンドは、核酸送達ビヒクルに結合されるか、またはその中に組み入れられ得る。好ましい抗体としては、癌関連抗原を、単独でまたはMHC分子との複合体として、選択的に結合する抗体が挙げられる。特に好ましいのは、モノクローナル抗体である。本発明の核酸を送達するためにリボソームが用いられる場合、エンドサイトーシスに関連した表面膜タンパク質と結合するタンパク質は、ターゲッティングのためにおよび／または取込みを促すために、リボソーム処方物中に組み入れられ得る。かかるタンパク質としては、特定の細胞型に向性であるキャプシドタンパク質またはその断片、周期中にインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし、細胞内半減期を強化するタンパク質等が挙げられる。当業者に既知であるように、高分子送達系も、細胞中に核酸を送達するために首尾よく用いられている。このような系は、核酸の経口送達さえ可能にする。 20 30

【0184】

投与される場合、本発明の治療用組成物は、薬学的に許容し得る調製物中で投与され得る。このような調製物は、薬学的に許容し得る濃度の塩、緩衝剤、防腐剤、相溶性担体、補助免疫強化剤、例えばアジュバントおよびサイトカイン、ならびに任意にその他の治療剤をルーチンに含有し得る。 40

【0185】

本発明の治療薬は、注射を含めた任意の慣用的経路により、または長時間に亘る漸進的注入により投与することができる。投与は、例えば経口的、静脈内、腹腔内、筋内、腔内、皮下または経皮的であり得る。抗体が治療的に用いられる場合、好ましい投与経路は、肺エーロゾルによる。抗体を含有するエーロゾル送達系を調製するための技法は、当業者には周知である。一般に、このような系は、抗体の生物学的特性、例えばパラトープ結合能力を有意に損傷しない構成成分を利用すべきである（例えば、Sciarra and Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp 1694-17 50

12参照、この記載内容は参照により本明細書中に援用される)。当業者は、過度の実験に頼ることなく、抗体エーロゾルを生成するための種々のパラメータおよび条件を容易に決定し得る。本発明のアンチセンス調製物を用いる場合には、緩徐静脈内投与が好ましい。

【0186】

本発明の組成物は、有効量で投与される。「有効量」とは、単独でまたはさらなる用量とともに、所望の応答を生じる、例えば癌関連抗原に対する免疫応答を増大する癌関連抗原組成物の量である。1つまたはそれ以上の癌関連抗原の発現により特徴づけられる特定の疾患または症状、例えば癌を治療する場合には、望ましい応答は、疾患の進行の抑制である。これは、疾患の進行を一時的に遅くすることのみを包含し得るが、さらに好ましくは、永続的に疾患の進行を停止させることを含む。これは、ルーチン法により監視することができ 10
るし、あるいは本明細書中で考察される本発明の診断方法により監視することができる。疾患または症状の治療に対する望ましい応答は、疾患または症状の発症を遅らせることでもあり、あるいは発症を防止することでさえある。

【0187】

かかる量は、当然ながら、治療中の特定の症状、症状の重篤度、年齢、体調、サイズおよび体重を含めた個々の患者パラメータ、治療の継続期間、併用治療の性質(もしあれば)、特定の投与経路、ならびに健康従事者の知識および専門的技術の範囲内の同様の剤によって 20
いる。これらの剤は、当業者には周知であって、ルーチンに過ぎない実験を用いて扱われ得る。個々の構成成分またはその組合せの最大用量が用いられるのが、即ち健全な医学的判断による最大安全用量が用いられるのが一般に好ましい。しかしながら、患者は、医学的理由、心理学的理由、または事実上あらゆるその他の理由のために低用量または耐容可能用量を主張し得るということが当業者には理解されよう。

【0188】

上記の方法に用いられる医薬組成物は、好ましくは滅菌性であり、患者への投与に適した重量または容量の単位での所望の応答を得るための有効量の癌関連抗原または癌関連抗原をコードする核酸を含有する。応答は、例えば遺伝子発現のような下流作用を測定することによって、または腫瘍の後退または疾患症状の低減といった癌関連抗原組成物の生理学的作用を測定することによって、レポーター系を介して癌関連抗原組成物の投与後の免疫 30
応答を決定することにより測定することができる。その他の検定は当業者に既知であり、応答のレベルを測定するために用いることができる。

【0189】

対象に投与される癌関連抗原組成物(例えば、ポリペプチド、ペプチド、抗体、細胞または核酸)の用量は、異なるパラメータにしたがって、特に用いられる投与方式および対象の状態にしたがって選定することができる。その他の剤としては、所望の治療期間が挙げられる。対象における応答が適用された初期用量で不十分である場合には、患者の耐容性が許す程度まで、より高用量(または異なるより局在化された送達経路による有効高用量)を用いることができる。

【0190】

概して、免疫応答を引き出すかまたは増大するための治療に関しては、癌関連抗原の用量が処方され、当分野の任意の標準手法により、1 ng~1 mgの、好ましくは10 ng~ 40
100 μgの用量で投与される。癌関連抗原またはその変異体をコードする核酸が用いられる場合、標準手法にしたがって1 ng~0.1 mgの用量が一般に処方され、投与されるであろう。癌関連抗原組成物の投与のためのその他のプロトコルは当業者には既知であり、その場合、投与量、注射計画、注射部位、投与方式(例えば、腫瘍内)等は、上記とは変わる。例えば試験目的または獣医学的治療目的のためのヒト以外の哺乳類への癌関連抗原組成物の投与は、上記と実質的に同一条件下で実行される。

【0191】

CT抗原ペプチドが予防接種用に用いられる場合、抗原に対する免疫応答が増大されるように、癌関連抗原およびアジュバントを効率的に送達する投与方式が用いられ得る。アジュバント中の癌関連抗原ペプチドの投与のためには、好ましい方法としては、皮内、静脈 50

内、筋肉内および皮下投与が挙げられる。これらは好ましい実施態様であるが、しかし本発明は、本明細書中に開示された特定の投与方式に限定されない。当分野の標準的参考文献（例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990）は、免疫原をアジュバントとともに、または非アジュバント担体中で送達するための投与方式および処方物を提供する。

【0192】

投与される場合、本発明の医薬製剤は、薬学的に許容し得る量で、ならびに薬学的に許容し得る組成物で適用される。「薬学的に許容し得る」という用語は、活性成分の生物学的活性の有効性を妨げない非毒性物質を意味する。このような調製物は、塩、緩衝剤、防腐剤、相溶性担体および任意にその他の治療薬をルーチンの含有し得る。薬剤中に用いられる場合、塩は製薬上許容可能であるべきであるが、非製薬上許容可能塩は、その薬学的に許容し得る塩を調製するために便利に用いることができるし、本発明の範囲から除外されない。このような薬理学的および薬学的に許容し得る塩としては、以下の酸：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、蟻酸、マロン酸、コハク酸等から調製されるものが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、薬学的に許容し得る塩は、アルカリ金属またはアルカリ土類金属塩として、例えばナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩として調製することができる。

10

【0193】

癌関連抗原組成物は、所望により薬学的に許容し得る担体と組合せられ得る。本明細書中で用いられる「薬学的に許容し得る担体」という用語は、ヒトへの投与に適した1つまたはそれ以上の相溶性固体または液体充填剤、希釈剤または封入物質を意味する。「担体」という用語は、活性成分がそれと組合せられて適用を促進する天然または合成の、有機または無機成分を意味する。医薬組成物の構成成分は、所望の製薬効力を実質的に減損する相互作用が存在しないような方式で、本発明の分子と、そして互いに混合することができる。

20

【0194】

医薬組成物は、適切な緩衝剤、例えば塩の酢酸、塩のクエン酸、塩のホウ酸および塩のリン酸を含有し得る。

医薬組成物は、任意に、適切な防腐剤、例えば塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベンおよびチメロサルも含有し得る。

30

医薬組成物は、単位投与態様で提示されるのが便利であり得るし、製薬分野で周知の方法のいずれかにより調製することができる。すべての方法が、1つまたはそれ以上の補助成分を構成する担体と活性剤を会合させる過程を含む。概して、組成物は、均一にかつ密接に活性化化合物を液体担体、微粉固体担体または両方と会合させることにより、そして次に、必要な場合には、生成物を造形することにより調製される。

【0195】

経口投与に適した組成物は、各々が予定量の活性化化合物を含有する、カプセル、錠剤、ロゼンジのような離散単位として提示することができる。その他の組成物としては、水性液体または非水性液体中の懸濁液、例えばシロップ、エリキシルまたはエマルションが挙げられる。

40

【0196】

非経口投与に適した組成物は、好ましくはレシipientの血液と等張である、CT抗原ポリペプチドまたは核酸の滅菌水性または非水性調製物を含むのが便利である。この調製物は、適切な分散剤または湿潤剤および沈澱防止剤を用いて既知の方法により処方することができる。滅菌注射可能調製物は、例えば1, 3-ブタンジオール中の溶液のような、非毒性非経口的に許容し得る希釈剤または溶媒中の滅菌注射可能溶液または懸濁液でもあり得る。用いることのできる許容し得るビヒクルおよび溶媒に、水、リンガー液および等張塩化ナトリウム溶液がある。さらに、滅菌固定油は、溶媒または懸濁媒体として用いられるのが便利である。この目的のために、合成モノーまたはジグリセリドを含めた任意の無刺激固定油が用いることができる。さらに、脂肪酸、例えばオレイン酸は、注射可能薬物

50

の調製物中に用いることができる。経口、皮下、静脈内、筋内投与等に適した担体処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PAに見出すことができる。

【0197】

核酸に関して本明細書中で用いる場合、「単離された」という用語は、(i) 例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により *in vitro* で増幅されるか、(ii) クローニングにより組換え的に生産されるか、(iii) 例えば切断およびゲル分離により精製されるか、または (iv) 例えば化学合成により合成されることを意味する。単離された核酸は、当分野で周知の組換え DNA 技術により容易に操作可能であるものである。したがって、5' および 3' 制限部位が既知であるか、またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) プライマー配列が開示されているベクター中に含入されたヌクレオチド配列は、単離されたものとみなされるが、その天然宿主中にそのネイティブ状態で存在する核酸配列はそうではない。単離された核酸は実質的に精製することができるが、そうである必要はない。例えば、クローニングまたは発現ベクター内で単離される核酸は、それが存在する細胞中の物質を極小パーセンテージのみ含み得るという点で純粋ではない。しかしながらこのような核酸は、当業者に既知の標準技法によりそれが容易に操作されるため、その用語が本明細書中で用いられるように、単離される。単離された核酸とは、本明細書中で用いる場合、天然染色体ではない。

10

【0198】

ポリペプチドに関して本明細書中で用いる場合、「単離された」とは、そのネイティブ環境から分離され、その同定または使用を可能にするのに十分な量で存在することを意味する。単離されたとは、タンパク質またはポリペプチドを指す場合、例えば、(i) 発現クローニングにより選択的に産生されるか、あるいは (ii) 例えばクロマトグラフィーまたは電気泳動により精製されることを意味する。単離されたタンパク質またはポリペプチドは実質的に純粋であってもよいが、そうである必要はない。「実質的に純粋」という用語は、タンパク質またはポリペプチドが、それらが天然にまたは *in vivo* 系で、それらの意図された使用のために実際的および適切な程度に見出されることができるその他の物質を本質的に含有しないことを意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、当分野で周知の技法により産生することができる。単離されたタンパク質は薬学的に許容し得る担体とともに医薬製剤中に混合することができるため、タンパク質は小重量%の調製物のみを構成し得る。タンパク質は、それが生きている系に関連し得る物質から分離されたという点で、それでもなお単離される、即ち、他のタンパク質から単離される。

20

30

【0199】

例

例 1: CT 抗原の特定

CT 抗原の癌ワクチンの開発のターゲットとしての可能性について、多大なる関心が払われ、そして、変異抗原およびウィルスコード抗原以外のものとして、CT 抗原は、明らかに、今日までに見出されたもののうち最も特異的な腫瘍抗原として位置づけられている。しかし、CT 抗原は、癌およびその病気におけるその進行を考えるための新たな道を与える。

40

【0200】

この考え方の出発点は、以下の事実、すなわち CT 抗原の発現は、初期生殖細胞の成長過程および癌に限られるということである。生殖細胞によって配偶子 (卵母細胞および精母細胞) および栄養膜細胞が生じ、これらは絨毛膜および胎盤の形成に参与する。初期生殖細胞は、卵黄嚢壁に生じ、卵形成の間に将来的に性腺部位となる場所に移行する。卵形成において、そのプロセスは出生前に始まり、卵原細胞は一次卵母細胞に分化する。一次卵母細胞は、胎児の発育の間に最大数に達するが、これは減数分裂の初期段階において捕獲され、排卵および精子形成において初めて減数分裂を再開し、完了する。対照的に、精子形成は成熟期に始まり、連続的な有糸分裂のプロセスであり、精母細胞のプールおよび減数分裂を保ち、成熟精子群を生じせしめる。プロアクロソーム結合タンパク質前駆体であ

50

るSCP-1およびOYTES-1のように、CT抗原が配偶子形成において重要なものは明らかであり、そして他のCT抗原であって配偶子に発現が限定されているものおよび栄養膜細胞も、配偶子細胞の初期成長において重要な役割を果たしていると考えられる。

【0201】

癌におけるCT発現の異常を説明し得る可能性の一つは、ある種の癌に関連する全体的なデメチル化に関連する(42)。MAGE遺伝子のプロモーター領域は転写活性化因子との結合部位を有しており、かかる結合部位は正常体細胞においてはメチル化されるが、MAGE発現癌細胞および精巣においてはデメチル化される。したがって、癌関連デメチル化によってCT(MAGE)発現を説明できる可能性があるが、頻繁に観察される、多くの腫瘍における異なるCT抗原の非調和的な発現パターン(セット)を、それによって完全に説明することはできない。また、ある種の腫瘍における極めて異質なCT発現(34、43)も、全体的なデメチル化プロセスによって完全に説明することはできない。 10

【0202】

癌におけるCT発現の再活性化の他のメカニズムは、CT遺伝子の調節領域における変異に関連する。今日までにCT遺伝子における変異は見出されていないが、より伸長されたシーケンシング、とくにプロモーター領域におけるシーケンシングがなされて初めてその可能性が排除される。しかし、CT遺伝子の変異は、癌におけるCT発現の誘導の通常のメカニズムであるとは考えにくい。

【0203】

CT抗原の発生を説明し得る他の可能性は、癌における配偶子形成プログラムの誘導または活性化である。この考え方によれば、癌に見出される異なるCTセットが対応するCT抗原セットであって、配偶子形成または栄養膜細胞の異なるステージにおいて通常発現されるものを複製することになる。配偶子形成プログラムを誘導する解発事象は、生殖細胞の発達における、未だ特定されていないマスタースイッチにおける変異である可能性があり、または癌遺伝子、抑制遺伝子、または癌における他の遺伝子における閾値以上および/または変異による、このマスタースイッチ活性化であり得る。単一のCT遺伝子の活性化が、配偶子形成プログラム他の遺伝子の活性化のスイッチである可能性もある。この考えを支持する証拠は滑膜肉腫の研究に見出され、それによれば第18染色体のSYT遺伝子およびX染色体上のSSX-1またはSSX-2遺伝子に関連する転座事象が関連性を有しないCT抗原、NYESO-1およびMAGEの発現に関与している(44、45) 30

この理論構築を延長し、それをCT抗原の発生におけるデメチル化の役割に関連づけると、癌(原因とは無関係に)におけるデメチル化の状態によって配偶子形成プログラムを誘導し、サイレントなCT遺伝子の活性化につながる。一方、デメチル化は配偶子形成プログラムの生得的な部分であり、それは配偶子形成プログラムおよび癌におけるCT遺伝子がスイッチングされた結果であって、原因ではないとすることも可能である。

【0204】

癌におけるCT抗原再活性化発現メカニズムに関する疑問点に加えて、他に重要な問題は、癌におけるこれらの遺伝子が、その悪性挙動に関与しているか否かである。配偶子、栄養膜細胞および癌が、これらの細胞に限定される抗原の一群を共通に有しているという発見は、他の共通する特性を見出すためのより広範な研究の動機付けとなっている。 40

【0205】

栄養膜細胞と癌との間に生物学的特性上の類似点があることによって、スコットランドの発生学者であるJohn Beardは、前世紀の末期に癌の栄養膜細胞理論(trophoblastic theory of cancer)(46、47)を提唱するに至った。彼の理論によれば、癌は、性腺に移動する途中にあるかまたは性腺に捕獲された配偶子細胞から生じる。発癌性の刺激により、前記細胞は悪性の栄養膜細胞への転換を受ける。これらの悪性栄養膜細胞は、器官の種類に依存して常駐細胞の型(resident cell types)を取るが、結果的に生じる癌は、細胞の由来である場所や態様上の差異の程度とは無関係に、栄養膜細胞由来のものである。Beardによれば、癌の侵襲的特性、破壊的特性、そして転位性特性は、栄養膜細胞が通常示す機能、例えば血管の侵襲、子宮壁への成長、および子宮を越えた拡散、に帰着される 50

。現代の考え方からは、Beardの癌は捕獲された配偶子細胞に由来するという着想は、血清学的マーカーおよび分子マーカーであって、正常分化およびそれらの保存の異なる経路を癌において区別するものに関して増大する我々の情報とは相容れないものである。栄養膜細胞と癌とが共通の特性を有しているというBeardの理論は、常駐癌における配偶子形成プログラムの誘導によって、異常型配偶子細胞から生じるとするより明快に説明される。しかし、最終的な結果は、同様であるといえる。すなわち、配偶子形成および栄養膜細胞の発達を受ける細胞の選択された特性によって、体細胞は変質を受ける。

【0206】

C T 抗原に加えて、配偶子細胞および癌には他にも共通する特性が認められている。例えば、S C P-1 は減数分裂プログラムにおける重要な因子であるが、これは非配偶子細胞癌に発現される。体細胞における減数分裂の誘導は、正常であれ異常であれ、染色体の混乱状態 (chromosomal anarchy) につながり、これは成長した癌の第一の特徴である。したがって、減数分裂に特有に関連し、癌において発現される他のタンパク質も C T 抗原の候補として認識される。

10

【0207】

O Y-T E S-1 は、プロアクロシン結合タンパク質前駆体であり、精子形成につながる特有のプログラムに関与するものであるが、C T 抗原として認識されている。したがって、他の成熟精子に特有な、癌における遺伝子産物も C T 抗原の候補として認識される。

【0208】

さらに、栄養膜細胞による C T 抗原の発現によって、旧来の問題が新たに脚光を浴びた。研究が進んだ、ヒト癌における、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (H C G) および他の栄養膜細胞ホルモン (trophoblastic hormones) の散発的産生である (例えば 48、49、50)。癌による H C G の産生は、一般に癌遺伝子における遺伝の不安定さを示唆する他の根拠であるともみなされていて、かかる不安定さとは、発癌期および腫瘍進行期においてサイレント遺伝子をランダムかつ悪性に活性化する結果をもたらすことである。しかし、それを癌における配偶子/栄養膜細胞プログラムの誘導の結果であり、C T 抗原の半調整的発現にもつながるものであるともみなすことも可能である。このプログラムの活性化は、癌に生殖細胞、配偶子細胞、および栄養膜細胞の他の特性を付与することになるが、これらを正確に関連づけることはさらに困難である。しかし、不死、侵襲性、接着の欠如、移行挙動、血管の誘導、デメチル化および M H C の下方調節は、癌と生殖細胞/配偶子細胞/栄養膜細胞分化経路を経る細胞とが共通して有している特性である。癌の転移性も、生殖細胞の移動性と対応するものである可能性があり、通常、栄養膜細胞が、他の器官、例えば肺に、通常、妊娠期に移行するが、ある時期に退縮する性質に対応するものである可能性がある。

20

30

【0209】

癌における、配偶子形成特性の発現につながるプログラムの変換に関する考え方を追求するにあたり、「癌における配偶子形成プログラム」 ("Gametogenic Program Induction in Cancer" (G P I C)) と題された仮説が提唱され、それによれば生殖細胞の発達に関与している少なくとも4つの異なる経路の区別がなされる可能性がある: A) 生殖細胞から生殖細胞へ、B) 生殖細胞から卵原細胞へ、そして卵細胞へ、C) 生殖細胞から精原細胞へ、そして精子へ、および D) 生殖細胞から栄養膜細胞へ。減数分裂プログラムは、B および C に共通するが、O Y-T E S-1 のようなタンパク質は C に限定され、そして H C G は D に特有のものであると考えられる。これらの経路および究極的には各経路のステージを区別する理由は、C T 抗原の種々のパターンまたはセットが異なる癌においてみられ、このことは生殖細胞プログラム、例えば経路およびステージであってこれらの癌において誘導されるもの、を反映するものであるかもしれないからである。

40

【0210】

この背景および枠組みによって配偶子形成と癌の発達との関係について考察するにあたり、数多くの取る得るアプローチの方法があり、さらなる C T 抗原を特定することができる。

50

【0211】

1. 新たなCT抗原の探索が数種の方法を用いて達成され、これはSEREX（例えば参考文献10を参照）、とくに精巣からのライブラリー、正常もしくは異常な栄養膜細胞からのライブラリー、または腫瘍もしくは腫瘍セルライン（デメチル化試薬存在下または非存在下にて成長しているもの）であって各種CT抗原を発現するものからのライブラリーによって、および発現差解析法（representational difference analysis）を拡張的に用いて達成される。バイオインフォマティクスおよびチップテクノロジーを用いれば、データバンクから転写物であって癌／配偶子／栄養膜細胞を示すものを探り出すことができる。

【0212】

2. 既知のCT抗原の、正常配偶子形成および栄養膜細胞の発達における発現パターンを決定し、マーカーであって異なる経路およびステージであって正常配偶子形成プログラムにおけるものを区別するものを特定する。この情報によって、CT抗原発現の複雑なパターンの解析が得られ、CT表現型に基づく癌を分類する新たな方法が得られる。

【0213】

3. 個々のCT抗原であって異なる型の腫瘍におけるものの発現頻度が、今日までに知られているCT抗原について特定されている。本明細書に記載されている方法によって特定されたCT抗原の発現頻度を解析することに加えて、さらなる情報として個々の腫瘍の複合されたCT発現型、およびこれらの複合されたCT発現型パターンが、由来の異なる腫瘍においてみられる頻度が集められる。治療上のデータ、遺伝子型データ、表現型データおよびCT抗原発現データを個々の腫瘍について集めたデータベースが確立されているため、個々の腫瘍の特性を比較し、前記データとの相関を調査する目的に用いることができる。この情報によって、CT発現と腫瘍の他の生物学的特性、例えば成長速度、局所的かまたは浸潤性か、一次か転移性か、同一の患者における異なる転移腫瘍であるかなど、との相関を調べることができる。

【0214】

4. 癌のライフヒストリーのどのステージにおいてCT（配偶子形成）の特性が誘導されるかを決定するには、マウスモデル系、ヒト細胞を用いたインビトロ系、または自然発生によるヒトの腫瘍であって、腫瘍の進行における漸進的段階を示すものを用いることが可能である。上記において議論したように、CT発現はより大きい悪性の発症である。

【0215】

5. CT抗原の発現が、多くのヒトの癌において不均一であることを理解する必要がある。これは、CT⁺およびCT⁻細胞におけるmRNA／タンパク質レベルの定性的差異を反映するものであるかもしれないし、またはCTmRNA／タンパク質発現に関するCT⁺およびCT⁻細胞間の定性的差異があるかもしれない。レーザー分解顕微鏡（Laser dissection microscopy）は、この問題を解決する一つの方法かもしれないし、CT発現が不均一な腫瘍からの腫瘍細胞のクローニングは、不均一な発現を理解するための別法である。確立されたヒト癌セルラインは、CT抗原発現を、対応する腫瘍の型、とくにCT発現頻度が低い腫瘍、のCTタイピングから予想されるより、より高いCT頻度を示すとされる印象が増大している。このことはインビトロ培養の二次的な結果かもしれないし、またはCT⁺細胞（それらは腫瘍の一部を占める群にすぎないが）は、インビトロにおいて増殖する際の成長する上での優位性を有し、おそらくインビボにおいてもそうであるかもしれない。

【0216】

6. CT抗原は配偶子形成プログラムおよび癌との間の密接な結びつきを供するものであるが、配偶子の発達における他の差別化特性を癌が発現するか、そしてCT抗原発現との相関を有するかが決定されている。過去30年間の、ある種のヒト癌によるHCG産生に関する多くの報告によって、この問題を解明し、HCGの産生がCT抗原発現、とくにCT抗原発現の独自のパターン、例えば栄養膜細胞プログラムを反映するようなパターン、と相関を有するかを問うための、特定の出発点が供される。

10

20

30

40

50

【0217】

7. 遺伝子改変およびノックアウトアプローチであって、マウスCT対応部分(counterpart)を用いるもの、およびトランスフェクション解析であってCTコード遺伝子であって正常および悪性ヒト細胞を用いるアプローチを実施することによって、配偶子形成および栄養膜細胞の成長におけるCT抗原の役割および癌における機能的な重要性が特定される。

【0218】

例2: CT遺伝子産物の特定

新たなCT抗原遺伝子産物を特定するために、ESTおよびジェンバンクデータベースの両方の編集物であるユニジェンデータベース(Unigene database)を探索し、癌を有する精巣および正常精巣に特有に発現される転写産物を求めた。これに続く、候補転写産物のRT-PCR解析によって、数種の遺伝子産物を特定したが、これらは高度に限定されたmRNA発現パターンを有し、新たに特定された3種のCT遺伝子を含んでいた。

【0219】

方法と材料

癌・精巣関連油にユニジェンクラスターのバイオフィンフォーマティックスによるな特定癌ゲノム解析プロジェクト(<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler>)のcDNA Xプロファイラツールを用いてユニジェンデータベースを以下のようにして探索した。まず、発現シークエンスタグ(EST)2つのプールを構築した。プールAは6個の正常精巣cDNAライブラリーに由来するESTからなり、そしてプールBは188個の腫瘍由来cDNAライブラリー(全ての組織学的な型)に由来するESTからなるものであった。Xプロファイラ検索エンジンを、プールAおよびプールBの両方からのESTを含むそれらのユニジェンクラスターを特定するように方向付けし、そして他の全ての正常組織cDNAライブラリーからのESTを含むユニジェンクラスターを除いた。得られたユニジェンクラスターの組織発現パターンの解析も、インシリコの遺伝子発現連続解析(SAGE)によって、SAGE:各ユニジェンクラスターエントリーに関連する、遺伝子をタグにマッピングするためのツール、を用いて行った。既知の遺伝子産物に対するそれらの関係を、ヌクレオチドおよびタンパク質データベースのBLASTサーチ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)または推定されるタンパク質への翻訳のモチーフ解析(<http://motif.genome.ad.jp>)によって決定した。さらに、全ての認識されたユニジェンクラスターからの代表的なESTのBLASTサーチを実施し、それはヒトゲノム配列データベースに対してであり、ゲノムマッピング情報を得て、そしてイントロン/エクソンの境界をPCRプライマーデザインを用いて決定した。

【0220】

逆転写酵素PCR(RT-PCR)解析

20個の異なる正常ヒト組織からの総RNAをClontech Laboratories Incorporated(Palo Alto, Calif.)およびAmbion Incorporated(Austin, Tex.)から購入した。腫瘍組織は外科手術由来の標本であり、Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Weill Medical College of Cornell UniversityおよびKrankenhaus Nordwest(Frankfurt, Germany)から得た。腫瘍組織からの総RNAはグアニジニウムチオシアネート法によって調製した。

【0221】

RT-PCR反応においてテンプレートとして用いるcDNAの調製は、Superscript first strand synthesis kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.)を用いて行った。cDNAの合成は、5 µgの総RNAを、40 µl 1X逆転写酵素バッファであってランダムヘキサマー100 ng、0.5 mMのdNTP、5.0 mMのMgCl₂、1.0 µMのDTT、80 Uのリボヌクレアーゼ阻害剤および100 Uのスーパースク립トII逆転写酵素を含むものの中で、42 °Cにて50分間インキュベートすることによって行った。ゲノムDNAの増幅程度を評価するためのコントロールテンプレートの調製は、逆転写酵素を欠如した複製サンプルとして行った。

【0222】

オリゴヌクレオチドプライマーであって選択されたユニーククラスターに存在するものと相同のものを商業的に (Invitrogen Life Technologies) 合成した。

【0223】

【化1】

CT15 順方向: 5' AGGAATTATGAAACCACTTG (配列番号 :1)

CT15 逆方向: 5' GACAACAGTTGTATCAGACC (配列番号 :2)

CT16 順方向: 5' CAAGGAGAGGTCGTGTCTTCG (配列番号 :3)

CT16 逆方向: 5' GGATCTTGTTACATGCTCACTCATATC (配列番号 :4)

10

CT16.2 順方向: 5' CCAGATTAAGAATAACGTTC (配列番号 :5)

CT16.2 逆方向: 5' AGAGGAAATGACCAAGAGTC (配列番号 :6)

CT17 順方向: 5' ACAAGACTAGCTTATGTGTGG (配列番号 :7)

CT17 逆方向: 5' TTGAGCAAGAATCTTGACTTC (配列番号 :8)

【0224】

R T - P C R は以下のように行った。25 μ l の P C R 反応混合物であって、2 μ l の c D N A (または2.0 μ l のゲノム D N A 増幅コントロール)、0.2 mM の d N T P、1.5 mM の M g C l₂、0.25 μ M の遺伝子特異的フォワードおよびリバースプライマー、および2.5 U の白金 T a q D N A ポリメラーゼ (Invitrogen Life Technologies) からなるものを94℃に2時間加熱し、その後34回のサーマルサイクルに付し、それは94℃で30秒間、55℃で30秒間および72℃で1分間であり、そして最終サイクルを94℃で30秒間、55℃で30秒間および72℃で5分間とした。サーマルサイクリングはABI 7700 Sequence Detectorを用いて行った。得られたP C R産物の解析を、2%アガロース/T r i s - 酢酸 - E D T A ゲルにおいて行い、特定結果をD N A をシーケンシングすることによって確認した。

20

【0225】

リアルタイム定量的逆転写 (R T) P C R

30

総R N A サンプルであって8個の異なる正常成人組織から得たものおよび8個の腫瘍標本から得たものを調製し、上記のように逆転写させてc D N A を得た。遺伝子特異的T a q M a n プローブおよびP C R プライマーを設計したが、これにはPrimer Express software (PE Biosystems, Foster City Calif.) を用い、商業的に (PE Biosystems) 行った。関連するt a q m a n プライマーの組およびプローブのD N A 配列は以下の通りである。

【0226】

【化2】

CT15taqman : 5' GGGAGTATTGACAGTGGCAATTT (配列番号 :9)

CT15taqman reverse: 5' TGTCTCAATGTAGCGCCTTTC (配列番号 :10)

CT15taqman プローブ: 5' CCACCTGTAGCTATACCAGCCAGACTCCC (配列番号 :11)

CT16taqman 順方向: 5' GCAGAGTCCCCTCCCTGAC (配列番号 :12)

CT16taqman 逆方向: 5' ACAGGAAGTGGCTCTGCTTAAGA (配列番号 :13)

CT16taqman プローブ: 5' TCAGGACCATCTCCAGGTGCATCCTC (配列番号 :14)

CT17taqman 順方向: 5' CCAGAGTCTCATGTAAAATCACTTACA (配列番号 :15)

CT17taqman 逆方向: 5' GAAACACTTCCTCTCTTTCTTTAAGTACAA (配列番号 :16)

CT17taqman プローブ: 5' ACCCAGAAAGACCACCACTTTGCAGGTA (配列番号 :17)

10

20

30

40

50

【0227】

マルチプレックスPCR反応物の調製は、2.0 μ l のcDNA (または2.0 μ l のゲノムDNA増幅コントロール)を、TaqManユニバーサルPCRマスターミックスであって、200 nMのFam (6-carboxy-fluorescein)を遺伝子特異的なTaqManプローブによってラベルしたもの、300~900 nMの遺伝子特異的フォワードおよびリバースプライマー (予め決定した至適濃度)、Vicラベルしたヒトベータグルクロニダーゼ、またはホスホグリセロキナーゼ内部コントロールプローブ/プライマー混合物 (特許にかかる色素、PE Biosystems)を加えたものに希釈したものをを用いて行った。6個の25 μ l PCR反応物を、各cDNAサンプル (各内部コントロールに3個)に調製した。PCRサイクルは40サイクルであって、95 $^{\circ}$ C (15秒間)の変性および60 $^{\circ}$ C (60秒間)のアニーリング/伸長によって構成した。サーマルサイクリングおよび蛍光モニターは、ABI 7700 シークエンスアナライザ (PE Biosystems)を用いて行った。一定の閾値以上のPCR産物が初めて検出されるインターバルをサイクル閾値 (Ct)と称し、これを各サンプルにつき決定し、そして3反復サンプルの平均を記録した。遺伝子特異的転写産物のコピー数をRNA出発物質1 μ gあたりとして求めたが、これはCt値の標準曲線との比較によって行った。前記Ct値の標準曲線は既知濃度の、相同遺伝子産物をコードするcDNAから決定した。総RNAサンプル中に存在するmRNAの量を標準化するために、内部コントロールから得たCt値を遺伝子特異的Ct値から減じた ($\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{VIC}$)。3反復のリアルタイムRT-PCRによって、2組の3つの ΔCt 値が各RNAサンプルに与えられ (内部コントロール1個につき1組)、そして6個の ΔCt の平均値を計算した。遺伝子特異的mRNA濃度のうち、正常組織由来または腫瘍組織由来のものを正常精巣に対して計算したが、これは標準化したCtを同様に扱い ($\Delta \Delta Ct = \text{正常組織または腫瘍組織の} \Delta Ct - \text{正常精巣の} \Delta Ct$ 、そして相対濃度 (相対濃度 = $2^{-\Delta \Delta Ct}$)を求めることによって行った。標準化した総RNA 1 μ gあたりの転写産物のコピー数の計算は各cDNAサンプルの平均相対濃度に精巣組織におけるコピー数を乗じるによって行い、精巣組織におけるコピー数は標準曲線から求めた (コピー数 = $2^{-\Delta \Delta Ct} \times \text{精巣組織におけるコピー数}$)。

【0228】

結果

バイオインフォマティクス解析

1325個の異なるユニーククラスターであって、CT抗原に類似したインシリコ発現プロファイルを有するものが特定され、これはユニークデータベースを発現シークエンスタグ (EST)であって、腫瘍組織および正常精巣のcDNAライブラリーに限定的に由来するものを含む遺伝子クラスターを探索することによって行われた。これらの癌・精巣関連ユニーククラスターは、61個の既知の遺伝子および1264個の非特徴的 (un

characterized) 遺伝子を示していた。表 2 に示すように、ユニジーンクラスターを 2 つのカテゴリーに分類した。グループ I は 8 5 9 個の異なる遺伝子クラスターからなり、精巣および腫瘍 c D N A ライブラリーに限定的に由来するものを含むものであり、これを癌・精巣 (C T) 関連ユニジーンクラスターと称した。グループ I I は 4 0 0 個の異なる遺伝子クラスターからなり、精巣および生殖細胞腫瘍 (他の型の癌は含まない) c D N A ライブラリーに限定的に由来するものを含むものであり、これを精巣関連ユニジーンクラスターと称した。他の 6 6 個の遺伝子クラスターはさらに追求しなかったが、その理由はそれら個々のユニジーンデータベースエントリーが本研究の最中に改変されたか、または既知の遺伝子産物に関する文献報告によって、それらが精巣以外の他の正常組織においても発現することが示唆されていたからである。ユニジーンデータベースに従って、本研究においては特異的遺伝子クラスターを Homo sapiens. 数字による記載 (例: H s. 1 2 3 4 5 6) によって指定した。

10

【0 2 2 9】

【表 3】

表 2 癌/精巣関連ユニジーンクラスターのインシリコによる分類

ユニジーンクラスターのカテゴリー	カテゴリーの説明	サブカテゴリー	サブカテゴリーの説明	各サブカテゴリーにおけるユニジーンクラスターの数
グループ I	癌/精巣関連ユニジーンクラスター: 精巣 (または生殖細胞腫瘍) および腫瘍由来 c D N A ライブラリーからの E S T のみを含む	IA	S A G E タグが、腫瘍および/またはセルライン S A G E ライブラリーにのみ存在	311
		IB	信頼できる S A G E タグなし	265
		IC	S A G E タグが、通常組織由来セルライン S A G E ライブラリーに存在	283
グループ I I	精巣関連ユニジーンクラスター: 精巣および生殖細胞腫瘍由来 c D N A ライブラリーからの E S T のみを含む	IIA	S A G E タグが、腫瘍および/またはセルライン S A G E ライブラリーにのみ存在	139
		IIB	信頼できる S A G E タグなし	171
		IIC	S A G E タグが、通常組織由来セルライン S A G E ライブラリーに存在	90

20

30

【0 2 3 0】

グループ I およびグループ I I ユニジーンクラスターの m R N A の発現パターンのさらなる解析を、インシリコ遺伝子発現連続解析 (S A G E) によって行った。表 2 に示すように、グループ I およびグループ I I ユニジーンクラスターのサブグループとして A、B および C に再分割したが、これは相同の S A G E タグの存在および組織分布に基づいて行った。サブグループ I A および I I A は、S A G E タグとして腫瘍および/またはセルライン由来の S A G E ライブラリーにのみ存するものを有している。サブグループ I B および I I B は、信頼できる S A G E タグを有していない。サブグループ I C および I I C は、S A G E タグとして、正常組織 S A G E ライブラリーに存するものを有している。4 個の既知の癌・精巣抗原が 1 3 2 5 ユニジーンクラスターに特定され、これは C T 1 1 p / H s. 2 9 3 2 6 6 (グループ I A)、G A G E 4 / H s. 1 8 3 1 9 9 (グループ I B)、M A G E B 1 / H s. 7 3 0 2 1 (グループ I C)、および S A G E / H s. 1 9 5 2 9 2 (グループ I I A) を含むものであった。

40

【0 2 3 1】

組織限定的 m R N A 転写物の R T - P C R による特定

1 3 2 5 個の本研究において特定されたユニジーンクラスターのうち、7 3 個の m R N A 発現パターンの解析を R T - P C R によって、2 0 個の正常組織由来の R N A サンプルパネルを用いて行った。数種の基準を用いて、これらの癌・精巣関連ユニジーンクラスターであって R T - P C R 用のものを選択した。既知の C T 抗原は X 染色体にマップされてい

50

るため、全ての癌・精巣関連ユニジーンクラスターマッピングをX染色体に対して試験を行った（総計19個）。また、メラノーマおよび肉腫は数多くのCT抗原を発現するため、10個の癌・精巣関連ユニジーンクラスターであって、メラノーマおよび肉腫ライブラリー由来のESTを有するものについても試験を行った。癌・精巣関連ユニジーンクラスターのうち、機能上の重要性を癌に関連して有するもの（例えば転写因子、接着分子）についても試験を行った（総計21個）。残りの23個の解析したユニジーンクラスターはランダムに選択した。癌・精巣関連ユニジーンクラスター下位群に関連して、59個のCT関連ユニジーンクラスター（38個がグループIAから、9個がグループIBから、12個がグループICから）および14個の精巣関連ユニジーンクラスター（6個がグループIIA、7個がグループIIBから、1個がグループIICから）の解析をRT-PCRによって行った。

【0232】

図1に示すように、73個の癌・精巣関連ユニジーンクラスターであってRT-PCR解析に付したもののうち、10個が異なる発現を行っていると考えられ、特定された転写物の数が正常組織に比して限定的であり、すなわちmRNAの発現が正常組織に対して7/20しか検出されなかった。これらを表3に示す。

【0233】

【表4】

表3 データベース探索によって得られた、限定的な発現プロファイルを正常組織において有することが通常のRT-PCRによって決定された癌/精巣（CT）関連ユニジーンクラスター

ユニジーンクラスター	CT関連ユニジーンクラスターのカテゴリー（表2）	発現プロファイル	遺伝子産物の説明
Hs.121554	IA	睾丸のみ	非特徴的遺伝子産物、プロテアーゼ阻害剤のシステインファミリーメンバーと相溶性あり
Hs.183009	IA	睾丸のみ	制御因子X, 4 (RFX4)
Hs.178062	IA	睾丸および脳	非特徴的遺伝子産物、ホスホリパーゼA1との相溶性あり
Hs.245431	IB	睾丸のみ	非特徴的遺伝子産物、GAGE遺伝子との相溶性あり
Hs.177959	IC	睾丸のみ	ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ2 (ADAM2/フェルチリンβ)
Hs.97643	IC	睾丸のみ	非特徴的遺伝子産物、睾丸特異的タンパク質TSP-NYと称する
Hs.128836	IC	睾丸、卵巣、肺、子宮頸部	非特徴的遺伝子産物、タンパク質モチーフまたは類似性なし
Hs.195932	IIA	睾丸のみ	非特徴的遺伝子産物、睾丸転写産物Y12 (TTY12)と称する
Hs.293317	IIA	睾丸、前立腺、卵巣、肺、大腸、乳房	非特徴的遺伝子産物、GAGE遺伝子との相溶性なし
Hs.189184	IIA	睾丸のみ	ユビキリン3 (Ubqln3)

1 正常組織RNAパネルには、脳、睾丸、腎臓、肝臓、脾臓、胎盤、小腸、心臓、前立腺、副腎、脾臓、胎児脳、大腸、胃、肺、膀胱、卵巣、乳房、子宮頸部および骨格筋を含む。

2 遺伝子はY染色体にマップされる。そのため、女性提供者のみに由来するRNAサンプル（腎臓、大腸、膀胱、胎盤、卵巣、乳房、子宮頸部）には適用不可。

【0234】

他の63個の遺伝子産物のmRNA発現パターンは、正常組織に偏在するか（43個のユニジーンクラスター）、もしくは不明瞭なRT-PCRの結果であって、イントロを有しないDNAからの増幅（8個のユニジーンクラスター）、非特異的増幅（4個のユニジーンクラスター）からのものを生ぜしめたか、または増幅されなかった（8個のユニジーンクラスター）。特定された10個の異なる発現転写産物のうち、7個は精巣にのみ発現され（他の正常組織においては0/19）、そして3個の他の遺伝子産物は、限定された数の正常組織であって、精巣および卵巣以外のものにおいて検出された（図1A）。7個の精巣に限定的に生じた転写産物のうち、2個は既知のタンパク質、すなわちユビキリン3 (Ubqln3、Hs.189184、グループIIA) ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ2またはフェルチリンβ (ADAM2、Hs.177959、グループIC) をコードし、5個は非特徴的な遺伝子産物であるHs.121554（グルー

プ I A)、Hs. 178062 (グループ I A)、Hs. 245431 (グループ I B)、Hs. 97643 (グループ I C) および Hs. 195932 (グループ I I A) をコードしていた。SAGE タグであって、既知の正常大腸組織における遺伝子産物である ADAM2/Hs. 177959 (グループ I C) に対応するものについては、本出願人らの RT-PCR 発現データからは ADAM2/Hs. 177959 の正常大腸組織における発現は確認されない (図 1 A)。7 個の精巢限定的な転写産物以外に、3 個の他のユニジーンクラスターが、限定された数の正常組織において発現されていた。制御因子 X4 をコードする転写産物 (RFX4、Hs. 183009、グループ I A) は精巢および脳においてのみ検出された (他の正常組織においては 0/18)。2 個の非特徴的転写産物である Hs. 128836 (グループ I C) および Hs. 293317 (I I A) は、精巢、卵巣、子宮頸管および肺 (他の正常組織においては 0/16) 精巢、前立腺、卵巣、肺、乳房および大腸 (他の正常組織においては 0/14) においてそれぞれ発現されていた。

【0235】

癌における CT 関連ユニジーンクラスター

7 個の精巢限定的転写物は、全て CT 遺伝子産物であると考えられたが、それは同一配列が腫瘍由来 EST ライブラリー (グループ I ユニジーンクラスター) または SAGE ライブラリー (グループ I I A ユニジーンクラスター) に存在していることに基づく。このことをインシリコ発現プロファイルによって確かめるために、本研究において特定された組織限定的転写物を RT-PCR により解析を、その際種々の悪性組織由来の RNA サンプルを用いて行った。図 1 B に示すように、7 個の精巢限定的転写物のうちの 3 個、すなわち ADAM2/Hs. 177959、Hs. 245431、および Hs. 178062 も腫瘍組織にも発現され、新たな CT 遺伝子として特定された。これらの CT 遺伝子は、1 個の既知の遺伝子産物を表し、2 個の非特徴的転写産物を表す。既知のタンパク質である ADAM2/Hs. 177959 を、限定的に精巢および 16 例中 2 例においては腎臓癌においても発現されていた (表 3 および 4)。

【0236】

【表 5】

表 4 新たに特定された決定された、癌/辜丸 (CT) 遺伝子の mRNA 発現頻度の、正常組織および悪性組織における通常の RT-PCR 解析

組織	CT 遺伝子		
	Hs.177959/ CT15 (ADAM2)	Hs.245431/ CT16	Hs.178062/ CT17
正常組織	辜丸のみ	辜丸のみ	辜丸のみ
メラノーマ	0/18	4/18	0/18
肺癌	0/18	7/18	0/18
大腸癌	0/9	1/9	0/9
乳癌	0/18	1/18	1/18
腎臓癌	2/16	7/16	4/16
卵巣癌	0/4	0/4	0/4
メラノーマセルライン	0/8	4/8	0/8
他の腫瘍セルライン	0/4	SW1045, LU-17	0/4

1 正常組織 RNA パネルには、脳、辜丸、腎臓、肝臓、脾臓、胎盤、小腸、心臓、前立腺、副腎、脾臓、胎児脳、大腸、胃、肺、膀胱、卵巣、乳房、子宮頸部および骨格筋を含む。

2 メラノーマセルラインには SK-MEL-28... を含む。

3 試験を行った他の腫瘍セルラインには、SK-LU-14 および SK-LU-17 肺癌細胞、ならびに SW1045 および Fuji 肉腫細胞を含む。

【0237】

CT 抗原に関して提唱された命名 (21) に従って、ADAM2 は CT 位置指定 (designation) を CT15 とした。ADAM2/CT15 は、メタロプロテイナーゼ様の、ディスインテグリン様の、システインリッチなドメインファミリーの精子表面タンパク質であって、卵/精子相互作用に関与している (51)。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、CT15/Hs. 177959 について配列番号 18 および 19 に記載している。

【0238】

本研究において特定された他のCT遺伝子産物は、CT16と位置指定され、これは非特徴的転写産物であり、Hs. 245431ユニジェンクラスターによって表される。CT16/Hs. 245431は4/18のメラノーマ、7/18の肺癌、1/18の乳癌、1/9の大腸癌および7/16の腎臓癌において発現されていた（表3および4）その発現は、数種の腫瘍細胞セルラインにおいても見出され、それはSK-LU-17肺癌、SW1045肉腫、および4/8のメラノーマセルライン（SK-MEL-19、-109、-37、および-10）を含むが、正常メラニン細胞にはみられなかった。CT16/Hs. 245431のcDNA配列は763個のヌクレオチド（ジェンバンクAcc# BC009230）からなり、完全なオープンリーディングフレームを有し、それは110個のアミノ酸からなる仮想全長タンパク質をコードしている。予測されているCT16/Hs. 245431アミノ酸配列は、30%~40%の相同性をCT抗原ファミリーであるGAGE-Aに対して有し（15）、そして40%~50%の相同性をGAGE-B/PAGE-1に対して有している（52）。ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、Hs. 245431についてはそれぞれ配列番号20および21として示してある。

【0239】

第3の新たに特定されたCT遺伝子産物は、CT17と位置指定し、Hs. 178062ユニジェンクラスターを表し、1/18の乳癌および4/16の腎臓癌において発現されていた（表3および4）。CT17/Hs. 178062のcDNA配列は877個のヌクレオチドからなり（配列番号22；ジェンバンクアクセス# AA470035）、202個のアミノ酸からなる、タンパク質の一部をコードし（配列番号23）それは30%の相同性をホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1に対して有している（53）。

【0240】

他の4個の精巢限定的遺伝子産物であるTSPNY/Hs. 97643 10（配列番号24および25）、TTY12/Hs. 195932（配列番号26および27）、Ubqln 3/Hs. 189184（配列番号28および29）およびHs. 121554（配列番号30および31）（表2）、は、腫瘍組織においては検出されなかった。

【0241】

3個の遺伝子産物であって、本研究において限定された数の正常組織において特定されたものは、腫瘍細胞においても発現されていた（表5）。

【0242】

【表6】

表5 新たに特定された決定された、発現が異なる非CT遺伝子のmRNA発現頻度の、正常組織および悪性組織における通常のRT-PCR解析

組織	発現が異なる非CT遺伝子		
	Hs.183009 (RFX4)	Hs.128836	Hs.293317 (CT16.2)
正常組織	辜丸、脳	辜丸、卵巣、肺、子宮頸部	辜丸、卵巣、肺、大腸、乳房、 前立腺
メラノーマ	0/18	0/18	9/18
肺癌	0/18	7/18	14/18
大腸癌	1/9	1/9	3/9
乳癌	0/18	2/18	6/18
腎臓癌	0/16	2/16	14/16
卵巣癌	0/4	2/4	2/4
メラノーマセルライン	4/8	0/8	0/8
他の腫瘍セルライン	0/4	LU-14	SW1045 LU-17

1 正常組織RNAパネルには、脳、辜丸、腎臓、肝臓、脾臓、胎盤、小腸、心臓、前立腺、副腎、脾臓、胎児脳、大腸胃、肺、膀胱、卵巣、乳房、子宮頸部および骨格筋を含む。

2 メラノーマセルラインにはSK-MEL-28...を含む。

3 試験を行った他の腫瘍セルラインには、SK-LU-14およびSK-LU-17肺癌細胞、ならびにSW1045およびFuji肉腫細胞を含む。

10

20

30

40

50

【0243】

既知の遺伝子である制御因子X4 (RFX4、Hs. 183009) は、精巣および脳にのみ限定的に発現され、1/9の大腸癌、および4/8メラノーマセルライン (SK-MEL-19、-37、-10、および-30) においても発現されていたが、正常なメラニン細胞には発現されなかった (表3および5)。RFX4/Hs. 183009 (配列番号32および33) は、ユニジェンデータベースにおいて、乳癌における転位産物として示され、該産物は偏在して発現される第6染色体上のエストロゲン受容体1遺伝子、および新規なRFX様遺伝子 (RFX-4) 第12染色体 (54) を含んでいた。

【0244】

第二の異なる発現を示す転写産物は、Hs. 128836ユニジェンクラスターによって示され、正常な精巣、卵巣、子宮頸管および肺に発現され、7/18の肺癌、2/4の卵巣癌、2/18の乳癌、1/9の大腸癌および2/16の腎臓癌においても発現していた (表3および5)。Hs. 128836のcDNA配列は558個のヌクレオチドからなり (配列番号34)、164個のアミノ酸からなる、仮想タンパク質の部分をコードし (配列番号35)、特徴的なタンパク質または既知のタンパク質モチーフとの相同性を示さなかった。

【0245】

第二の異なる発現を示す転写産物は、Hs. 293317ユニジェンクラスターによって示され、正常な精巣、卵巣、肺、乳房、前立腺および大腸に発現され、9/18のメラノーマ、14/18の肺癌、6/18の乳癌、1/9の大腸癌2/4の卵巣癌、および3/9の大腸癌においても発現していた (表3および5)。転写産物は2つの腫瘍セルラインであるSW1045肉腫およびSK-LU-17肺癌においても検出されたが、8個のメラノーマセルラインには発現されず、正常なメラニン細胞には発現された。Hs. 293317は新規なcDNA配列であり、549個のヌクレオチド (ジェンバンク# AW002915) であり、完全なオープンリーディングフレームを有し、それは110個のアミノ酸からなる仮想全長タンパク質をコードし、該タンパク質は新たに特定されたCT遺伝子である、上記CT16/Hs. 245431に対して89%の相同性を有していた。CT16/Hs. 245431との相同性を基に、Hs. 293317はCT16.2と位置指定された。ユニジェンクラスターHs. 293317によって特定されたコンテ

ィグの遺伝子配列は、配列番号 36 として示した。前記コンティグの翻訳ポリペプチドは、配列番号 37 として示した。

【0246】

癌・精巣遺伝子発現の定量的解析

mRNA 発現プロファイルを、CT15、CT16 および CT17 についてさらに調査を行うために、定量的リアルタイム RT-PCR を、種々の組織および腫瘍標本由来の RNA パネルを用いて行った。比較のために、プロトタイプの CT 抗原である NY-ESO-1 (18) および MAGE-3 (55) についても同様な方法で解析を行った。CT 遺伝子発現の標準レベルを正常組織および癌について、精巣における発現レベルと対比して表 6 に示した。

【0247】

【表 7】

表 6 癌・精巣遺伝子産物をコードしている mRNA の、正常組織および悪性組織における、精巣に対する定量的解析

組織	種々の組織における、正常精巣における mRNA に対する、CT 遺伝子産物をコードしている mRNA 転写産物の発現レベル				
	CT15/ ADAM2	CT16/ Hs.245431	CT17/ Hs.178062	NY-ESO-1	MAGE-3
脳	0	0	0	3%	0
腎臓	0	0.1%	0	0	0
肝臓	0	0.4%	0	0	0
脾臓	1.0%	0	0	0	0
大腸	0	0	0	2%	0
肺	0	0	0	3%	0
卵巣	0	0	0	52%	0
腫瘍 # 1	2%	310%	289%	14%	8%
腫瘍 # 2	0.8%	6400%	19%	19%	11%
腫瘍 # 3	0.07%	320%		6%	30%

1 CT15/ADAM2 の発現の解析は、3 種類の腎臓癌標本 (腫瘍 # 1、RCC1; 腫瘍 # 2、RCC5; 腫瘍 # 3、RCC6) について行った。CT16 の発現の解析は、2 種類のメラノーマ標本 (腫瘍 # 1、Mel-1; 腫瘍 # 2、Mel-11) および 1 種類の乳癌標本 (腫瘍 # 3、HBR-297) について行った。CT17 の発現の解析は、1 種類の乳癌標本 (腫瘍 # 3、HBR-297)、腎臓癌の標本 (腫瘍 # 2、RCC5) およびメラノーマ標本 (腫瘍 # 3、Mel-1) について行った。NY-ESO-1 の発現の解析は、2 種類の肺癌標本 (腫瘍 # 1、LU356; 腫瘍 # 2、LU3539) および腎臓癌の標本 (腫瘍 # 3、RCC1) について行った。MAGE-3 の発現の解析は、2 種類の肺癌標本 (腫瘍 # 1、Mel-1; 腫瘍 # 2、Mel-11) および 1 種類の肺癌標本 (腫瘍 # 3、LU356) について行った。

【0248】

リアルタイム RT-PCR 解析の結果、全体として、CT 遺伝子産物について、正常な非配偶子形成組織において発現は全くないか、または正常な精巣に比して極めて低いレベル (3% 以下) であることが明らかになった。正常組織については、CT15 の発現は、精巣における検出の 1% のレベルで脾臓において検出された。CT16 の mRNA の発現は、正常組織においては転写産物は腎臓および肝臓にのみ検出され、検出レベルはそれぞれ精巣の 0.1% および 0.4% であった。CT17 および MAGE-3 の mRNA の発現は、精巣に限定されていた。NY-ESO-1 の場合については、正常な脳、大腸および肺における発現レベルは、それぞれ精巣における検出レベルの 3%、2% および 3% であった。NY-ESO-1 は、卵巣においても精巣における検出レベルの 52% 検出された。CT 転写産物の総 RNA μ g あたりのコピー数についても、これらの相対的発現レベル (表 6) およびコピー数が既知である相同 cDNA の標準曲線との比較に基づいて計算した。精巣における CT 遺伝子の発現レベルの変動幅は大きく、CT15 が最大のコピー数

を有し (445, 000コピー/μg RNA)、CT16 (149, 000コピー/μg RNA)、NY-ESO-1 (31, 300コピー/μg RNA)、CT17 (16, 100コピー/μg RNA) およびMAGE-3 (15, 060コピー/μg RNA) がこれに次いだ。

【0249】

腫瘍組織におけるCT遺伝子についても、定量的リアルタイムRT-PCR解析を行った。腎臓癌標本であるRCC1、RCC5およびRCC6において、CT15の発現レベルは、それぞれ精巣における検出レベルの2%、0.07%および0.8%であった(表6)。RCC1およびRCC6腫瘍は、いずれもCT15の発現は、通常のRT-PCRにより陽性であったが、RCC5は陰性であった(図1B)。表6に示すように、CT16の発現レベルは2つのメラノーマサンプルにおいて、それぞれ3.1倍および64倍のレベルであった。乳癌標本においては、CT16発現レベルは、精巣における検出レベルの3.2倍であった。これら2つのメラノーマサンプルおよび乳癌サンプルは、CT16発現に関し、通常のRT-PCRにより陽性であった(図1B)。乳癌標本(HBR297)および腎臓癌標本(RCC5)において、CT17の発現レベルは、精巣における検出レベルのそれぞれ2.89および0.19であり(表6)、これは通常のRT-PCRの結果と一致した。NY-ESO-1発現の、2つの肺癌標本におけるレベルは、精巣における検出レベルのそれぞれ14%および19%であった(表6)。腎臓癌標本において、NY-ESO-1の発現レベルは精巣における検出レベルの6%であった。最後に、MAGE-3の発現レベルは、2つのメラノーマ標本および肺癌標本において、精巣における検出レベルのそれぞれ8%、11%および30%であった。

【0250】

考察

発現シーケンスタグ(EST)はヒトトランスクリプトームの宝庫であり、豊富な核酸配列情報およびmRNA発現データを有している。ESTデータベース配列が拡張されたものがユニジェンであり、それは公のドメイン配列プロジェクトから得られた情報を蓄積したものであり、該プロジェクトはEST、ジェンバンク、オレステス(ORESTES)およびヒトゲノムプロジェクトを包含し、この情報を数多くの関連するデータベースとリンクさせており、それは例えば科学文献、ヒトゲノム、プロテオーム、単一ヌクレオチド多型、および遺伝子変異である。癌ゲノム解析プロジェクトと関連して、ユニジェンデータベースによって、ESTデータ、遺伝子発現プロファイル、およびデジタル解析のためのツールが提供され、それはインシリコの遺伝子発現連続解析(SAGE)、遺伝子発現プロファイリング、およびディファレンシャルディスプレイを包含している。CT抗原の免疫療法上の重要性に鑑み、すなわち、CT抗原は抗原特異的癌ワクチンの有望な標的分子であるため、本研究がユニジェンデータベースから探索した遺伝子クラスターは、ESTのうち限定的に癌および精巣cDNAライブラリー由来のものを含むものとした。

【0251】

今日のバイオインフォマティック解析によって、約1300個の異なる癌・精巣関連ユニジェンクラスターが特定されている。予備的な証拠であって、ユニジェンクラスターを探索するために用いたアプローチのサポートは、4個の存在していた既知のCT、すなわちCT11p、GAGE4、MAGEB1、およびSAGEであり、これらは前記1300個の癌・精巣関連ユニジェンクラスターであって、本研究において特定されたものに含まれていた。逆に、このバイオインフォマティック解析によって、9個の他の以前に特定されていたCT遺伝子ファミリーであって文献に記載されていたメンバーは特定されなかった。この理由は、データベースサーチツール(Xプロファイラ)を本研究において用いたが、これはcDNAライブラリーのグループを3個以上は相互に参照しないからである。本研究において特定されなかったCT抗原に対応するものは、ESTのうち二要素相互参照プール(正常精巣と癌)からはずれるcDNAライブラリーに由来するものを含むものである。例えば、NY-ESO-1、SSX-2/HOM-MEL-40、およびCT-7ユニジェンクラスターは、ESTのうち胎盤由来のものを含み、BAGE、SCP-

1 および C T - 1 0 ユニジーンクラスターは E S T セルライン由来のものを含み、B R D T / C T 9 ユニジーンクラスターは、E S T のうちサブトラクション精巣ライブラリー由来のものを含み、また s p 3 2 / O Y - T E S - 1 ユニジーンクラスターが含む b E S T は、正常腎臓および胎児の心臓由来のものを含んでいる。また、C T A G E - 1 ユニジーンクラスターは正常精巣の E S T のみを含み、腫瘍精巣由来 E S T を含まない。

【0252】

m R N A 発現パターンを 7 3 個のこれらの精巣／癌関連ユニジーンクラスターについて、R T - P C R によって、種々の正常組織および悪性組織由来の R N A サンプルのパネルを用いて調査を行った。前記 7 3 個の遺伝子産物のうち、C T 1 5 / H s . 1 7 7 9 5 9、C T 1 6 / H s . 2 4 5 4 3 1、および C T 1 7 / H s . 1 7 8 0 6 2 は、通常の R T - P C R によって精巣および悪性組織に限定的に発現され、そのため C T 抗原類似の発現プロファイルを有していることが示された。他の類似点も、新たに特定された C T 遺伝子および既知の C T 抗原の間に存在する。特定された C T 遺伝子のうちの 2 個、すなわち C T 1 6 / H s . 2 4 5 4 3 1 および C T 1 7 / H s . 1 7 8 0 6 2 が示すユニジーンクラスターは、精巣由来 c D N A ライブラリー E S T に加えて、それぞれメラニン細胞および肉腫 c D N A ライブラリー由来のものを含み。この 2 個の腫瘍タイプは、既知の C T 抗原の大きな割合の部分を発現することが知られている (5 6)。また、C T 1 6 / H s . 2 4 5 4 3 1 は X 染色体にマップされ、そのゲノム上の位置は、1 4 個の既知の C T 抗原マップの第 8 である。さらに、m R N A の発現頻度は、新たに特定された C T 遺伝子のうち癌に存するものにおいては、以前に特定された C T 抗原の発現頻度と一致していた (与えられた腫瘍タイプのうち 2 0 % ~ 4 0 %、引用文献 2 1)。すなわち、大腸癌および腎臓癌における C T 1 6 発現は、それぞれ 1 1 % ~ 4 4 % であり、そして乳癌および腎臓癌における C T 1 7 発現は、それぞれ 5 % ~ 2 5 % であった。逆に、限定的と思われる C T 1 5 / A D A M 2 の発現は正常精巣および腎臓癌において特有のものである。しかし、本研究において調査を行ったサンプルサイズは比較的小さいものであったため、はるかに広範な m R N A 発現によって、癌におけるそれらの発現頻度に関するより確定的な結論が与えられよう。

【0253】

プロアクロシン結合タンパク質である O Y - T E S - 1 (3 0) およびシナプトネマ構造タンパク質 - 1 (2 0) を除き、C T 抗原の生物学的機能は知られていない。本研究においては、特定された C T 遺伝子産物のうち 2 個は、既知の機能または既知の機能モチーフを有するタンパク質をコードしている。A D A M 2 / C T 1 5 / H s . 1 7 7 9 5 9 は、メタロプロテイナーゼ様の、ディスインテグリン様の、システインリッチなドメインファミリーの細胞表面プロテアーゼ／接着分子の領域ファミリーのメンバーであって、卵／精子膜相互作用に関与していると考えられている (5 1)。A D A M 2 / C T 1 5 は機能的メタロプロテイナーゼ領域を欠くがディスインテグリンは含んでおり、該領域はインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ または他の類似分子に結合する可能性がある (5 7)。もう一つの C T 遺伝子産物である C T 1 7 / H s . 1 7 8 0 6 2 はホスホリパーゼとの類似性を有していて、それは受精における精子の先体エクソサイトーシスを担っている (5 8)。

【0254】

他の C T 遺伝子である C T 1 6 / H s . 2 4 5 4 3 1 およびその類縁遺伝子である C T 1 6 . 2 / H s . 2 9 3 3 1 7 は、3 0 ~ 5 0 % の類似性を G A G E タンパク質に対して有している (1 5、5 2)。G A G E A ファミリー間の類似性 (9 0 % 以上のアミノ酸配列 (identity)) ならびに G A G E - A および G A G E - B ファミリーの類似性 (4 0 ~ 5 0 % のアミノ酸配列) を基に結論されるのは、H s . 2 4 5 4 3 1 / C T 1 6 が新たな G A G E 遺伝子ファミリーを表し、それは暫定的に C T 1 6 ファミリーと称され、それは組織限定的遺伝子産物である C T 1 6 . 2 / H s . 2 9 3 3 1 7 も含んでいるということである。G A G E タンパク質の生物学的機能は知られていないし、G A G E タンパク質に対する免疫反応についても報告は僅かである。G A G E - A 1 および C T 1 6 を除いて、大部分の G A G E 遺伝子は、C T 1 6 . 2 も含め、正常な成人組織の狭い範囲のみに発

現される（59）。個々のGAGE遺伝子ファミリー間の類似性があることから、GAGEタンパク質に対する免疫反応の欠如が示しているのは、高度に類似していて、かつより普遍的に発現されるGAGE遺伝子に対する耐性を反映するものである可能性があると考えられる。

【0255】

CT遺伝子に加えて、本研究において特定されたのは3個の組織限定的遺伝子産物、RFX4/Hs. 183009、Hs. 128836およびHs. 293317であり、これらは癌においても発現されている。RFX4が発現されるのは正常な精巣および脳においてのみであり、さらに1/9の大腸癌および4/8メラニンセルラインにおいてである。したがって、RFX4は、癌・精巣/脳抗原（CTB抗原）と称せられるタンパク質の仮想的メンバーであると考えられる。他にCTB抗原に含まれるのは、CDR（60）、Ma1（61）、およびMa2（62）であり、これらはPosnerおよび共同研究者らによって特定されたものであるが、腫瘍随伴症候群に罹患している患者における自己抗体によって認識される標的分子として特定された。RFX4が属するのはDNAタンパク質ファミリーであり、それはMHCクラスII遺伝子の転写産物を制御する（63）。RFXタンパク質をコードしている遺伝子であるRFXANK、RFX5およびRFXAPにおける欠陥によって不全リンパ球症候群が発生し、これは重篤な劣性の免疫不全病である（64に総説）。MHC遺伝子の下方調節が精巣、脳および癌において行われていることから、これらの組織におけるRFX遺伝子の発現は重要であるかもしれない。2つの非特徴的転写物であるHs. 128836およびHs. 293317のmRNA発現プロファイルも、限定された数の正常な組織および癌に限られている。機能的領域を欠いているため、これらの遺伝子産物の生物学的重要性は決定されていない。

【0256】

3個のCT遺伝子および3個の組織限定的転写産物に加えて、さらに4個の遺伝子産物あって精巣限定的発現プロファイルを有するものが特定され、これらはHs. 121554、Hs. 97643、Hs. 195932、およびHs. 189184である。ユニーククラスターであってこれらの4個の精巣限定的遺伝子産物に対応するものも、ESTおよび/またはSAGEタグとして腫瘍由来のものを含んでいる。

【0257】

これらの遺伝子産物の解析を継続してRNAの拡大したパネルであって、より広範な種類の悪性組織由来のものを拡大したものをを用いることによって、それらを腫瘍組織において検出できるかもしれないし、それに続いてCT遺伝子の分類につながるかもしれない。残りの1200個の癌・精巣関連ユニーククラスターであって、RT-PCRによって解析を行っていないものについてのさらなる研究の焦点は、それらの遺伝子産物であって、インシリコ発現プロファイルとしてCT関連のものと対応するもの（グループI）ユニーククラスターおよび精巣関連ユニーククラスターでSAGEタグを有し、腫瘍細胞由来のもの（グループIIA）である。Loggingおよび共同研究者らが記載した方法であって、迅速な発現スクリーニングをリアルタイムRT-PCRによって行うものは、これらの研究に先んじるものであるといえる（65）。

【0258】

個々のCT遺伝子産物を癌の遺伝子ワクチンの標的分子として用いることは不適切であると思われるが、その理由はそれらの発現頻度が癌患者の群においては比較的強く、腫瘍内自体における不均一な発現および与えられた組織において抗原のロスがあるからである。代替物として開発されるべきものは、多価癌ワクチンであり、数多くの異なるCT遺伝子によってコードされたエピトープを含むものである。そのような多価ワクチンによって、効果的にワクチン治療を受け得る癌患者の数が増大し、そして障害のうち、腫瘍の不均一性および免疫回避に関連するもののいくつかが克服されるかもしれない。この目的を達成するために、本研究においてはCT15、CT16およびCT17をタンパク質のレパートリーであって、多価CT癌ワクチンに用い得るものを加えた。さらに、ADAM2/CT15は、2つの免疫療法上の価値を有する標的分子と考えられるが、その理由は、それ

が細胞表面局在性を有するため、モノクローナル抗体に基づく免疫療法の標的分子にもなり得るからである。結論は、ユニジェンデータベースには、潤沢な情報が含まれており、それを利用することによって、新たな癌関連遺伝子として療法上重要なものが発見される可能性があるということである。

【0259】

例3：さらなるCT抗原産物および関連遺伝子の特定

ユニジェンデータベースについて、上記のように特定されたESTのCT抗原であるCT16との類似性を有するものをサーチすることによって、2つのユニジェンクラスター、すなわちHs. 43879およびHs. 16323を見出した。これらのクラスターの位置指定は、それぞれ（下記理由により）CT19. 2（核酸：配列番号：38、ポリペプチド配列番号：39）およびCT19. 3（核酸：配列番号：40、ポリペプチド配列番号：41）とした。特異的なプライマーをこの配列に対して用いて（CT19. 2プライマー：配列番号：42および43、CT19. 3プライマー：核酸：44および45）、RT-PCRを用いることによって、Hs. 43879/CT19. 2およびHs. 16323/CT19. 3の発現は、いずれも限られた数の正常組織ならびに癌および精巣において発現されたことが決定された。

10

【0260】

他のファミリーメンバーの存否を確認するために、ヒトゲノムデータベースをサーチして相同遺伝子の探索を、Hs. 43879/CT19. 2ユニジェンクラスター内の配列を用いて行った。このサーチによって、仮説的な転写物がX染色体に見出された（位置はref|NT_025297. 5|HsX_25453ホモ・サピエンスX染色体作動性ドラフト配列断片のbp179682~1829185内）。この配列は、位置指定をCT19. 1とし（核酸：配列番号：46、ポリペプチド配列番号：47）90%および84%の相同性をHs. 43879/CT19. 2およびHs. 16323/CT19. 3それぞれに対して有し、同一のイントロン/エクソン構造をHs. 43879/CT19. 2およびHs. 16323/CT19. 3に対して有している。

20

【0261】

プライマーのデザインは、CT19. 1の最も固有な領域（most unique region）に基づいて行った。CT19. 1プライマー（下記参照、配列番号：58および59）は、Hs. 43879/CT19. 2またはHs. 16323/CT19. 3配列を増幅しない。CT19. 1転写産物は、胎児の脳、精巣および種々の腫瘍に検出され（そのため、その位置指定は、CT抗原であるCT19. 1とした。下記参照）いくつかの例においては、2つのバンドがRT-PCRによって検出され、その低分子量バンドは一貫して検出されたが、高分子領域のバンドは散見されたのみであった。いずれのバンドについても配列決定を行い、低分子量バンド（配列番号：46）のみが予見されたタンパク質産物（配列番号：47）であって、Hs. 43879/CT19. 2およびHs. 16323/CT19. 3類似のものを与えた一方、高分子量バンドは切断部を有する翻訳タンパク質であった（配列の他の部分に停止コドンをもつ）したがって、低分子量バンドはCT19. 1の配列になる。

30

【0262】

発現解析

CT19. 1、CT19. 2およびCT19. 3のmRNA発現プロファイルの決定を、正常組織および悪性組織において、遺伝子特異的プライマーであって下記の35サイクルのRT-PCR（例2に記載）によって特定されたものを用いて行った。結果を下記表7に示す。

40

【0263】

【化3】

CT19.1プライマー:

GEF1: ACCAAGGAGAAGCGTACCAC (配列番号 :58)

GER2: GGGACCATCTCTGCATTCATC (配列番号 :59)

【 0 2 6 4 】

【 化 4 】

Hs.43879/CT19.2 プライマー

GDF: AGGCCGAGGAGAAGTGTACC (配列番号 :42)

GDR: AACCTGTGGTTGCCTGTCAC (配列番号 :43)

【 0 2 6 5 】

【 化 5 】

Hs.16323/CT19.3 プライマー

GD2F:AGCCGTCTGGACTCTTTCTC (配列番号 :44)

GD2R:TGATTTCCCTTCACCTGCTTC (配列番号 :45)

【 0 2 6 6 】

【 表 8 】

表7 新たに特定された決定されたCT19遺伝子のmRNA発現頻度の、正常組織および悪性組織における通常のRT-PCR解析

組織	CT19遺伝子		
	CT19.1	Hs. 43879/ CT19.2	Hs. 16323/ CT19.3
正常組織	睾丸、胎児脳のみ	睾丸、胎盤、前立腺、肺、乳房	睾丸、卵巣、胎盤、前立腺、肺、子宮頸部
メラノーマ	1/14		
肺癌	2/22	3/18	11/18
大腸癌	2/9		2/9
腎臓癌	1/11	1/11	2/11

1 正常組織RNAパネルには、脳、睾丸、腎臓、肝臓、脾臓、胎盤、小腸、心臓、前立腺、副腎、脾臓、胎児脳、大腸、胃、肺、膀胱、卵巣、乳房、子宮頸部および骨格筋を含む。

【 0 2 6 7 】

タンパク質の位置合わせ

CT19.2のGAGE-A1のタンパク質配列配列（配列番号：57）との位置合わせにつき下記に示す。縦線によって、両配列におけるアミノ酸の一致を表す。

【 0 2 6 8 】

【 化 6 】

```

GAGE A1  MSWRGRSTYRPRPRRYVEPPPEMIGPMRPEQFSDEVEPATPEEGEPATQRQDPAAAQEGE-
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CT19.2    MIWRGRSTYRPRPRRSVPPPELIGPML--EPGDEEPQQ--EPPTE-SR-DPAPGQEREK

GAGE A1  DEGASAGQGPKPEAHSQEQGHPTGCECEDGPDGQEMDPPNPPEVKTPEEGEKQSQC
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CT19.2    DQGAAETQVPDLEADLQELSQSKTGGECEGNGPDDQGKILPKSEQFKMPEGGDRQPQV

```

【 0 2 6 9 】

CT19.1、CT19.2およびCT19.3のタンパク質配列の位置合わせにつき下 50

記に示す。

【化 7】

CT19.1 MIWRVRSTYRPRPRRSVPPPELIGPMLEPSDDEEPQQEEPPTESRDPTP-----

CT19.2 MIWRGRSTYRPRPRRSVPPPELIGPMLEPGDDEEPQQEEPPTESRDPAPGQEREDDQGAAE

CT19.3 MSWRGRSTYRPRPRRSLQPPPELIGAMLEPTDEEPKEEKPPTKSRNPTPDQKREDDQGAAE

CT19.1 --VPDLETDLQELSQSKTGDECRDGPDDKGKILPKSEQFKMPREGG

CT19.2 TQVPDLEADLQELSQSKTGECNGPDDQGKILPKSEQFKMPEGGDRQPQV

CT19.3 IQVPDLEADLQELCQTKTGDCEGTDVKGKILPKAEHFKMPEAGEGKSQV

10

【0270】

下線を付したアミノ酸は、配列中において他の2つの位置合わせを行ったCT19配列における同一位置のアミノ酸との相違を示す。ダッシュは、他の配列からの欠如(gap)を示す。配列の位置合わせの結果、81%の相同性がCT19.1およびCT19.2ポリペプチド間において見出され、69%の相同性がCT19.1およびCT19.3ポリペプチド間において見出され、そして73%の相同性がCT19.2およびCT19.3ポリペプチド間において見出された。

20

【0271】

例4：絨毛癌／腫瘍(ChT)遺伝子産物の特定

ユニジェンデータベースを探索し、ESTのうち、絨毛癌および癌からのESTライブラリーCT抗原において限定的に見出されるものを、上記例2に記載したCT抗原探索のように行った。

簡潔にいうと、2つのプールとして発現シーケンスタグ(ESTs)を構築した。

プールAは、3つの絨毛癌cDNAライブラリーからのESTからなり、そしてPool Bは3,289個の(多くの組織学的タイプの)腫瘍由来cDNAライブラリーからのESTの全てからなる。CGAPのXプロファイラツールをユニジェンデータベースのサーチに用いて、ユニジェンクラスターのうちプールAおよびプールBからのESTを含むものを対象とし、そして正常組織cDNAライブラリーからのものは除外した。

30

【0272】

このサーチによって、49個の絨毛癌／腫瘍(ChT)関連ユニジェンクラスターが見出され、それらは4個の既知の遺伝子産物(そのうち3個はCT抗原：LAGE、MAGE-A6、MAGE-A12)を含み、および45個は新規であった。49個のChT関連ユニジェンクラスターのうち、31個はイントロを含まない配列(単一エクソン、疑似遺伝子、遺伝的夾雑物)であり、調査は行わなかった。残りの18個のChT関連ユニジェンクラスターは、明確なイントロン／エクソン境界を有し、そして(既知のCT抗原配列を除いた後の)15個の解析をRT-PCRによって、正常および悪性組織のパネルについて行った。2つのChT遺伝子産物、Hs.313507/CT20(配列番号：48)およびHs.197664(配列番号：51)のmRNA発現プロファイルは興味深いものであり、それについては下記の通りである。さらに、Hs.313507/CT20ユニジェンクラスターは2つのタイプの転写産物、精巢cDNA配列であって、FLJ32909と称せられるものおよび11個の腫瘍由来ESTを有しており、FLJ32909のbp770~961は腫瘍由来ESTには欠けていた。これらの異なる転写産物、すなわち仮想スプライシング変種は、2つの異なるタンパク質産物をコードしている：イソフォームA(配列番号：49)はEST転写産物の産物であり、イソフォームB(配列番号：50)、精巢転写産物の産物である。Hs.197664がコードしているのは単一のタンパク質産物(配列番号：52)であり、それは30%の相同性をNY-CO-41/メチルCpG結合タンパク質2に対して有する。

40

50

【0273】

発現解析

上記のような35サイクルのRT-PCRを、下記プライマーを用いて行った。結果を表8に示す。

【0274】

【化8】

Hs.313507/CT 20プライマー:

CCCT11F: TGGGACATCCATCAGATAAG (配列番号 :53)

CCCT11R: TTTATGGCTGCATAGTATTC (配列番号 :54)

10

【0275】

【化9】

Hs.197664プライマー:

CCCT5F: GCTATGGGAGAACCTGCGTTC (配列番号 :55)

CCCT5R: TCCCTGGCTTTCTTCACCCTC (配列番号 :56)

20

【0276】

【表9】

表8 mRNA発現頻度の、正常組織および悪性組織におけるRT-PCR解析

組織	Hs. 313507/ CT20	Hs. 197664
正常組織	睾丸のみ	睾丸、卵巣、前立腺のみ
メラノーマ	5/14	2/13
肺癌	6/22	
大腸癌	1/9	
腎臓癌	2/11	2/11

1 正常組織 RNA パネルには、脳、睾丸、腎臓、肝臓、脾臓、胎盤、小腸、心臓、前立腺、副腎、脾臓、胎児脳、大腸、胃、肺、膀胱、卵巣、乳房、子宮頸部および骨格筋を含む。

30

【0277】

例5: CT抗原の相同性の確認

上記において特定された配列の長さを伸長することは可能であるが、前提としてさらなる配列領域であって、それによって遺伝子データベースにおいて関連する配列をサーチできるものの存在が前提となる。上記配列の伸長は、標準的な方法（例えばPCR）を用いて行われ、現在既知の領域を越えてDNA配列を伸長するものであり、とくに不完全なタンパク質をコードしていると思われる配列に対して行われる。PCRベース増幅法においては5' RACEが行われ、それによって既知の部分的なcDNAsの未特定の(missing)5'末端の単離が可能になる。さらに、3' RACEを用いて、cDNAの未特定3'末端の伸長が行える。これらの追加される末端領域の配列決定には、マッチングおよび相同性のためにデータベースをスクリーンする情報が用いられる。

40

【0278】

既知の配列を伸長するためのもう一つの方法は、従来からのライブラリースクリーニング手法によるものであり、それによってライブラリーからより長い配列の単離を行うことができる。伸長された配列が特定されると、それを用いて遺伝子データベースのサーチを行い、配列マッチおよび続く発現パターンの調査を行うことができる。スクリーニング手法において用いるライブラリーは一般的なライブラリーであるか、またはより組織特異的もしくは発生段階特異的なライブラリーである。

【0279】

50

例 6：組み換え C T 抗原の調製

C T 抗原（例えば C T 1 5、C T 1 6、C T 1 9. 1、および C T 2 0）を、h i s タグタンパク質として E. c o l i に発現させたが、ヒスチジンタグ含有ベクター p Q E 3 0（Qiagen, Valencia, Calif.）を用いて、引用文献 4 0 に記載のように行った。組み換えタンパク質合成の誘導およびそれに続く N i ⁺ ² カラムによる精製は、Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:1004-1008, 1994 の記載に従って行った。

【0 2 8 0】

他の方法においては、C T 抗原をコードするクローンをバキュロウィルス発現ベクターにサブクローンし、そして該組み換え発現ベクターを適切な昆虫細胞に導入する。バキュロウィルス／昆虫クローニング系が好ましいのは、翻訳後の改変が昆虫細胞において行われるからである。もう一つの好ましい真核細胞系は、Invitrogen による *Drosophila* 発現系である。クローンのうち組み換えタンパク質を大量に発現するものを選択し、組み換えタンパク質の産生に用いる。他の系として、酵母発現系および哺乳類細胞培養系も用いることができる。

【0 2 8 1】

例 7：C T 抗原に対する C T 抗体の調製

上記例 6 のように調製した組み換え C T 抗原を用いて、ポリクローナル抗血清およびおよびモノクローナル抗体を標準法に従って調製した。そのように調製した前記抗血清および抗体の試験を、C T 抗原認識の確度について、抗血清／抗体を用いて、細胞抽出物のうち特定の C T 抗原を発現することが知られている患者のもののアッセイ（例えば E L I S A アッセイ）によって行った。これらの抗体は実験目的（例えば C T 抗原の局在化、免疫沈降、ウェスタンブロットなど）に用いることが可能であり、また診断目的（例えば、組織バイオプシー抽出物の試験、C T 抗原の存在確認試験）にも用いることができる。前記抗体の有用性は、正確かつ簡便な癌組織サンプルのタイピングを、C T 抗原の発現について行えることにある。

【0 2 8 2】

例 8：同一の起源および異なる起源を有する癌における C T 抗原の発現

1 種または 2 種以上の C T 抗原の発現の試験を広範な範囲の腫瘍に関して行い、存在する場合には、他の如何なる悪性を診断可能であるか、および／または本明細書に記載の方法によって処置される他の悪性を決定した。腫瘍セルラインおよび腫瘍サンプルの試験を C T 抗原の発現に関して、好ましくは R T - P C R またはリアルタイム P C R により、上記手法に従って行った。ノーザンブロットも用い、C T 抗原の発現の試験も行った。抗体ベースアッセイ、すなわち E L I S A およびウェスタンブロットを用いてタンパク質発現を決定することも可能である。（他種の癌および同一タイプの他の癌患者における）C T 抗原の発現を試験するための好ましい方法は、遺伝子多型血清タイピングであり、これには改変 S E R E X プロトコールを用いる。

【0 2 8 3】

前記の全てのにおいて用いられた抽出物は、患者の腫瘍からのものであり、該患者は C T 抗原の最初の単離のために血清を提供し、該抽出物をポジティブコントロールとして用いる。細胞のうち組み換え発現ベクターであって、上記例に記載したものをポジティブコントロールとして用いることも可能である。

上記実験によって得られた結果によって提供されるのは、複数種の癌関連核酸および／またはポリペプチドであり、これらは診断方法（例えば癌の存在の決定、治療を受けている患者の予後診断など）および治療方法（ワクチン組成物など）に用い得るものである。

【0 2 8 4】

例 9：C T 抗原に対してポジティブな患者の H L A タイピング

どの H L A 分子が本発明によって得られた C T 抗原由来ポリペプチドを与えるかを決定するために、患者の C T 抗原を発現する細胞の H L A のタイピングを行った。末梢血リンパ球を患者から採取し、H L A のタイピングをクラス I またはクラス I I について行い、さらにクラス I またはクラス I I の特定のサブタイプに関しても行った。腫瘍バイオプシー

サンプルもタイピングに用いることもできる。H L Aのタイピングの実施は、免疫療法の分野における標準的な方法であれば、如何なるものによっても可能であり、例えば特異的なモノクローナル抗体、または遺伝子座特異的 P C R（例えばW097/31126に記載）である。

【0285】

例10：M H CクラスIおよびクラスII分子によって提示されるC T抗原ペプチドの特徴付け

抗原のうち抗体反応を対象において惹起するものは、細胞媒介性免疫反応を惹起する可能性もある。細胞によって、タンパク質はM H CクラスIまたはクラスII分子における提示のためのペプチドにプロセスされ、免疫探査を細胞表面において行う。特定のM H C / H L A分子によって提示されたペプチドは、一般的にはモチーフに一致する。これらのモチーフはいくつかの場合に知られていて、C T抗原のスクリーニングに用いることによって潜在的なクラスIおよび/またはクラスIIペプチドの提示のためのC T抗原を与える。クラスIおよびクラスIIモチーフに関するサマリーが刊行されている（例えば、Rammensee et al., Immunogenetics 41:178-228, 1995）。上記のような実験の結果に基づいて、H L Aタイプのうち個別のC T抗原を提示するものが知られている。これらのH L A分子が提示するペプチドのモチーフが、好ましくサーチされる。

10

【0286】

クラスIおよびクラスIIモチーフのサーチを、コンピューターアルゴリズムを用いて行うこともできる。例えば、潜在的なC T Lエピトープを既知のクラスIモチーフを基に予知するためのコンピュータープログラムについての記載がある（例えば、Parker et al., J. Immunol. 152:163, 1994; D'Amato et al., Human Immunol. 43:13-18, 1995; Drijfhout et al., Human Immunol. 43:1-12, 1995を参照）。潜在的なT細胞エピトープを既知のクラスIIモチーフを基に予知するためのコンピュータープログラムについての記載もある（例えば、Sturniolo et al., Nat Biotechnol 17(6):555-61, 1999を参照）。H L Aへの結合の予知については便利な方法があり、それはNIH全世界ウェブサイトにおいて、インターネットによって利用可能なアルゴリズムであり、U R Lは<http://bimas.dcrt.nih.gov>である。S Y F P E I T H Iのウェブサイトも参照されたい。これはM H Cリガンドおよびペプチドモチーフのインターネットデータベースである（アクセスは<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>または<http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/EpPredict.htm>）。H L AクラスIIペプチドを決定するための方法およびその置換体（substitutions）を作製するための方法を知ることが可能である（例えばStrominger and Wucherpfennig(PCT/US96/03182)）。

20

30

【0287】

例11：抗原をコードしているポリペプチドに関連する癌の部分の特定

上記のように特定され単離されたC T抗原が、細胞溶解性Tリンパ球反応を惹起し得るか否かを決定するためには、以下の方法を実施する。C T Lクロンの産生を、患者の末梢血リンパ球（P B L s）の刺激によって行う。該刺激は自己の正常細胞であって、C T抗原ポリペプチドをコードしているクロンの1種によってトランスフェクトするか、または合成ペプチドとして仮想タンパク質に一致し、適切な（上記のような）H L AクラスI分子に対するコンセンサスにマッチするものを担持せしめた、照射したP B Lによってトランスフェクトしたものによって行い、これによって抗原性ペプチドをC T抗原クロンに局在化する（例えば、Knuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3511-3515, 1984; van der Bruggen et al., Eur. J. Immunol. 24:3038-3043, 1994を参照）。これらのC T LクロンはC O S細胞のうち、C T抗原クロンおよび自己H L A遺伝子座によってトランスフェクトしたものに対して特異的にスクリーンされるが、これについてはBric hard et al.の報告がある（Eur. J Immunol. 26:224-230, 1996）。C T抗原のC T Lに対する認識の決定は、細胞溶解性リンパ球からのT N Fの放出の測定または⁵¹ C r放出アッセイ（Herin et al., Int. J. cancer 39:390-396, 1987）によって行う。C T Lクロンが特異的にC O S細胞を認識した場合、C T抗原クロンを該C O S細胞におい

40

50

てトランスフェクトし、そのより短い断片に対する試験を行い、ペプチドをコードしている遺伝子の領域を特定する。前記C T抗原クローンの断片の調製は、エクソヌクレアーゼI I Iによる消化または他の標準的な分子生物学的方法によって行う。合成ペプチドを調製することによって、抗原の正確な配列を確認する。

【0288】

場合によっては、C T抗原c D N Aのより短い断片をP C Rによって調製する。より短い断片を用いて、T N Fの放出または⁵¹Crの放出が上記のように行われる。

合成ペプチドであって、T N Fの放出を惹起するC T抗原クローンの断片のうち、最も短い断片部に一致するものを調製する。段階的により短いペプチドを合成し、所定のH L A分子に対して至適なC T抗原による腫瘍拒絶抗原ペプチドを決定する。

同様な方法を実施することによって、C T抗原が、1種または2種以上のH L AクラスI I ペプチドであって、T細胞によって認識されたものを含むか否かを決定する。C T抗原ポリペプチドであって、H L AクラスI I モチーフに対するものは、上記のようにサーチすることができる。クラスI ポリペプチドとは対照的に、クラスI I ペプチドの提示は限られた数のタイプの細胞によって行われる。したがって、これらの実験に好ましく用いられるのは、樹状細胞またはH L AクラスI I 分子を発現するB細胞クローンである。

10

【0289】

【表10】

1. Boyse EA, Miyazawa M, Aoki T, Old LJ. Ly-A and Ly-B: two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse. *Proc Royal Soc Brit* 1968; 170: 175-193. (PMID:4385242)
2. Boyse EA, Old LJ. Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. *Ann Rev Genet* 1969; 3: 269-290.
3. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2420-2424. (PMID: 221923)
4. Lilly F, Boyse EA, Old LJ. Genetic basis of susceptibility to viral leukemogenesis. *Lancet* 1965; ii:1207-1209.
5. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore NC, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670. (PMID: 1103152)
6. Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ohta N, Old LJ, Boon T. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 1992; 35: 145-152. (PMID: 1537606)
7. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde

10

20

30

【 0 2 9 0 】

【 表 1 1 】

- B, Knuth A, and Boon, T, A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643-1647. (PMID: 1840703)
8. Old LJ. Cancer immunology: The search for specificity. *Cancer Res* 1981; 41: 361-375. (PMID: 7004632)
 9. Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, Old LJ. T cell-mediated cytotoxicity against malignant melanoma: Analysis with IL-2-dependent T cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3511-3515. (PMID: 6610177)
 10. Sahin, U, Türeci Ö, Schmitt, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11810-11813. (PMID: 8524854)
 11. Old LJ, Chen YT. New paths in human cancer serology. *J Exp Med* 1998; 187:1163-1167. (PMID: 9547328)
 12. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethé B, Lurquin C, Brasseur R, Chomez P, De Backer O, Cavenee W, and Boon T. Structure, chromosomal localization and expression of twelve genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994; 40: 360-369. (PMID: 7927540)
 13. Muscatelli F, Walker AP, De Plaen E, Stafford AN, Monaco AP. Isolation and characterization of a new MAGE gene family in the Xp21.3 region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4987-4991. (PMID: 7761436)
 14. Boël P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P. BAGE, a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 1995; 2: 167-175. (PMID: 7895173)

10

20

30

40

15. Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995;182: 689-698. (PMID: 7544395)

16. De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancer and in normal testis. *Cancer Res* 1999; 59: 3157-65. (PMID: 10397259) 10

17. Güre AO, Türeci Ö, Sahin U, Tsang S, Scanlan MJ, Jager E, Knuth A, Pfreundschuh M, Old LJ, Chen YT. SSX, a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int. J. Cancer* 1997; 72: 965-971. (PMID: 9378559)

18. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci Ö, Güre AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1997; 94: 1914-1918. (PMID: 9050879) 20

19. Lethe B, Lucas S, Michaux L, De Smet C, Godelaine D, Serrano A, De Plaen E, Boon T. LAGE-1: a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer* 1998;76:903-908. (PMID: 9626360) 30

20. Türeci Ö, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a new member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5211-5216. (PMID: 9560255)

21. Chen YT, Güre AO, Tsang S, Stockert E, Jäger E, Knuth A, Old LJ. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6919-6923. (PMID: 9618514) 40

【 0 2 9 2 】

【 表 1 3 】

22. Lucas S, De Smet C, Arden KC, Viars CS, Lethe B, Lurquin C, Boon T. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* 1998; 58: 743-752. (PMID: 9485030)
23. Sahin U, Koslowski M., Türeci Ö, Eberle T, Zwick C, Romeike B, Moringlane JR, Schwechheimer K, Feiden W., Pfreundschuh M. Expression of cancer/testis genes in human brain tumors. *Clin Cancer Res* 2000;10: 3916-3922. (PMID: 11051238) 10
24. Scanlan MJ, Altorki NK, Güre AO, Williamson B, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene CT9. *Cancer Lett.* 2000; 150:155-164. (PMID: 10704737)
25. Güre AO, Stockert E, Arden KC, Boyer AD, Viars CS, Scanlan MJ, Old LJ, Chen YT. CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational difference analysis. *Int. J. Cancer* 2000; 85: 726-732. (PMID: 10699956) 20
26. Lucas S, De Plaen E, Boon T. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2 and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int. J. Cancer* 2000; 87 :55-60. (PMID: 10861452) 30
27. Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN. CTp11, a novel member of the family of human cancer/testis antigens. *Cancer Res.* 1999, 59: 6223-6239. (PMID: 10626816)
28. Martelange V, De Smet C, De Palen E, Lurquin C, Boon, T. Identification on a human sarcoma of two new genes with tumor-specific expression. *Cancer Res* 2000; 60: 3848-3855. (PMID: 10919659) 40
29. Eichmüller S, Usener D, Dummer R, Stein A, Thiel D, Schadendorf D. Serological detection of cutaneous T cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 629-634. (PMID: 11149944)

30. Ono T, Kurashige T, Harada N, Noguchi Y, Saika T, Niikawa N, Aoe M, Nakamura S, Higashi T, Hiraki A, Wada H, Kumon H, Old L, Nakayama E. Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:3 282-3287. (PMID: 11248070)
31. Jungbluth A, Busam K, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, Spagnoli GC, Old LJ. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer*. 2000; 85 :460-5. (PMID: 10699915) 10
32. Jungbluth A, Busam K, Iversen, K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Zhang P, Old, LJ. Cancer-Testis (CT) antigens MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, and CT7 are expressed in female germ cells. *Mod Path*. In press 2001.
33. Jungbluth A, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Old LJ, Vogel M. Expression of CT (Cancer/Testis) antigens MAGE, NY-ESO-1, and CT7 in placenta. *German Soc for Path*. Submitted 2001. 20
34. Jungbluth A, Stockert E, Chen YT, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altorki N, Busam KJ, Old LJ. Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous expression pattern of MAGE-1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours. *British Journ Cancer* 2000; 83: 493-497. (PMID: 10945497) 30
35. Meuwissen RJL, Offenbergh, HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heting C. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 1992;11: 5091-5100. (PMID: 1464329)
36. Baba T, Niida Y, Michikawa Y, Kashiwabara S, Kodaira K, Takenaka M, Kohno N, Gerton GL, Arai Y. An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *J Biochem* 1994; 269:10133-10140. (PMID: 8144514) 40

【 0 2 9 4 】

【 表 1 5 】

37. Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, Lethe B, Carrel S, Arienti F, Suter L, Vanwijck R, Bourlond A, Humblet Y, Vacca A, Conese M, Lahaye T, Degiovanni G, Deraemaeker R, Beauduin M, Sastre X, Salamon E, Dréno B, Jäger E, Knuth A, Chevreau C, Suciú S, Lachapelle J-M, Pouillart P, Parmiani G, Lejeune F, Cerottini J-C, Boon T, Marchand M. Expression of MAGE gene in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1995; 63 :375-380. (PMID: 7591235)
38. Patard JJ, Brasseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, Francois P, Abi-Aad A, VanCangh P, Abbou CC, Chopin D, Boon T. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer* 1995; 64:60-64. PMID: 7665250
39. Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungluth A, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Tsushima T, Kumon H, Old LJ, Nakayama E. NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res.* 2001; 61:4671-4674.
40. Stockert E., Jäger E, Chen YT, Scanlan M, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old, LJ. A survey of the humoral response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 1998;187:1349-1354. (PMID: 9547346)
41. Jäger E., Nagata Y, Gnjjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: Correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4760-4765. (PMID: 10781081)
42. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996; 93:7149-7153 (PMID: 8692960)

10

20

30

40

【 0 2 9 5 】

【 表 1 6 】

43. Jungbluth A, Chen YT, Stockert E, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altorki N, Old LJ. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant tumors. *Int J Cancer*. 2001; 92:856-860.
44. Jungbluth A, Antonescu C, Busam K, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Ladanyi M, Old, LJ. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1, but not MAGE-A1 or CT7. *Int J Cancer*. 2001; 94(2):252-6. 10
45. Antonescu C, Busam K, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Spagnoli G, Ladanyi M, Old LJ, Jungbluth, A. MAGE antigen expression in monophasic and biphasic synovial sarcoma. *Mod Path*. Submitted 2001.
46. Beard J. The cancer problem. *Lancet* 1905;1:281-203. 20
47. Gurchot C. The trophoblast theory of cancer. *Oncology* 1975; 31: 310-333. (PMID: 1107920)
48. Iles RK, Chard T. Human Chorionic Gonadotropin Expression by Bladder Cancers: Biology and Clinical Potential. *J Urol* 1991; 145 :453-458. (PMID: 1705292)
49. Acevedo HF, Tong JY, Hartsock RJ. Human Chorionic Gonadotropin-Beta Subunit Gene Expression in Cultured Human Fetal and Cancer Cells of Different Types and Origins. *Cancer* 1995; 76: 1467-1475. (PMID: 8620425) 30
50. Dimhofer S, Koessler P, Ensigner C, Feichtinger H, Madersbacher S, Berger P. Production of Trophoblastic Hormones by Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: Association to Tumor Stage and Grade. *Hum Path* 1998; 29: 377-382. (PMID: 9563788) 40
51. Vidaeus CM, von Kapp-Herr C, Golden WL, Eddy RL, Shows TB, Herr JC. Human fertilin beta: identification, characterization, and chromosomal mapping of an ADAM gene family member. *Mol Reprod Dev*. 1997;46:363-9. 50

52. Brinkmann U, Vasmatzis G, Lee B, Yerushalmi N, Essand M, Pastan I. PAGE-1, an X chromosome-linked GAGE-like gene that is expressed in normal and neoplastic prostate, testis, and uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:10757-62.
53. Nagai Y, Aoki J, Sato T, Amano K, Matsuda Y, Arai H, et al. An alternative splicing form of phosphatidylserine-specific phospholipase A1 that exhibits lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase activity in humans. *J. Biol. Chem.* 1999;274:11053-9. 10
54. Dotzlaw H, Alkhalaf M, Murphy LC. Characterization of estrogen receptor variant mRNAs from human breast cancers. *Mol Endocrinol.* 1992;6:773-85.
55. Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1994;179:921-30. 20
56. Chen YT, Scanlan M J, Obata Y, Old LJ. Identification of human tumor antigens by serological expression cloning. (2000) In: Rosenberg SA. Principles and Practice of Biologic Therapy of Cancer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000:557-70.
57. Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 2000;16:83-7. 30
58. Roldan ER. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Front Biosci.* 1998; 3:D1109-19.
59. Scarcella DL, Chow CW, Gonzales MF, Economou C, Brasseur F, Ashley DM. Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:335-41. 40

【 0 2 9 7 】

【 表 1 8 】

60. Dropcho EJ, Chen YT, Posner JB, Old LJ. Cloning of a brain protein identified by autoantibodies from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:4552-56.
61. Dalmau J, Gultekin SH, Voltz R, Hoard R, DesChamps T, Balmaceda C, et al. Ma1, a novel neuron- and testis-specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain*. 1999;122: 27-39. 10
62. Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, Gerstner E, Eichen J, Posner JB, et al. A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Engl J Med*. 1999;340:1788-95.
63. Steimle V, Durand B, Barras E, Zufferey M, Hadam MR, Mach B, et al. A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev* 1995;9:1021-32. 20
64. Mach B, Steimle V, Reith W. MHC class II-deficient combined immunodeficiency: a disease of gene regulation. *Immunol Rev*. 1994;138:207-21.
65. Loging WT, Lal A, Siu IM, Loney TL, Wikstrand CJ, Marra MA, et al. Identifying potential tumor markers and antigens by database mining and rapid expression screening. *Genome Res*. 2000;10:1393-1402. 30

【 0 2 9 8 】

等価なもの

当業者は、ルーチンを超えない実験を用いて、本明細書中に記載された本発明の特定の態様に対する多くの等価なものを、認識するかまたは確認することができる。このような等価なものは、特許請求の範囲により包含されるべきであることを意図する。

本明細書中に開示されたすべての参考文献は、その全体を参照により本明細書中に組み込む。

【図面の簡単な説明】

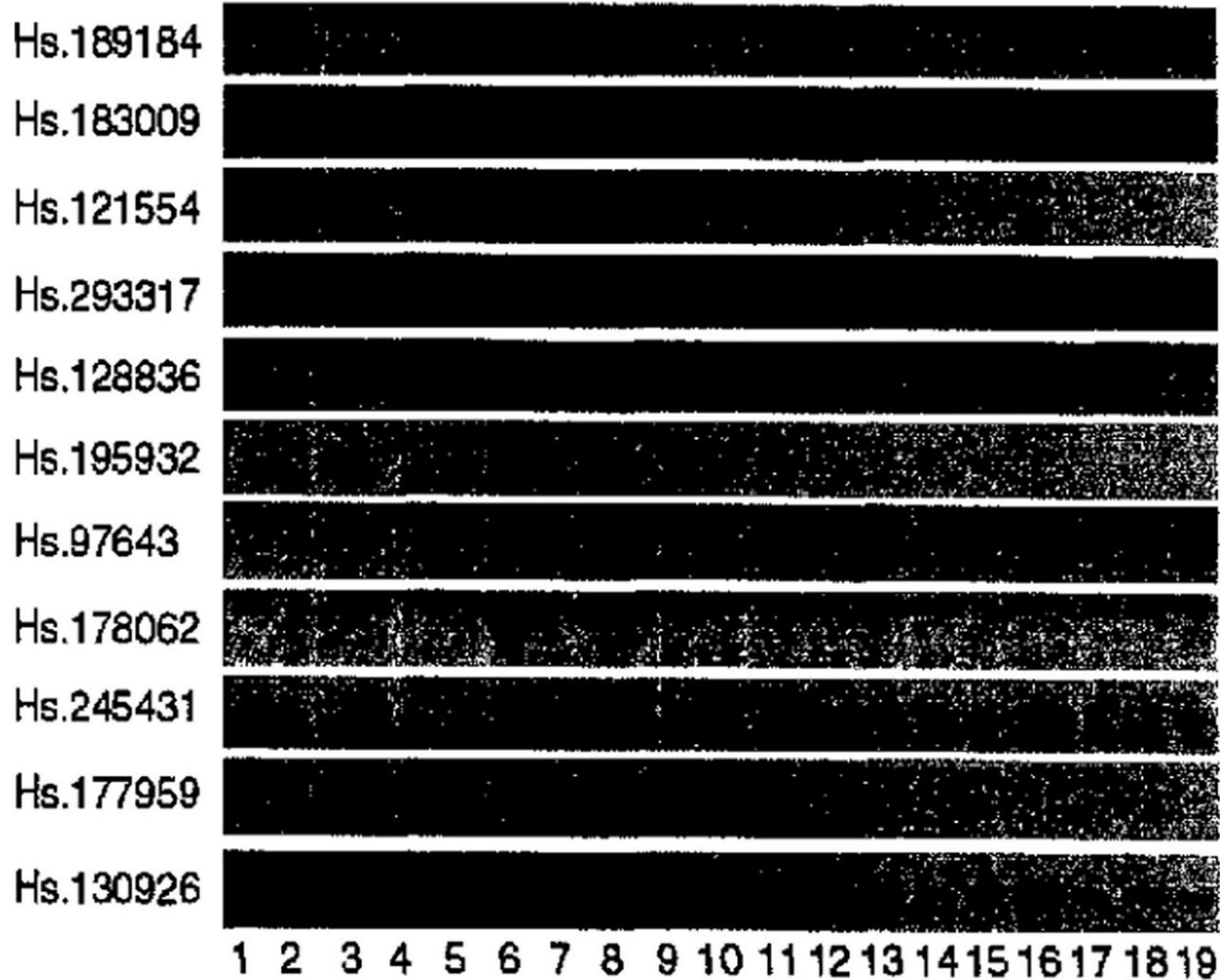
【 0 2 9 9 】

【図 1】図 1 は、正常な成熟した組織および癌における癌・精巣関連ユニジーンクラスターの R T - P C R 発現のデジタル画像である。図 1 A は、P C R 3 5 サイクル後の正常な成熟した組織における m R N A 転写産物の発現を示す図である。1 レーン：脳、2 レーン：腎臓、3 レーン：肝臓、4 レーン：脾臓、5 レーン：胎盤、6 レーン：精巣、7 レーン：小腸、8 レーン：心臓、9 レーン：前立腺、1 0 レーン：副腎、1 1 レーン：脾臓、1 2 レーン：大腸、1 3 レーン：胃、1 4 レーン：肺、1 5 レーン：膀胱、1 6 レーン：卵巣、1 7 レーン：乳房、1 8 レーン：子宮、1 9 レーン：骨格筋。転写産物の大部分は、Hs.183009、Hs.293317、Hs.128836 および Hs.130926 を除いて精巣に特異的なものである。Hs. 130926 の発現は、種々の組織試料の c D N A テンプレートインテグリティの陽性コントロールとして用いることができる。図 1 B は、腎臓癌（R C C 1、R C C 6、R C C 5 50

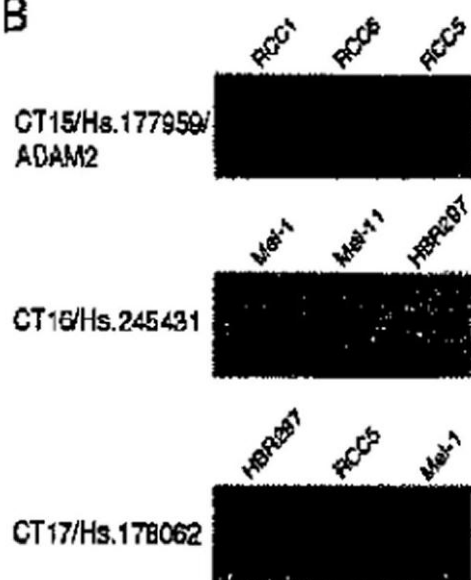
）の C T 1 5 / Hs.177959 m R N A 発現、メラノーマ（M e l - 1 および M e l - 1 1 ）
および乳癌の C T 1 6 / Hs.245431 m R N A 発現および乳癌（B R - 2 9 7 ）、腎臓癌（
R C C 5 ）およびメラノーマ（M e l - 1 ）の C T 1 7 / Hs.178062 m R N A 発現を示す
図である。

【図 1】

A



B



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/078526 A2(51) International Patent Classification⁷: A61B

(21) International Application Number: PCT/US02/09808

(22) International Filing Date: 29 March 2002 (29.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/280,718 30 March 2001 (30.03.2001) US
60/285,154 20 April 2001 (20.04.2001) US
60/327,432 5 October 2001 (05.10.2001) US
10/054,683 22 January 2002 (22.01.2002) US

[CH/US]: 605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US). CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. [US/US]; Cornell Business & Technology Park, 20 Thornwood Drive, Suite 105, Ithaca, NY 14850 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): OLD, Lloyd, J. [US/US]; 33rd Floor, 605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US). SCANLAIN, Matthew, J. [US/US]; 33rd Floor, 605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US). CHEN, Yao-Tseng [—/US]; The New York Hospital-Cornell Med. Center, Dept. of Pathology, 525 East 68th Street, New York, NY 10021 (US).

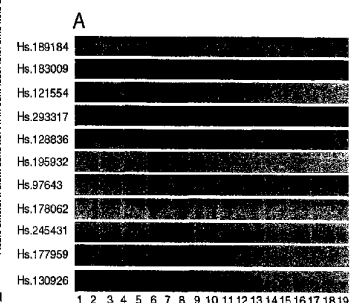
(74) Agent: VAN AMSTERDAM, John, R.; Wolf, Greenfield & Sacks, P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).

(71) Applicants (for all designated States except US): LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

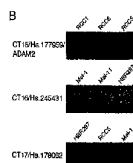
(81) Designated States (national): AU, CA, CN, JP, KR, US.

[Continued on next page]

(54) Title: CANCER-TESTIS ANTIGENS



(57) Abstract: Cancer-testis (CT) antigens have been identified by screening public databases for transcripts that are expressed in tumor tissues and a limited set of normal tissues, or by screening for genes that are expressed in cancer and testis tissues (but not other normal tissues). The invention relates to nucleic acids and encoded polypeptides which are CT antigens expressed in patients afflicted with cancer. The invention provides, *inter alia* isolated nucleic acid molecules, expression vectors containing those molecules and host cells transfected with those molecules. The invention also provides isolated proteins and peptides, antibodies to those proteins and peptides and cytotoxic T lymphocytes which recognize the proteins and peptides. Fragments of the foregoing including functional fragments and variants also are provided. Kits containing the foregoing molecules additionally are provided. The molecules provided by the invention can be used in the diagnosis, monitoring, research, or treatment of conditions characterized by the expression of one or more CT antigens.



WO 02/078526 A2

WO 02/078526 A2



(84) **Designated States (regional):** European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

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.

Published:

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

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 1 -

CANCER-TESTIS ANTIGENS**Related Applications**

This application is a continuation-in-part of application serial number 10/054,683,
5 filed January 22, 2002, now pending, which claims priority under 35 U.S.C. § 119(e) from
U.S. provisional application serial number 60/280,718, filed March 30, 2001, from U.S.
provisional application serial number 60/285,154, filed April 20, 2001, and from U.S.
provisional application serial number 60/327,432, filed October 5, 2001.

Field of the Invention

10 The invention relates to nucleic acids and encoded polypeptides which are novel
cancer-testis antigens expressed in a variety of cancers. The invention also relates to agents
which bind the nucleic acids or polypeptides. The nucleic acid molecules, polypeptides
coded for by such molecules and peptides derived therefrom, as well as related antibodies and
15 cytolytic T lymphocytes, are useful, *inter alia*, in diagnostic and therapeutic contexts.

Background of the Invention

It is a little acknowledged fact that the discipline of tumor immunology has been the
source of many findings of critical importance in cancer-related as well as cancer-unrelated
20 fields. For example, it was the search for tumor antigens that led to the discovery of the CD8
T cell antigen (1) and the concept of differentiation antigens (2) (and the CD system for
classifying cell surface antigens), and to the discovery of p53 (3). The immunogenetic
analysis of resistance to viral leukemogenesis provided the first link between the MHC and
disease susceptibility (4), and interest in the basis for non-specific immunity to cancer gave
25 rise to the discovery of TNF (5).

Another area of tumor immunology that holds great promise is the category of
antigens referred to as cancer/testis (CT) antigens, first recognized as targets for CD8 T cell
recognition of autologous human melanoma cells (6, 7). The molecular definition of these
antigens was a culmination of prior efforts to establish systems and methodologies for the
unambiguous analysis of humoral (8) and cellular (9) immune reactions of patients to
30 autologous tumor cells (autologous typing), and this approach of autologous typing also led

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 2 -

to the development of SEREX (serological analysis of cDNA expression libraries) for defining the molecular structure of tumor antigens eliciting a humoral immune response (10).

Although the usefulness of the known CT antigens in the diagnosis and therapy of cancer is accepted, the expression of these antigens in tumors of various types and sources is not universal. Accordingly, there is a need to identify additional CT antigens to provide more targets for diagnosis and therapy of cancer, and for the development of pharmaceuticals useful in diagnostic and therapeutic applications.

Summary of the Invention

Bioinformatic analysis of sequence databases has been applied to identify sequences having expression characteristics that fit the profile of cancer/testis antigens. Several novel cancer/testis antigens and cancer associated antigens have been identified. The invention provides, *inter alia*, isolated nucleic acid molecules, expression vectors containing those molecules and host cells transfected with those molecules. The invention also provides isolated proteins and peptides, antibodies to those proteins and peptides and CTLs which recognize the proteins and peptides. Fragments and variants of the foregoing also are provided. Kits containing the foregoing molecules additionally are provided. The foregoing can be used in the diagnosis, monitoring, research, or treatment of conditions characterized by the expression of one or more cancer-testis and/or cancer associated antigens.

Prior to the present invention, only a handful of cancer/testis antigens had been identified in the past 20 years. The invention involves the surprising discovery of several sequence clusters (UniGene) in sequence databases that have expression patterns that fit the profile of cancer-testis antigens. Other sequence clusters fit the profile of cancer associated antigens. The knowledge that these sequence clusters have these certain expression patterns makes the sequences useful in the diagnosis, monitoring and therapy of a variety of cancers.

The invention involves the use of a single material, a plurality of different materials and even large panels and combinations of materials. For example, a single gene, a single protein encoded by a gene, a single functional fragment thereof, a single antibody thereto, etc. can be used in methods and products of the invention. Likewise, pairs, groups and even panels of these materials and optionally other CT antigen genes and/or gene products can be used for diagnosis, monitoring and therapy. The pairs, groups or panels can involve 2, 3, 4, 5 or more genes, gene products, fragments thereof or agents that recognize such materials. A

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 3 -

plurality of such materials are not only useful in monitoring, typing, characterizing and diagnosing cells abnormally expressing such genes, but a plurality of such materials can be used therapeutically. An example of the use of a plurality of such materials for the prevention, delay of onset, amelioration, etc. of cancer cells, which express or will express such genes prophylactically or acutely. Any and all combinations of the genes, gene products, and materials which recognize the genes and gene products can be tested and identified for use according to the invention. It would be far too lengthy to recite all such combinations; those skilled in the art, particularly in view of the teaching contained herein, will readily be able to determine which combinations are most appropriate for which circumstances.

As will be clear from the following discussion, the invention has *in vivo* and *in vitro* uses, including for therapeutic, diagnostic, monitoring and research purposes. One aspect of the invention is the ability to fingerprint a cell expressing a number of the genes identified according to the invention by, for example, quantifying the expression of such gene products. Such fingerprints will be characteristic, for example, of the stage of the cancer, the type of the cancer, or even the effect in subjects or animal models of a therapy on a cancer. Cells also can be screened to determine whether such cells abnormally express the genes identified according to the invention.

According to one aspect of the invention, methods of diagnosing a disorder are provided. The methods include contacting a non-testis biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, and determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

In certain embodiments, the agent is selected from the group consisting of (a) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48 or a fragment thereof, (b) an antibody that binds to an expression product of a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, (c) an agent that binds to a complex of an HLA molecule and a fragment of an expression product of a nucleic acid

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 4 -

molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, and (d) a polypeptide that binds the antibody that binds the expression product or fragment.

5 In other embodiments, the cancer is characterized by expression of a plurality of human CT antigen precursors and wherein the agent is a plurality of agents, each of which is specific for a different human CT antigen precursor, and wherein said plurality of agents is at least 2, at least 3, at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, or at least 8, at least 9 or at least 10 such agents.

10 According to another aspect of the invention, methods of diagnosing a cancer are provided. The methods include contacting a non-testis, non-brain biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, or a fragment of an expression product thereof complexed with an HLA molecule, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:32, and determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

15 According to a further aspect of the invention, other methods of diagnosing a cancer are provided. The methods include contacting a non-testis, non-ovary, non-cervix, non-lung biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, or a fragment of an expression product thereof complexed with an HLA molecule, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:34, and determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

20 According to still another aspect of the invention, other methods of diagnosing a cancer are provided. These methods include contacting a non-testis, non-ovary, non-lung, non-breast, non-prostate, non-colon biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, or a fragment of an expression product thereof complexed with an HLA molecule, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:36, and determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

25 According to another aspect of the invention, other methods of diagnosing a cancer are provided. These methods include contacting a non-testis, non-placenta, non-lung, non-

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 5 -

breast, non-prostate biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:38, and determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

According to yet another aspect of the invention, other methods of diagnosing a cancer are provided. These methods include contacting a non-testis, non-ovary, non-placenta, non-lung, non-prostate, non-cervix biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:40, and determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

According to a further aspect of the invention, other methods of diagnosing a cancer are provided. These methods include contacting a non-testis, non-ovary, non-prostate biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:51, and determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

In another aspect of the invention, methods for determining regression, progression or onset of a cancer characterized by expression of abnormal levels of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48 are provided. The methods include monitoring a plurality of non-testis samples obtained at different times from a subject who has or is suspected of having the cancer, for a parameter selected from the group consisting of (i) the protein, (ii) a peptide derived from the protein, (iii) an antibody which selectively binds the protein or peptide, (iv) cytolytic T cells specific for a complex of the peptide derived from the protein and an MHC molecule, and (v) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 6 -

selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48. The methods also include comparing the parameters from the plurality of samples to determine regression, progression or onset of the cancer.

5 In some embodiments, the sample is a body fluid, a body effusion, cell or a tissue. In other embodiments, the step of monitoring comprises contacting the sample with a detectable agent selected from the group consisting of (a) an antibody which selectively binds the protein of (i) or the peptide of (ii), (b) a protein or peptide which binds the antibody of (iii), (c) a cell which presents the complex of the peptide and MHC molecule of (iv), and (d) at least one nucleic acid probe or primer that hybridizes to the nucleic acid molecule of (v) or its complement. Preferably the antibody, the protein, the peptide, the cell or the nucleic acid probe or primer is labeled with a radioactive label or an enzyme. In further embodiments, the protein is a plurality of proteins, the parameter is a plurality of parameters, each of the plurality of parameters being specific for a different of the plurality of proteins, at least one of which is a CT antigen protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

10 According to yet another aspect of the invention, pharmaceutical preparations for a human subject are provided. The pharmaceutical preparations include an agent which, when administered to the subject, enriches selectively the presence of complexes of an HLA molecule and a human CT antigen peptide, and a pharmaceutically acceptable carrier. The human CT antigen peptide is a fragment of a human CT antigen encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

15 In some embodiments, the foregoing pharmaceutical preparations includes a plurality of agents, each of which enriches selectively in the subject complexes of an HLA molecule and a different human CT antigen peptide, wherein at least one of the human CT antigens is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

20 In other embodiments of the foregoing pharmaceutical preparations, the agent is selected from the group consisting of (1) an isolated polypeptide comprising the human CT antigen peptide, (2) an isolated nucleic acid operably linked to a promoter for expressing the isolated polypeptide, (3) a host cell expressing the isolated polypeptide, and (4) isolated complexes of the polypeptide and an HLA molecule.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 7 -

In still other embodiments, the agent is a cell expressing an isolated polypeptide comprising the human CT antigen peptide, or a cell expressing an isolated polypeptide comprising the human CT antigen peptide, and an HLA molecule that binds the polypeptide. In certain of these embodiments, the cell expresses the polypeptide and/or the HLA molecule recombinationally. Preferably, the foregoing cells are nonproliferative.

The foregoing pharmaceutical preparations preferably also include an adjuvant.

According to another aspect of the invention, compositions are provided. The compositions include an isolated agent that binds selectively a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:21, 23, 25, 27, 29, 31, 35 and 37. Preferably, the agent is an antibody or an antigen-binding fragment thereof. More preferably, the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody or a humanized antibody. Also provided are compositions of matter include one or more conjugates of the foregoing agents and a therapeutic or diagnostic agent. Preferably the therapeutic or diagnostic agent is a toxin.

Pharmaceutical compositions are provided in another aspect of the invention. The compositions include an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, and a pharmaceutically acceptable carrier. In some embodiments, the isolated nucleic acid molecule comprises at least two isolated nucleic acid molecules coding for two different polypeptides, each polypeptide comprising a different human CT antigen. In other embodiments, the foregoing pharmaceutical compositions also include an expression vector with a promoter operably linked to the isolated nucleic acid molecule. In still other embodiments, the foregoing pharmaceutical compositions also include a host cell recombinationally expressing the isolated nucleic acid molecule.

In a further aspect of the invention, additional pharmaceutical compositions are provided. The compositions include an isolated polypeptide comprising a polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, and a pharmaceutically acceptable carrier. In certain embodiments, the isolated polypeptide includes at least two different polypeptides, each comprising a different human CT antigen. In still other embodiments, the foregoing pharmaceutical compositions also include an adjuvant.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 8 -

According to yet another aspect of the invention, protein microarrays are provided. The protein microarrays include at least one polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, or an antigenic fragment of the at least one polypeptide. In preferred
5 embodiments, the at least one polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19, 21, 23, 47, 49 and 50.

According to yet a further aspect of the invention, protein microarrays are provided. The protein microarrays include at least one polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:24, 26,
10 28 and 30, or an antigenic fragment of the polypeptide. Preferably, the at least one polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:25, 27, 29 and 31.

Additional protein microarrays are provided according to another aspect of the invention. The microarrays include at least one polypeptide encoded by a nucleic acid
15 molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:32, 34, 36, 38, 40 and 51, or an antigenic fragment of the polypeptide. Preferably the at least one polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:33, 35, 37, 39, 41 and 52.

In another aspect of the invention, protein microarrays are provided that include a
20 plurality of antibodies or antigen-binding fragments thereof that specifically bind at least one polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the groups consisting of (i) SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48; (ii) SEQ ID NOs:24, 26, 28 and 30; or (iii) SEQ ID NOs:32, 34, 36, 38, 40 and 51; or antigenic fragments of the foregoing polypeptides. Preferably, the polypeptides include at least one amino acid
25 sequence selected from the groups consisting of (i) SEQ ID NOs:19, 21, 23, 47, 49 and 50; (ii) SEQ ID NOs:25, 27, 29 and 31; or (iii) SEQ ID NOs:33, 35, 37, 39, 41 and 52.

According to still another aspect of the invention, nucleic acid microarrays are provided that include at least one nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the groups consisting of (i) SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48; (ii) SEQ ID
30 NOs:24, 26, 28 and 30; or (iii) SEQ ID NOs:32, 34, 36, 38, 40 and 51; or fragments thereof of at least 20 nucleotides that selectively hybridizes to its complement in a biological sample.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 9 -

Also provided in accordance with a further aspect of the invention are isolated fragments of a human CT antigen which, or a portion of which, binds a HLA molecule or a human antibody. The foregoing CT antigens are encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48. In some embodiments, the fragment is part of a complex with the HLA molecule. Preferably the fragment is between 8 and 12 amino acids in length.

According to yet another aspect of the invention, kits for detecting the expression of two or more human CT antigens are provided. The kits include two or more pairs of isolated nucleic acid molecules, each of which consists essentially of a nucleic acid molecule selected from the group consisting of (a) a 12-32 nucleotide contiguous segment of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 or 48, and (b) complements of (a), wherein the contiguous segments are nonoverlapping, and wherein the nucleic acid molecules in each of the pairs are specific for a human CT antigen. In certain embodiments, the pair of isolated nucleic acid molecules is constructed and arranged to selectively amplify at least a fragment of an isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

Also provided in an additional aspect of the invention are methods for treating a subject with a cancer characterized by expression of a human CT antigen. The methods include administering to the subject an amount of an agent, which enriches selectively in the subject the presence of complexes of a HLA molecule and a human CT antigen peptide, effective to ameliorate the disorder. The human CT antigen peptide is a fragment of a human CT antigen encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48. In certain embodiments, the cancer is characterized by expression of a plurality of human CT antigens and wherein the agent is a plurality of agents, each of which enriches selectively in the subject the presence of complexes of an HLA molecule and a different human CT antigen peptide, wherein at least one of the human CT antigens is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48. In other embodiments, the agent is an isolated polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 10 -

In a further aspect of the invention, methods for treating a subject having a cancer characterized by expression of a human CT antigen in cells of the subject are provided. The methods include (i) removing an immunoreactive cell containing sample from the subject, (ii) contacting the immunoreactive cell containing sample to the host cell under conditions
5 favoring production of cytolytic T cells against a human CT antigen peptide that is a fragment of the human CT antigen, and (iii) introducing the cytolytic T cells to the subject in an amount effective to lyse cells which express the human CT antigen. In these methods, the host cell is transformed or transfected with an expression vector comprising an isolated nucleic acid molecule operably linked to a promoter, wherein the isolated nucleic acid
10 molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48. In different embodiments of the foregoing methods, the host cell recombinantly or endogenously expresses an HLA molecule which binds the human CT antigen peptide.

In still another aspect of the invention, methods for treating a subject having a cancer
15 characterized by expression of a human CT antigen in cells of the subject are provided. The methods include (i) identifying a nucleic acid molecule expressed by the cells of the cancer, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, or a fragment thereof; (ii) transfecting a host cell with a nucleic acid molecule selected from the group consisting of (a) the nucleic
20 acid molecule identified, (b) a fragment of the nucleic acid identified which includes a segment coding for a human CT antigen, (c) degenerates of (a) or (b) (iii) culturing said transfected host cells to express the transfected nucleic acid molecule, and; (iv) introducing an amount of said host cells or an extract thereof to the subject effective to increase an immune response against the cells of the subject associated with the condition.

In certain embodiments, the foregoing methods also include identifying an MHC
25 molecule which presents a portion of an expression product of the nucleic acid molecule, wherein the host cell expresses the same MHC molecule as identified and wherein the host cell presents an MHC binding portion of the expression product of the nucleic acid molecule. In other embodiments, the immune response comprises a B-cell response or a T cell response.
30 Preferably the response is a T-cell response which comprises generation of cytolytic T-cells specific for the host cells presenting the portion of the expression product of the nucleic acid molecule or cells of the subject expressing the human CT antigen.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 11 -

In some embodiments, the nucleic acid molecule is selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48. In still other embodiments, the methods also include treating the host cells to render them non-proliferative.

According to yet another aspect of the invention, methods for treating or diagnosing
5 or monitoring a subject having a cancer characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis are provided. The methods include administering to the subject an antibody which specifically binds to the protein or a peptide derived therefrom, the antibody being coupled to a therapeutically or
10 diagnostically useful agent, in an amount effective to treat, diagnose or monitor the condition.

In some embodiments, the antibody is a monoclonal antibody or an antigen-binding fragment thereof. Preferably the monoclonal antibody is a chimeric antibody or a humanized antibody.

In another aspect of the invention, methods are provided for treating a cancer
15 characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis. The methods include administering to a subject one or more of the foregoing pharmaceutical compositions in an amount effective to prevent, delay the onset of, or inhibit the condition in the subject. In some embodiments, the methods also
20 include first identifying that the subject expresses abnormal amounts of the protein in a non-testis tissue.

According to another aspect of the invention, methods for treating a subject having a cancer characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20,
25 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis are provided. The methods include (i) identifying cells from the subject which express abnormal amounts of the protein; (ii) isolating a sample of the cells; (iii) cultivating the cells, and (iv) introducing the cells to the subject in an amount effective to provoke an immune response against the cells. In certain embodiments, the methods also include rendering the cells non-proliferative, prior to
30 introducing them to the subject.

Methods for treating a pathological cell condition characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 12 -

the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis, are provided in accordance with another aspect of the invention. The methods include administering to a subject in need thereof an effective amount of an agent which inhibits the expression or activity of the protein. In some embodiments, the agent is an inhibiting antibody which selectively binds to the protein and wherein the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody or an antibody fragment. In other embodiments, the agent is an antisense nucleic acid molecule which selectively binds to the nucleic acid molecule which encodes the protein.

Also provided in accordance with a further aspect of the invention are compositions of matter useful in stimulating an immune response to a plurality of proteins comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19, 21, 23, 47, 49 and 50. The compositions include a plurality of peptides that are fragments of the proteins, wherein the peptides bind to one or more MHC molecules presented on the surface of non-testis cells. In certain embodiments of the compositions, at least a portion of the plurality of peptides bind to MHC molecules and elicit a cytolytic response thereto. In other embodiments, at least one of the proteins is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48. Preferably, the compositions also include an adjuvant. Preferred adjuvants include saponins, GM-CSF, interleukins, and immunostimulatory oligonucleotides.

In another aspect of the invention, isolated antibodies are provided which selectively binds to a complex of: (i) a peptide that is a fragment of a protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19, 21, 23, 47, 49 and 50, and (ii) a MHC molecule to which binds the peptide to form the complex, wherein the isolated antibody does not bind to (i) or (ii) alone. Preferably the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, or an antigen-binding fragment thereof.

According to a further aspect of the invention, methods are provided for treating or diagnosing or monitoring a subject having a cancer characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis.

The methods include administering to the subject the foregoing antibodies, in an amount effective to treat, diagnose or monitor the condition. Preferably the antibodies are coupled to one or more therapeutically or diagnostically useful agents.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 13 -

The invention also involves the use of the genes, gene products, fragments thereof, agents which bind thereto, and so on in the preparation of medicaments. Preferably the medicaments are for treating cancer.

These and other aspects of the invention will be described in further detail in connection with the detailed description of the invention.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows a digitized image of RT-PCR expression analysis of cancer/testis-associated Unigene clusters in normal adult tissues and cancer. Fig. 1A shows the expression of mRNA transcripts in normal adult tissue following 35 cycles of PCR. Lane 1, brain; 2, kidney; 3, liver; 4, pancreas; 5, placenta; 6, testis; 7, small intestine; 8, heart; 9, prostate; 10, adrenal gland; 11, spleen; 12, colon; 13, stomach; 14, lung; 15, bladder; 16, ovary; 17, mammary gland; 18, cervix; 19, skeletal muscle. The majority of transcripts are testis-specific, with the exceptions of Hs.183009, Hs.293317, Hs. 128836, and Hs.130926. Expression of Hs.130926 was used as a positive control for cDNA template integrity of the various tissue samples. Fig. 1B shows RT-PCR analysis of CT15/Hs.177959 mRNA expression in renal cancer (RCC1, RCC6, RCC5), CT16/Hs245431 mRNA expression in melanoma (Mel-1 and Mel-11) and breast cancer; and CT17/Hs.178062 mRNA expression in breast cancer (BR-297), renal cancer (RCC5) and melanoma (Mel-1).

Detailed Description of the Invention

As a consequence of T cell epitope cloning and SEREX analysis, a growing number of cancer-testis (CT) antigens have now been defined. See Table 1 and references cited therein. There are now 14 genes or gene families identified that code for presumptive cancer-testis antigens.

Table 1: Cancer-testis (CT) antigens

CT*	System	# Genes	Chromosome Location	Detection System**	Refs.
1	MAGE	16	Xq28/Xp21	T, Ab	7, 10, 12, 13
2	BAGE	2	Unknown	T	14
3	GAGE	9	Xp11	T	15, 16
4	SSX	>5	Xp11	Ab	10, 17
5	NY-ESO-1	2	Xq28	Ab, T, RDA	18, 19

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 14 -

	LAGE-1				
6	SCP-1	3	1p12-p13	Ab	20
7	CT7/MAGE-C1	1	Xq26	Ab, RDA	21, 22
8	CT8	1	Unknown	Ab	23
9	CT9	1	1p	Ab	24
10	CT10/MAGE-C2	1	Xq27	RDA, Ab	25, 26
11	CT11p	1	Xq26- Xq27	***	27
12	SAGE	1	Xq28	RDA	28
13	cTAGE-1	1	18p11	Ab	29
14	OY-TES-1	2	12p12-p13	Ab	30

* Numbered according to the CT nomenclature proposed by Old & Chen (11).

** Ab=Antibody, T=CD8+ T cell, RDA=representational difference analysis.

*** Defined by differential mRNA expression in a parental vs. metastatic melanoma cell variant.

5

A thorough analysis of these gene reveals that they encode products with the following characteristics.

i) mRNA expression in normal tissues is restricted to testis, fetal ovary, and placenta, with little or no expression detected in adult ovary.

10 ii) mRNA expression in cancers of diverse origin is common - up to 30-40% of a number of different cancer types, e.g., melanoma, bladder cancer, sarcoma express one or more CT antigens.

iii) The X chromosome codes for the majority of CT antigens, but a number of more recently defined CT coding genes have a non-X chromosomal locus.

15 iv) In normal adult testis, expression of CT antigens is primarily restricted to immature germ cells -, e.g., spermatogonia (31). However, a recently defined CT antigen, OY-TES-1, is clearly involved in late stages of sperm maturation (see below). In fetal ovary, immature germ cells (oogonia/primary oocytes) express CT antigens, whereas oocytes in the resting primordial follicles do not (32). In fetal placenta, both cytotrophoblast and
20 syncytiotrophoblast express CT antigens, but in term placenta, CT antigen expression is weak or absent (33).

v) A highly variable pattern of CT antigen expression is found in different cancers, from tumors showing only single positive cells or small cluster of positive cells to other tumors with a generally homogeneous expression pattern (31, 34).

25 vi) The function of most CT antigens is unknown, although some role in regulating gene expression appears likely. Two CT antigens, however, have known roles in gamete development - SCP-1, the synaptonemal complex protein, is involved in chromosomal

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 15 -

reduction during meiosis (35), and OY-TES-1 is a proacrosin binding protein sp32 precursor thought to be involved in packaging acrosin in the acrosome in the sperm head (36).

vii) There is increasing evidence that CT expression is correlated with tumor progression and with tumors of higher malignant potential. For instance, a higher frequency of MAGE mRNA expression is found in metastatic vs. primary melanoma (37) and in
5 invasive vs. superficial bladder cancer (38), and NY-ESO-1 expression in bladder cancer is correlated with high nuclear grade (39).

viii) There appears to be considerable variation in the inherent immunogenicity of different CT antigens as indicated by specific CD8⁺ T cell and antibody responses in patients with antigen positive tumors. To date, NY-ESO-1 appears to have the strongest spontaneous
10 immunogenicity of any of the CT antigens - e.g., up to 50% of patients with advanced NY-ESO-1⁺ tumors develop humoral and cellular immunity to NY-ESO-1 (40, 41).

These characteristics indicate the desirability of cancer-testis antigens for use in diagnostics and therapeutics. These characteristics also provide a basis for the identification
15 of additional cancer-testis antigens.

While others have attempted to identify cancer related sequences in public databases by the use of bioinformatics techniques, (e.g., database mining plus rapid screening by fluorescent-PCR expression, Loging et al., *Genome Res* 10(9):1393-402, 2000), these techniques have not focused on the identification of nucleic acid sequences that the preferred
20 cancer-testis antigen profile. In particular, the present invention includes the identification of cancer-testis sequences by more stringent criteria. The database analysis criteria for identifying cancer-testis antigen sequences include the requirement that the sequences are expressed in cancers from at least two different tissues, and preferably are expressed in cancers from at least three different tissues. In addition, the sequences preferably have
25 normal tissue expression restricted to one or more tissue selected from the group consisting of testis, placenta and ovary (preferably only fetal ovary).

In the above summary and in the ensuing description, lists of sequences are provided. The lists are meant to embrace each single sequence separately, two or more sequences together where they form a part of the same gene, any combination of two or more sequences
30 which relate to different genes, including and up to the total number on the list, as if each and every combination were separately and specifically enumerated. Likewise, when mentioning fragment size, it is intended that a range embrace the smallest fragment mentioned to the full-

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 16 -

length of the sequence (less one nucleotide or amino acid so that it is a fragment), each and every fragment length intended as if specifically enumerated. Thus, if a fragment could be between 10 and 15 in length, it is explicitly meant to mean 10, 11, 12, 13, 14, or 15 in length.

The summary and the claims mention antigen precursors and antigens. As used in the summary and in the claims, a precursor is substantially the full-length protein encoded by the coding region of the isolated nucleic acid and the antigen is a peptide which complexes with MHC, preferably HLA, and which participates in the immune response as part of that complex. Such antigens are typically 9 amino acids long, although this may vary slightly.

As used herein, a subject is a human, non-human primate, cow, horse, pig, sheep, goat, dog, cat or rodent. In all embodiments human cancer antigens and human subjects are preferred.

The present invention in one aspect involves the identification of human CT gene products by mining databases (e.g., Unigene) for transcripts expressed exclusively in cancer and normal testis. Subsequent mRNA expression analysis of candidate transcripts identified several gene products with highly restricted mRNA expression patterns, some of which are classified as CT antigens. The sequences representing CT antigen genes identified according to the methods described herein are presented in the attached Sequence Listing. In another aspect the invention involves the identification of human CT antigens using autologous antisera of subjects having cancer. The nature of the sequences as encoding CT antigens recognized by the immune systems of cancer patients is, of course, unexpected.

The invention thus involves in one aspect CT antigen polypeptides, genes encoding those polypeptides, functional modifications and variants of the foregoing, useful fragments of the foregoing, as well as diagnostics and therapeutics relating thereto.

Homologs and alleles of the CT antigen nucleic acids of the invention can be identified by conventional techniques, including those techniques used in the Examples. Thus, an aspect of the invention is those nucleic acid sequences which code for CT antigen precursors.

The term "high stringency hybridization conditions" as used herein refers to parameters with which the art is familiar. Nucleic acid hybridization parameters may be found in references which compile such methods, e.g. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, or *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 17 -

Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. More specifically, high stringency conditions, as used herein, refers, for example, to hybridization at 65°C in hybridization buffer (3.5 x SSC, 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinyl pyrrolidone, 0.02% Bovine Serum Albumin, 2.5mM NaH₂PO₄(pH7), 0.5% SDS, 2mM EDTA). SSC is 0.15M sodium chloride/0.15M sodium citrate, pH7; SDS is sodium dodecyl sulphate; and EDTA is ethylenediaminetetracetic acid. After hybridization, the membrane upon which the DNA is transferred is washed, for example, in 2 x SSC at room temperature and then at 0.1 - 0.5 x SSC/0.1 x SDS at temperatures up to 68°C.

There are other conditions, reagents, and so forth which can be used, which result in a similar degree of stringency. The skilled artisan will be familiar with such conditions, and thus they are not given here. It will be understood, however, that the skilled artisan will be able to manipulate the conditions in a manner to permit the clear identification of homologs and alleles of CT antigen nucleic acids of the invention (e.g., by using lower stringency conditions). The skilled artisan also is familiar with the methodology for screening cells and libraries for expression of such molecules which then are routinely isolated, followed by isolation of the pertinent nucleic acid molecule and sequencing.

In general homologs and alleles typically will share at least about 75% nucleotide identity and/or at least about 90% amino acid identity to the sequences of CT antigen nucleic acid and polypeptides, respectively, in some instances will share at least about 90% nucleotide identity and/or at least about 95% amino acid identity, in still other instances will share at least about 95% nucleotide identity and/or at least about 99% amino acid identity, and in further instances will share at least about 98% nucleotide identity and/or at least about 99.5% amino acid identity. The homology can be calculated using various, publicly available software tools developed by NCBI (Bethesda, Maryland) that can be obtained through the internet (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pub/>). Exemplary tools include the BLAST software available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, using default settings. Pairwise and ClustalW alignments (BLOSUM30 matrix setting) as well as Kyte-Doolittle hydropathic analysis can be obtained using the MacVector sequence analysis software (Oxford Molecular Group). Watson-Crick complements of the foregoing nucleic acids also are embraced by the invention.

In screening for CT antigen genes, a Southern blot may be performed using the foregoing conditions, together with a radioactive probe. After washing the membrane to which the DNA is finally transferred, the membrane can be placed against X-ray film to

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 18 -

detect the radioactive signal. In screening for the expression of CT antigen nucleic acids, Northern blot hybridizations using the foregoing can be performed on samples taken from cancer patients or subjects suspected of having a condition characterized by expression of CT antigen genes. Amplification protocols such as polymerase chain reaction using primers
5 which hybridize to the sequences presented also can be used for detection of the CT antigen genes or expression thereof.

The invention also includes degenerate nucleic acids which include alternative codons to those present in the native materials. For example, serine residues are encoded by the codons TCA, AGT, TCC, TCG, TCT and AGC. Each of the six codons is equivalent for the
10 purposes of encoding a serine residue. Thus, it will be apparent to one of ordinary skill in the art that any of the serine-encoding nucleotide triplets may be employed to direct the protein synthesis apparatus, *in vitro* or *in vivo*, to incorporate a serine residue into an elongating CT antigen polypeptide. Similarly, nucleotide sequence triplets which encode other amino acid residues include, but are not limited to: CCA, CCC, CCG and CCT (proline codons); CGA,
15 CGC, CGG, CGT, AGA and AGG (arginine codons); ACA, ACC, ACG and ACT (threonine codons); AAC and AAT (asparagine codons); and ATA, ATC and ATT (isoleucine codons). Other amino acid residues may be encoded similarly by multiple nucleotide sequences. Thus, the invention embraces degenerate nucleic acids that differ from the biologically isolated nucleic acids in codon sequence due to the degeneracy of the genetic code.

The invention also provides modified nucleic acid molecules which include additions, substitutions and deletions of one or more nucleotides. In preferred embodiments, these modified nucleic acid molecules and/or the polypeptides they encode retain at least one activity or function of the unmodified nucleic acid molecule and/or the polypeptides, such as antigenicity, enzymatic activity, receptor binding, formation of complexes by binding of
25 peptides by MHC class I and class II molecules, etc. In certain embodiments, the modified nucleic acid molecules encode modified polypeptides, preferably polypeptides having conservative amino acid substitutions as are described elsewhere herein. The modified nucleic acid molecules are structurally related to the unmodified nucleic acid molecules and in preferred embodiments are sufficiently structurally related to the unmodified nucleic acid molecules so that the modified and unmodified nucleic acid molecules hybridize under
30 stringent conditions known to one of skill in the art.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 19 -

For example, modified nucleic acid molecules which encode polypeptides having single amino acid changes can be prepared. Each of these nucleic acid molecules can have one, two or three nucleotide substitutions exclusive of nucleotide changes corresponding to the degeneracy of the genetic code as described herein. Likewise, modified nucleic acid molecules which encode polypeptides having two amino acid changes can be prepared which have, e.g., 2-6 nucleotide changes. Numerous modified nucleic acid molecules like these will be readily envisioned by one of skill in the art, including for example, substitutions of nucleotides in codons encoding amino acids 2 and 3, 2 and 4, 2 and 5, 2 and 6, and so on. In the foregoing example, each combination of two amino acids is included in the set of modified nucleic acid molecules, as well as all nucleotide substitutions which code for the amino acid substitutions. Additional nucleic acid molecules that encode polypeptides having additional substitutions (i.e., 3 or more), additions or deletions (e.g., by introduction of a stop codon or a splice site(s)) also can be prepared and are embraced by the invention as readily envisioned by one of ordinary skill in the art. Any of the foregoing nucleic acids or polypeptides can be tested by routine experimentation for retention of structural relation or activity to the nucleic acids and/or polypeptides disclosed herein.

The invention also provides isolated fragments of CT antigen nucleic acid sequences or complements thereof, and in particular unique fragments. A unique fragment is one that is a 'signature' for the larger nucleic acid. It, for example, is long enough to assure that its precise sequence is not found in molecules within the human genome outside of the CT antigen nucleic acids defined above (and human alleles). Those of ordinary skill in the art may apply routine procedures to determine if a fragment is unique within the human genome, such as the use of publicly available sequence comparison software to selectively distinguish the sequence fragment of interest from other sequences in the human genome, although *in vitro* confirmatory hybridization and sequencing analysis may be performed.

Fragments can be used as probes in Southern and Northern blot assays to identify CT antigen nucleic acids, or can be used in amplification assays such as those employing PCR. As known to those skilled in the art, large probes such as 200, 250, 300 or more nucleotides are preferred for certain uses such as Southern and Northern blots, while smaller fragments will be preferred for uses such as PCR. Fragments also can be used to produce fusion proteins for generating antibodies or determining binding of the polypeptide fragments, or for generating immunoassay components. Likewise, fragments can be employed to produce

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 20 -

nonfused fragments of the CT antigen polypeptides, useful, for example, in the preparation of antibodies, and in immunoassays. Fragments further can be used as antisense molecules to inhibit the expression of CT antigen nucleic acids and polypeptides, particularly for therapeutic purposes as described in greater detail below.

5 As mentioned above, this disclosure intends to embrace each and every fragment of each sequence, beginning at the first nucleotide, the second nucleotide and so on, up to 8 nucleotides short of the end, and ending anywhere from nucleotide number 8, 9, 10 and so on for each sequence, up to the entire length of the disclosed sequence. Preferred fragments are those useful as amplification primers, e.g., typically between 12 and 32 nucleotides (e.g. 12,
10 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 and 32) in length.

Those skilled in the art are well versed in methods for selecting such sequences, typically on the basis of the ability of the fragment to selectively distinguish the sequence of interest from other sequences in the human genome of the fragment to those on known databases typically is all that is necessary, although *in vitro* confirmatory hybridization and
15 sequencing analysis may be performed.

Especially preferred fragment include nucleic acids encoding a series of epitopes, known as "polytopes". The epitopes can be arranged in sequential or overlapping fashion (see, e.g., Thomson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5845-5849, 1995; Gilbert et al., *Nature Biotechnol.* 15:1280-1284, 1997), with or without the natural flanking sequences, and
20 can be separated by unrelated linker sequences if desired. The polytope is processed to generated individual epitopes which are recognized by the immune system for generation of immune responses.

Thus, for example, peptides derived from a polypeptide having an amino acid sequence encoded by one of the nucleic acid disclosed herein, and which are presented by
25 MHC molecules and recognized by CTL or T helper lymphocytes, can be combined with peptides from one or more other CT antigens (e.g. by preparation of hybrid nucleic acids or polypeptides) to form "polytopes". The two or more peptides (or nucleic acids encoding the peptides) can be selected from those described herein, or they can include one or more peptides of previously known CT antigens. Exemplary cancer associated peptide antigens
30 that can be administered to induce or enhance an immune response are derived from tumor associated genes and encoded proteins including MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10,

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 21 -

MAGE-A11, MAGE-A12, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, tyrosinase, brain glycogen phosphorylase, Melan-A, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2

5 (HOM-MEL-40), SSX-4, SSX-5, SCP-1 and CT-7. See, for example, PCT application publication no. WO96/10577. Other examples will be known to one of ordinary skill in the art and can be used in the invention in a like manner as those disclosed herein. Other examples of HLA class I and HLA class II binding peptides will be known to one of ordinary skill in the art. For example, see the following references: Coulie, *Stem Cells* 13:393-403,

10 1995; Traversari et al., *J. Exp. Med.* 176:1453-1457, 1992; Chaux et al., *J. Immunol.* 163:2928-2936, 1999; Fujie et al., *Int. J. Cancer* 80:169-172, 1999; Tanzarella et al., *Cancer Res.* 59:2668-2674, 1999; van der Bruggen et al., *Eur. J. Immunol.* 24:2134-2140, 1994; Chaux et al., *J. Exp. Med.* 189:767-778, 1999; Kawashima et al., *Hum. Immunol.* 59:1-14, 1998; Tahara et al., *Clin. Cancer Res.* 5:2236-2241, 1999; Gaugler et al., *J. Exp. Med.*

15 179:921-930, 1994; van der Bruggen et al., *Eur. J. Immunol.* 24:3038-3043, 1994; Tanaka et al., *Cancer Res.* 57:4465-4468, 1997; Oiso et al., *Int. J. Cancer* 81:387-394, 1999; Herman et al., *Immunogenetics* 43:377-383, 1996; Manici et al., *J. Exp. Med.* 189:871-876, 1999; Duffour et al., *Eur. J. Immunol.* 29:3329-3337, 1999; Zorn et al., *Eur. J. Immunol.* 29:602-607, 1999; Huang et al., *J. Immunol.* 162:6849-6854, 1999; Boël et al., *Immunity* 2:167-175,

20 1995; Van den Eynde et al., *J. Exp. Med.* 182:689-698, 1995; De Backer et al., *Cancer Res.* 59:3157-3165, 1999; Jäger et al., *J. Exp. Med.* 187:265-270, 1998; Wang et al., *J. Immunol.* 161:3596-3606, 1998; Aarnoudse et al., *Int. J. Cancer* 82:442-448, 1999; Guilloux et al., *J. Exp. Med.* 183:1173-1183, 1996; Lupetti et al., *J. Exp. Med.* 188:1005-1016, 1998; Wölfel et al., *Eur. J. Immunol.* 24:759-764, 1994; Skipper et al., *J. Exp. Med.* 183:527-534, 1996; Kang

25 et al., *J. Immunol.* 155:1343-1348, 1995; Morel et al., *Int. J. Cancer* 83:755-759, 1999; Brichard et al., *Eur. J. Immunol.* 26:224-230, 1996; Kittlesen et al., *J. Immunol.* 160:2099-2106, 1998; Kawakami et al., *J. Immunol.* 161:6985-6992, 1998; Topalian et al., *J. Exp. Med.* 183:1965-1971, 1996; Kobayashi et al., *Cancer Research* 58:296-301, 1998; Kawakami et al., *J. Immunol.* 154:3961-3968, 1995; Tsai et al., *J. Immunol.* 158:1796-1802, 1997; Cox et

30 al., *Science* 264:716-719, 1994; Kawakami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6458-6462, 1994; Skipper et al., *J. Immunol.* 157:5027-5033, 1996; Robbins et al., *J. Immunol.* 159:303-308, 1997; Castelli et al., *J. Immunol.* 162:1739-1748, 1999; Kawakami et al., *J. Exp. Med.*

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 22 -

- 180:347-352, 1994; Castelli et al., *J. Exp. Med.* 181:363-368, 1995; Schneider et al., *Int. J. Cancer* 75:451-458, 1998; Wang et al., *J. Exp. Med.* 183:1131-1140, 1996; Wang et al., *J. Exp. Med.* 184:2207-2216, 1996; Parkhurst et al., *Cancer Research* 58:4895-4901, 1998; Tsang et al., *J. Natl Cancer Inst* 87:982-990, 1995; Correale et al., *J Natl Cancer Inst* 89:293-300, 1997; Coulie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7976-7980, 1995; Wölfl et al., *Science* 269:1281-1284, 1995; Robbins et al., *J. Exp. Med.* 183:1185-1192, 1996; Brändle et al., *J. Exp. Med.* 183:2501-2508, 1996; ten Bosch et al., *Blood* 88:3522-3527, 1996; Mandruzzato et al., *J. Exp. Med.* 186:785-793, 1997; Guéguen et al., *J. Immunol.* 160:6188-6194, 1998; Gjertsen et al., *Int. J. Cancer* 72:784-790, 1997; Gaudin et al., *J. Immunol.* 162:1730-1738, 1999; Chiari et al., *Cancer Res.* 59:5785-5792, 1999; Hogan et al., *Cancer Res.* 58:5144-5150, 1998; Pieper et al., *J. Exp. Med.* 189:757-765, 1999; Wang et al., *Science* 284:1351-1354, 1999; Fisk et al., *J. Exp. Med.* 181:2109-2117, 1995; Brossart et al., *Cancer Res.* 58:732-736, 1998; Röpke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14704-14707, 1996; Ikeda et al., *Immunity* 6:199-208, 1997; Ronsin et al., *J. Immunol.* 163:483-490, 1999; Vonderheide et al., *Immunity* 10:673-679, 1999.

One of ordinary skill in the art can prepare polypeptides comprising one or more CT antigen peptides and one or more of the foregoing cancer associated peptides, or nucleic acids encoding such polypeptides, according to standard procedures of molecular biology.

- Thus polytopes are groups of two or more potentially immunogenic or immune response stimulating peptides which can be joined together in various arrangements (e.g. concatenated, overlapping). The polytope (or nucleic acid encoding the polytope) can be administered in a standard immunization protocol, e.g. to animals, to test the effectiveness of the polytope in stimulating, enhancing and/or provoking an immune response.

- The peptides can be joined together directly or via the use of flanking sequences to form polytopes, and the use of polytopes as vaccines is well known in the art (see, e.g., Thomson et al., *Proc. Acad. Natl. Acad. Sci USA* 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., *Nature Biotechnol.* 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., *J. Immunol.* 157(2):822-826, 1996; Tam et al., *J. Exp. Med.* 171(1):299-306, 1990). For example, Tam showed that polytopes consisting of both MHC class I and class II binding epitopes successfully generated antibody and protective immunity in a mouse model. Tam also demonstrated that polytopes comprising "strings" of epitopes are processed to yield individual epitopes which are presented by MHC molecules and recognized by CTLs. Thus polytopes containing various

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 23 -

numbers and combinations of epitopes can be prepared and tested for recognition by CTLs and for efficacy in increasing an immune response.

It is known that tumors express a set of tumor antigens, of which only certain subsets may be expressed in the tumor of any given patient. Polytopes can be prepared which
5 correspond to the different combination of epitopes representing the subset of tumor rejection antigens expressed in a particular patient. Polytopes also can be prepared to reflect a broader spectrum of tumor rejection antigens known to be expressed by a tumor type. Polytopes can be introduced to a patient in need of such treatment as polypeptide structures, or via the use of nucleic acid delivery systems known in the art (see, e.g., Allsopp et al., *Eur. J. Immunol.*
10 26(8):1951-1959, 1996). Adenovirus, pox viruses, Ty-virus like particles, adeno-associated virus, alphaviruses, plasmids, bacteria, etc. can be used in such delivery. One can test the polytope delivery systems in mouse models to determine efficacy of the delivery system. The systems also can be tested in human clinical trials.

In instances in which a human HLA class I molecule presents tumor rejection
15 antigens derived from CT antigens, the expression vector may also include a nucleic acid sequence coding for the HLA molecule that presents any particular tumor rejection antigen derived from these nucleic acids and polypeptides. Alternatively, the nucleic acid sequence coding for such a HLA molecule can be contained within a separate expression vector. In a situation where the vector contains both coding sequences, the single vector can be used to
20 transfect a cell which does not normally express either one. Where the coding sequences for a CT antigen precursor and the HLA molecule which presents it are contained on separate expression vectors, the expression vectors can be cotransfected. The CT antigen precursor coding sequence may be used alone, when, e.g. the host cell already expresses a HLA molecule which presents a CT antigen derived from precursor molecules. Of course, there is
25 no limit on the particular host cell which can be used. As the vectors which contain the two coding sequences may be used in any antigen-presenting cells if desired, and the gene for CT antigen precursor can be used in host cells which do not express a HLA molecule which presents a CT antigen. Further, cell-free transcription systems may be used in lieu of cells.

As mentioned above, the invention embraces antisense oligonucleotides that
30 selectively bind to a nucleic acid molecule encoding a CT antigen polypeptide, to reduce the expression of CT antigens. This is desirable in virtually any medical condition wherein a reduction of expression of CT antigens is desirable, e.g., in the treatment of cancer. This is

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 24 -

also useful for *in vitro* or *in vivo* testing of the effects of a reduction of expression of one or more CT antigens.

As used herein, the term "antisense oligonucleotide" or "antisense" describes an oligonucleotide that is an oligoribonucleotide, oligodeoxyribonucleotide, modified oligoribonucleotide, or modified oligodeoxyribonucleotide which hybridizes under physiological conditions to DNA comprising a particular gene or to an mRNA transcript of that gene and, thereby, inhibits the transcription of that gene and/or the translation of that mRNA. The antisense molecules are designed so as to interfere with transcription or translation of a target gene upon hybridization with the target gene or transcript. Those skilled in the art will recognize that the exact length of the antisense oligonucleotide and its degree of complementarity with its target will depend upon the specific target selected, including the sequence of the target and the particular bases which comprise that sequence. It is preferred that the antisense oligonucleotide be constructed and arranged so as to bind selectively with the target under physiological conditions, i.e., to hybridize substantially more to the target sequence than to any other sequence in the target cell under physiological conditions. Based upon the sequences of nucleic acids encoding CT antigens, or upon allelic or homologous genomic and/or cDNA sequences, one of skill in the art can easily choose and synthesize any of a number of appropriate antisense molecules for use in accordance with the present invention.

In order to be sufficiently selective and potent for inhibition, such antisense oligonucleotides should comprise at least 10 and, more preferably, at least 15 consecutive bases which are complementary to the target, although in certain cases modified oligonucleotides as short as 7 bases in length have been used successfully as antisense oligonucleotides (Wagner et al., *Nature Biotechnol.* 14:840-844, 1996). Most preferably, the antisense oligonucleotides comprise a complementary sequence of 20-30 bases.

Although oligonucleotides may be chosen which are antisense to any region of the gene or mRNA transcripts, in preferred embodiments the antisense oligonucleotides correspond to N-terminal or 5' upstream sites such as translation initiation, transcription initiation or promoter sites. In addition, 3'-untranslated regions may be targeted. Targeting to mRNA splicing sites has also been used in the art but may be less preferred if alternative mRNA splicing occurs. In addition, the antisense is targeted, preferably, to sites in which mRNA secondary structure is not expected (see, e.g., Sainio et al., *Cell Mol. Neurobiol.*

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 25 -

14(5):439-457, 1994) and at which proteins are not expected to bind. Suitable antisense molecules can be identified by a "gene walk" experiment in which overlapping oligonucleotides corresponding to the CT antigen nucleic acid are synthesized and tested for the ability to inhibit expression, cause the degradation of sense transcripts, etc. Finally, although the listed sequences are cDNA sequences, one of ordinary skill in the art may easily derive the genomic DNA corresponding to the cDNA of a CT antigen. Thus, the present invention also provides for antisense oligonucleotides which are complementary to the genomic DNA corresponding to nucleic acids encoding CT antigens. Similarly, antisense to allelic or homologous cDNAs and genomic DNAs are enabled without undue experimentation.

In one set of embodiments, the antisense oligonucleotides of the invention may be composed of "natural" deoxyribonucleotides, ribonucleotides, or any combination thereof. That is, the 5' end of one native nucleotide and the 3' end of another native nucleotide may be covalently linked, as in natural systems, via a phosphodiester internucleoside linkage. These oligonucleotides may be prepared by art recognized methods which may be carried out manually or by an automated synthesizer. They also may be produced recombinantly by vectors.

In preferred embodiments, however, the antisense oligonucleotides of the invention also may include "modified" oligonucleotides. That is, the oligonucleotides may be modified in a number of ways which do not prevent them from hybridizing to their target but which enhance their stability or targeting or which otherwise enhance their therapeutic effectiveness.

The term "modified oligonucleotide" as used herein describes an oligonucleotide in which (1) at least two of its nucleotides are covalently linked via a synthetic internucleoside linkage (i.e., a linkage other than a phosphodiester linkage between the 5' end of one nucleotide and the 3' end of another nucleotide) and/or (2) a chemical group not normally associated with nucleic acids has been covalently attached to the oligonucleotide. Preferred synthetic internucleoside linkages are phosphorothioates, alkylphosphonates, phosphorodithioates, phosphate esters, alkylphosphonothioates, phosphoramidates, carbamates, carbonates, phosphate triesters, acetamidates, carboxymethyl esters and peptides.

The term "modified oligonucleotide" also encompasses oligonucleotides with a covalently modified base and/or sugar. For example, modified oligonucleotides include

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 26 -

oligonucleotides having backbone sugars which are covalently attached to low molecular weight organic groups other than a hydroxyl group at the 3' position and other than a phosphate group at the 5' position. Thus modified oligonucleotides may include a 2'-O-alkylated ribose group. In addition, modified oligonucleotides may include sugars such as arabinose instead of ribose. Base analogs such as C-5 propyne modified bases also can be included (*Nature Biotechnol.* 14:840-844, 1996). The present invention, thus, contemplates pharmaceutical preparations containing modified antisense molecules that are complementary to and hybridizable with, under physiological conditions, nucleic acids encoding the CT antigen polypeptides, together with pharmaceutically acceptable carriers.

Antisense oligonucleotides may be administered as part of a pharmaceutical composition. Such a pharmaceutical composition may include the antisense oligonucleotides in combination with any standard physiologically and/or pharmaceutically acceptable carriers which are known in the art. The compositions should be sterile and contain a therapeutically effective amount of the antisense oligonucleotides in a unit of weight or volume suitable for administration to a patient. The term "pharmaceutically acceptable" means a non-toxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredients. The term "physiologically acceptable" refers to a non-toxic material that is compatible with a biological system such as a cell, cell culture, tissue, or organism. The characteristics of the carrier will depend on the route of administration. Physiologically and pharmaceutically acceptable carriers include diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials which are well known in the art, as further described below.

As used herein, a "vector" may be any of a number of nucleic acids into which a desired sequence may be inserted by restriction and ligation for transport between different genetic environments or for expression in a host cell. Vectors are typically composed of DNA although RNA vectors are also available. Vectors include, but are not limited to, plasmids, phagemids and virus genomes. A cloning vector is one which is able to replicate autonomously or integrated in the genome in a host cell, and which is further characterized by one or more endonuclease restriction sites at which the vector may be cut in a determinable fashion and into which a desired DNA sequence may be ligated such that the new recombinant vector retains its ability to replicate in the host cell. In the case of plasmids, replication of the desired sequence may occur many times as the plasmid increases in copy number within the host bacterium or just a single time per host before the host reproduces by

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 27 -

mitosis. In the case of phage, replication may occur actively during a lytic phase or passively during a lysogenic phase. An expression vector is one into which a desired DNA sequence may be inserted by restriction and ligation such that it is operably joined to regulatory sequences and may be expressed as an RNA transcript. Vectors may further contain one or
5 more marker sequences suitable for use in the identification of cells which have or have not been transformed or transfected with the vector. Markers include, for example, genes encoding proteins which increase or decrease either resistance or sensitivity to antibiotics or other compounds, genes which encode enzymes whose activities are detectable by standard assays known in the art (e.g., β -galactosidase, luciferase or alkaline phosphatase), and genes
10 which visibly affect the phenotype of transformed or transfected cells, hosts, colonies or plaques (e.g., green fluorescent protein). Preferred vectors are those capable of autonomous replication and expression of the structural gene products present in the DNA segments to which they are operably joined.

As used herein, a coding sequence and regulatory sequences are said to be "operably"
15 joined when they are covalently linked in such a way as to place the expression or transcription of the coding sequence under the influence or control of the regulatory sequences. If it is desired that the coding sequences be translated into a functional protein, two DNA sequences are said to be operably joined if induction of a promoter in the 5' regulatory sequences results in the transcription of the coding sequence and if the nature of
20 the linkage between the two DNA sequences does not (1) result in the introduction of a frame-shift mutation, (2) interfere with the ability of the promoter region to direct the transcription of the coding sequences, or (3) interfere with the ability of the corresponding RNA transcript to be translated into a protein. Thus, a promoter region would be operably joined to a coding sequence if the promoter region were capable of effecting transcription of
25 that DNA sequence such that the resulting transcript might be translated into the desired protein or polypeptide.

The precise nature of the regulatory sequences needed for gene expression may vary between species or cell types, but shall in general include, as necessary, 5' non-transcribed and 5' non-translated sequences involved with the initiation of transcription and translation
30 respectively, such as a TATA box, capping sequence, CAAT sequence, and the like. Especially, such 5' non-transcribed regulatory sequences will include a promoter region which includes a promoter sequence for transcriptional control of the operably joined gene.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 28 -

Regulatory sequences may also include enhancer sequences or upstream activator sequences as desired. The vectors of the invention may optionally include 5' leader or signal sequences. The choice and design of an appropriate vector is within the ability and discretion of one of ordinary skill in the art.

5 Expression vectors containing all the necessary elements for expression are commercially available and known to those skilled in the art. See, e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Cells are genetically engineered by the introduction into the cells of heterologous DNA (RNA) encoding a CT antigen polypeptide or fragment or variant thereof.
10 That heterologous DNA (RNA) is placed under operable control of transcriptional elements to permit the expression of the heterologous DNA in the host cell.

Preferred systems for mRNA expression in mammalian cells are those such as pRc/CMV or pcDNA3.1 (available from Invitrogen, Carlsbad, CA) that contain a selectable marker such as a gene that confers G418 resistance (which facilitates the selection of stably
15 transfected cell lines) and the human cytomegalovirus (CMV) enhancer-promoter sequences. Additionally, suitable for expression in primate or canine cell lines is the pCEP4 vector (Invitrogen), which contains an Epstein Barr Virus (EBV) origin of replication, facilitating the maintenance of plasmid as a multicopy extrachromosomal element. Another expression vector is the pEF-BOS plasmid containing the promoter of polypeptide Elongation Factor 1 α ,
20 which stimulates efficiently transcription *in vitro*. The plasmid is described by Mishizuma and Nagata (*Nuc. Acids Res.* 18:5322, 1990), and its use in transfection experiments is disclosed by, for example, Demoulin (*Mol. Cell. Biol.* 16:4710-4716, 1996). Still another preferred expression vector is an adenovirus, described by Stratford-Perricaudet, which is defective for E1 and E3 proteins (*J. Clin. Invest.* 90:626-630, 1992). The use of the
25 adenovirus as an Adeno.P1A recombinant for the expression of an antigen is disclosed by Warnier et al., in intradermal injection in mice for immunization against P1A (*Int. J. Cancer*, 67:303-310, 1996).

The invention also embraces so-called expression kits, which allow the artisan to prepare a desired expression vector or vectors. Such expression kits include at least separate
30 portions of a vector and one or more of the previously discussed CT antigen nucleic acid molecules. Other components may be added, as desired, as long as the previously mentioned nucleic acid molecules, which are required, are included. The invention also includes kits for

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 29 -

amplification of a CT antigen nucleic acid, including at least one pair of amplification primers which hybridize to a CT antigen nucleic acid. The primers preferably are 12-32 nucleotides in length and are non-overlapping to prevent formation of "primer-dimers". One of the primers will hybridize to one strand of the CT antigen nucleic acid and the second primer will hybridize to the complementary strand of the CT antigen nucleic acid, in an arrangement which permits amplification of the CT antigen nucleic acid. Selection of appropriate primer pairs is standard in the art. For example, the selection can be made with assistance of a computer program designed for such a purpose, optionally followed by testing the primers for amplification specificity and efficiency.

The invention also permits the construction of CT antigen gene "knock-outs" and "knock-ins" in cells and in animals, providing materials for studying certain aspects of cancer and immune system responses to cancer.

The invention also provides isolated polypeptides (including whole proteins and partial proteins) encoded by the foregoing CT antigen nucleic acids. Such polypeptides are useful, for example, alone or as fusion proteins to generate antibodies, as components of an immunoassay or diagnostic assay or as therapeutics. CT antigen polypeptides can be isolated from biological samples including tissue or cell homogenates, and can also be expressed recombinantly in a variety of prokaryotic and eukaryotic expression systems by constructing an expression vector appropriate to the expression system, introducing the expression vector into the expression system, and isolating the recombinantly expressed protein. Short polypeptides, including antigenic peptides (such as are presented by MHC molecules on the surface of a cell for immune recognition) also can be synthesized chemically using well-established methods of peptide synthesis.

A unique fragment of a CT antigen polypeptide, in general, has the features and characteristics of unique fragments as discussed above in connection with nucleic acids. As will be recognized by those skilled in the art, the size of the unique fragment will depend upon factors such as whether the fragment constitutes a portion of a conserved protein domain. Thus, some regions of CT antigens will require longer segments to be unique while others will require only short segments, typically between 5 and 12 amino acids (e.g. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 or 12 or more amino acids including each integer up to the full length).

Fragments of a CT antigen polypeptide preferably are those fragments which retain a distinct functional capability of the polypeptide. Functional capabilities which can be

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 30 -

retained in a fragment of a polypeptide include interaction with antibodies, interaction with other polypeptides or fragments thereof, selective binding of nucleic acids or proteins, and enzymatic activity. One important activity is the ability to act as a signature for identifying the polypeptide. Another is the ability to complex with HLA and to provoke in a human an
5 immune response. Those skilled in the art are well versed in methods for selecting unique amino acid sequences, typically on the basis of the ability of the fragment to selectively distinguish the sequence of interest from non-family members. A comparison of the sequence of the fragment to those on known databases typically is all that is necessary.

The invention embraces variants of the CT antigen polypeptides described above. As
10 used herein, a "variant" of a CT antigen polypeptide is a polypeptide which contains one or more modifications to the primary amino acid sequence of a CT antigen polypeptide. Modifications which create a CT antigen variant can be made to a CT antigen polypeptide 1) to reduce or eliminate an activity of a CT antigen polypeptide; 2) to enhance a property of a CT antigen polypeptide, such as protein stability in an expression system or the stability of
15 protein-protein binding; 3) to provide a novel activity or property to a CT antigen polypeptide, such as addition of an antigenic epitope or addition of a detectable moiety; or 4) to provide equivalent or better binding to an HLA molecule. Modifications to a CT antigen polypeptide are typically made to the nucleic acid which encodes the CT antigen polypeptide, and can include deletions, point mutations, truncations, amino acid substitutions and
20 additions of amino acids or non-amino acid moieties. Alternatively, modifications can be made directly to the polypeptide, such as by cleavage, addition of a linker molecule, addition of a detectable moiety, such as biotin, addition of a fatty acid, and the like. Modifications also embrace fusion proteins comprising all or part of the CT antigen amino acid sequence. One of skill in the art will be familiar with methods for predicting the effect on protein
25 conformation of a change in protein sequence, and can thus "design" a variant CT antigen polypeptide according to known methods. One example of such a method is described by Dahiyat and Mayo in *Science* 278:82-87, 1997, whereby proteins can be designed *de novo*. The method can be applied to a known protein to vary only a portion of the polypeptide sequence. By applying the computational methods of Dahiyat and Mayo, specific variants of
30 a CT antigen polypeptide can be proposed and tested to determine whether the variant retains a desired conformation.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 31 -

In general, variants include CT antigen polypeptides which are modified specifically to alter a feature of the polypeptide unrelated to its desired physiological activity. For example, cysteine residues can be substituted or deleted to prevent unwanted disulfide linkages. Similarly, certain amino acids can be changed to enhance expression of a CT antigen polypeptide by eliminating proteolysis by proteases in an expression system (e.g., dibasic amino acid residues in yeast expression systems in which KEX2 protease activity is present).

Mutations of a nucleic acid which encode a CT antigen polypeptide preferably preserve the amino acid reading frame of the coding sequence, and preferably do not create regions in the nucleic acid which are likely to hybridize to form secondary structures, such as hairpins or loops, which can be deleterious to expression of the variant polypeptide.

Mutations can be made by selecting an amino acid substitution, or by random mutagenesis of a selected site in a nucleic acid which encodes the polypeptide. Variant polypeptides are then expressed and tested for one or more activities to determine which mutation provides a variant polypeptide with the desired properties. Further mutations can be made to variants (or to non-variant CT antigen polypeptides) which are silent as to the amino acid sequence of the polypeptide, but which provide preferred codons for translation in a particular host. The preferred codons for translation of a nucleic acid in, e.g., *E. coli*, are well known to those of ordinary skill in the art. Still other mutations can be made to the noncoding sequences of a CT antigen gene or cDNA clone to enhance expression of the polypeptide. The activity of variants of CT antigen polypeptides can be tested by cloning the gene encoding the variant CT antigen polypeptide into a bacterial or mammalian expression vector, introducing the vector into an appropriate host cell, expressing the variant CT antigen polypeptide, and testing for a functional capability of the CT antigen polypeptides as disclosed herein. For example, the variant CT antigen polypeptide can be tested for binding to antibodies or T cells. Preferred variants are those that compete for binding with the original polypeptide for binding to antibodies or T cells. Preparation of other variant polypeptides may favor testing of other activities, as will be known to one of ordinary skill in the art.

The skilled artisan will also realize that conservative amino acid substitutions may be made in CT antigen polypeptides to provide functionally equivalent variants of the foregoing polypeptides, i.e., the variants retain the functional capabilities of the CT antigen

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 32 -

polypeptides. As used herein, a "conservative amino acid substitution" refers to an amino acid substitution which does not alter the relative charge or size characteristics of the protein in which the amino acid substitution is made. Variants can be prepared according to methods for altering polypeptide sequence known to one of ordinary skill in the art such as are found in references which compile such methods, e.g. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, or *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Exemplary functionally equivalent variants of the CT antigen polypeptides include conservative amino acid substitutions of in the amino acid sequences of proteins disclosed herein. Conservative substitutions of amino acids include substitutions made amongst amino acids within the following groups: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; and (g) E, D.

For example, upon determining that a peptide derived from a CT antigen polypeptide is presented by an MHC molecule and recognized by CTLs (e.g., as described in the Examples), one can make conservative amino acid substitutions to the amino acid sequence of the peptide, particularly at residues which are thought not to be direct contact points with the MHC molecule, i.e., the anchor residues that confer MHC binding. One of ordinary skill in the art will know these residues and will preferentially substitute other amino acid residues in the peptides in making variants. It is possible also to use other members of the consensus amino acids for a particular anchor residue. For example, consensus anchor residues for HLA-B35 are P in position 2 and Y, F, M, L or I in position 9. Therefore, if position 9 of a peptide was tyrosine (Y), one could substitute phenylalanine (F), methionine (M), leucine (L) or isoleucine (I) and maintain a consensus amino acid at the anchor residue positions of the peptide.

In general, it is preferred that fewer than all of the amino acids are changed when preparing variant polypeptides. Where particular amino acid residues are known to confer function, such amino acids will not be replaced, or alternatively, will be replaced by conservative amino acid substitutions. Preferably, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and so on up to one fewer than the length of the peptide are changed when preparing variant polypeptides. It is generally preferred that the fewest number of substitutions is made. Thus, one method for generating variant polypeptides is to substitute all other amino acids for a particular single

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 33 -

amino acid, then assay activity of the variant, then repeat the process with one or more of the polypeptides having the best activity.

As another example, methods for identifying functional variants of HLA class II binding peptides are provided in a published PCT application of Strominger and Wucherpennig (PCT/US96/03182). Peptides bearing one or more amino acid substitutions also can be tested for concordance with known HLA/MHC motifs prior to synthesis using, e.g. the computer program described by D'Amaro and Drijfhout (D'Amaro et al., *Human Immunol.* 43:13-18, 1995; Drijfhout et al., *Human Immunol.* 43:1-12, 1995). The substituted peptides can then be tested for binding to the MHC molecule and recognition by CTLs when bound to MHC. These variants can be tested for improved stability and are useful, *inter alia*, in vaccine compositions.

Conservative amino-acid substitutions in the amino acid sequence of CT antigen polypeptides to produce functionally equivalent variants of CT antigen polypeptides typically are made by alteration of a nucleic acid encoding a CT antigen polypeptide. Such substitutions can be made by a variety of methods known to one of ordinary skill in the art. For example, amino acid substitutions may be made by PCR-directed mutation, site-directed mutagenesis according to the method of Kunkel (Kunkel, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 488-492, 1985), or by chemical synthesis of a gene encoding a CT antigen polypeptide. Where amino acid substitutions are made to a small unique fragment of a CT antigen polypeptide, such as an antigenic epitope recognized by autologous or allogeneic sera or cytolytic T lymphocytes, the substitutions can be made by directly synthesizing the peptide. The activity of functionally equivalent fragments of CT antigen polypeptides can be tested by cloning the gene encoding the altered CT antigen polypeptide into a bacterial or mammalian expression vector, introducing the vector into an appropriate host cell, expressing the altered CT antigen polypeptide, and testing for a functional capability of the CT antigen polypeptides as disclosed herein. Peptides which are chemically synthesized can be tested directly for function, e.g., for binding to antisera recognizing associated antigens.

The invention also provides, in certain embodiments, "dominant negative" polypeptides derived from CT antigen polypeptides. A dominant negative polypeptide is an inactive variant of a protein, which, by interacting with the cellular machinery, displaces an active protein from its interaction with the cellular machinery or competes with the active protein, thereby reducing the effect of the active protein. For example, a dominant negative

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 34 -

receptor which binds a ligand but does not transmit a signal in response to binding of the ligand can reduce the biological effect of expression of the ligand. Likewise, a dominant negative catalytically-inactive kinase which interacts normally with target proteins but does not phosphorylate the target proteins can reduce phosphorylation of the target proteins in response to a cellular signal. Similarly, a dominant negative transcription factor which binds to a promoter site in the control region of a gene but does not increase gene transcription can reduce the effect of a normal transcription factor by occupying promoter binding sites without increasing transcription.

The end result of the expression of a dominant negative polypeptide in a cell is a reduction in function of active proteins. One of ordinary skill in the art can assess the potential for a dominant negative variant of a protein, and using standard mutagenesis techniques to create one or more dominant negative variant polypeptides. For example, given the teachings contained herein of CT antigens, especially those which are similar to known proteins which have known activities, one of ordinary skill in the art can modify the sequence of the CT antigens by site-specific mutagenesis, scanning mutagenesis, partial gene deletion or truncation, and the like. See, e.g., U.S. Patent No. 5,580,723 and Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. The skilled artisan then can test the population of mutagenized polypeptides for diminution in a selected and/or for retention of such an activity. Other similar methods for creating and testing dominant negative variants of a protein will be apparent to one of ordinary skill in the art.

The invention as described herein has a number of uses, some of which are described elsewhere herein. First, the invention permits isolation of the CT antigen protein molecules. A variety of methodologies well-known to the skilled practitioner can be utilized to obtain isolated CT antigen molecules. The polypeptide may be purified from cells which naturally produce the polypeptide by chromatographic means or immunological recognition. Alternatively, an expression vector may be introduced into cells to cause production of the polypeptide. In another method, mRNA transcripts may be microinjected or otherwise introduced into cells to cause production of the encoded polypeptide. Translation of mRNA in cell-free extracts such as the reticulocyte lysate system also may be used to produce polypeptide. Those skilled in the art also can readily follow known methods for isolating CT antigen polypeptides. These include, but are not limited to, immunochromatography, HPLC,

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 35 -

size-exclusion chromatography, ion-exchange chromatography and immune-affinity chromatography.

The invention also makes it possible isolate proteins which bind to CT antigens as disclosed herein, including antibodies and cellular binding partners of the CT antigens.

5 Additional uses are described further herein.

The isolation and identification of CT antigen genes also makes it possible for the artisan to diagnose a disorder characterized by expression of CT antigens. These methods involve determining expression of one or more CT antigen nucleic acids, and/or encoded CT antigen polypeptides and/or peptides derived therefrom. In the former situation, such
10 determinations can be carried out via any standard nucleic acid determination assay, including the polymerase chain reaction, or assaying with labeled hybridization probes. In the latter two situations, such determinations can be carried out by immunoassays including, for example, ELISAs for the CT antigens, immunohistochemistry on tissue samples, and screening patient antisera for recognition of the polypeptide.

15 The invention also includes methods to monitor the onset, progression, or regression of cancer in a subject by, for example, obtaining cell or tissue samples at sequential times from a subject and assaying such samples for the presence and/or or level of expression of the cancer-associated polypeptides of the invention. A subject may be suspected of having cancer or may be believed not to have cancer and the sample can serve as a baseline level for
20 comparison with subsequent cell or tissue samples from the subject.

Onset of a condition is the initiation of the physiological changes or characteristics associated with the condition in a subject. Such changes may be evidenced by physiological symptoms, or may be clinically asymptomatic. For example, the onset of cancer may be followed by a period during which there may be cancer-associated physiological
25 characteristics in the subject, even though clinical symptoms may not be evident at that time. The progression of a condition follows onset and is the advancement of the physiological characteristics of the condition, which may or may not be marked by an increase in clinical symptoms. In contrast, the regression of a condition is a decrease in physiological characteristics of the condition, perhaps with a parallel reduction in symptoms, and may
30 result from a treatment or may be a natural reversal in the condition.

The presence of a cancer-associated nucleic acid or polypeptide in a cell or tissue sample from a subject that is determined to be at a level above the baseline level for that

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 36 -

nucleic acid or polypeptide, is a marker for cancer in the subject. For example, a marker for cancer may be the specific binding of a cancer-associated polypeptide with an antibody. The onset of a cancer condition may be indicated by the appearance of such a marker(s) in a subject's samples where there was no such marker(s) determined previously. For example, if
5 marker(s) for cancer are determined not to be present in a first sample from a subject, the determination that cancer marker(s) are present in a second or subsequent sample from the subject is an indication of the onset of cancer in the subject.

Progression and regression of a cancer condition are indicated by the increase or decrease, respectively, of marker(s) in a subject's samples over time. For example, if
10 marker(s) for cancer are determined to be present in a first sample from a subject and additional marker(s) or more of the initial marker(s) for cancer are determined to be present in a second or subsequent sample from the subject, it indicates the progression of cancer. Regression of cancer is indicated by finding that marker(s) determined to be present in a sample from a subject are not determined to be found, or found at lower amounts in a second
15 or subsequent sample from the subject.

The progression and regression of a cancer condition may also be indicated based on characteristics of the expression of the cancer-associated polypeptides determined in the subject. For example, some cancer-associated polypeptides may be abnormally expressed at specific stages of cancer (e.g. early-stage cancer-associated polypeptides; mid-stage cancer-associated polypeptides; and late-stage cancer-associated polypeptides). Another example,
20 although not intended to be limiting, is that cancer-associated polypeptides may be differentially expressed in primary tumors versus metastases, thereby allowing the stage and/or diagnostic level of the disease to be established, based on the identification of selected cancer-associated polypeptides in a subject sample.

Different types of cancer in a single tissue type may express different cancer-associated polypeptides and the encoding nucleic acid molecules thereof, or may have different spatial or temporal expression patterns. Such variations may allow cancer-specific diagnosis and subsequent treatment tailored to the patient's specific condition. These differences in expression, can enable a physician to diagnose the cancer on the basis of
25 differential expression of the cancer-associated polypeptides and the encoding nucleic acid molecules of the invention, or immune responses thereto (e.g., serum antibodies) and permits specific treatments to be selected and administered on the basis of the differential expression.
30

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 37 -

The isolation and identification of cancer-associated nucleic acids and polypeptides also permits the artisan to diagnose a disorder characterized by expression of cancer-associated polypeptides, and characterized preferably by an immune response against the cancer-associated polypeptides. As shown herein, the expression in of cancer-associated polypeptides in a subject with cancer can result in a measurable immune response to the cancer-associated polypeptides in the subject. The evaluation of this immune response is useful in the diagnosis of cancer in a subject expressing one or more of the cancer-associated polypeptides of the invention.

The methods of the invention related to cancer-associated polypeptide immune responses involve determining the immune response (antibody or cellular) against one or more cancer-associated polypeptides. The immune response can be assayed by any of the various immunoassay methodologies known to one of ordinary skill in the art. For example, the antigenic cancer-associated polypeptides can be used as a target to capture antibodies from a sample, such as a blood sample drawn from a patient, in an immunoassay, such as an ELISA assay. Thus, the invention involves in some aspects diagnosing or monitoring cancer in a subject by determining the presence of an immune response to one or more of the cancer-associated polypeptides described herein. In preferred embodiments, this determination is performed by assaying a bodily fluid obtained from the subject, for example blood or lymph node fluid, for the presence of antibodies against one or more cancer-associated polypeptides or the nucleic acid molecules that encode the cancer-associated polypeptides, or for the presence of antibodies against one of the cancer-associated polypeptides as described herein.

Measurement of the immune response against one or more of the cancer-associated polypeptides described herein in a subject over time by sequential determinations is useful to monitor the onset, progression, or regression of cancer including that resulting from a course of treatment. For example, a sample such as blood or lymph node fluid may be obtained from a subject and contacted with a cancer-associated polypeptide of the invention, and binding between an agent in the sample (e.g., an antibody) with one of the cancer-associated polypeptides, is an indication of an immune response to the cancer-associated polypeptide. At a second, subsequent time, another sample may be obtained from the subject and similarly tested. The results of the first and second tests (and/or subsequent tests) can be compared as a measure of the onset, regression, or progression of cancer, or, if cancer treatment was

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 38 -

undertaken during the interval between obtaining the samples, the effectiveness of the treatment may be evaluated by comparing the results of the two tests.

The stage of cancer in a subject may be determined based on variation in a subject's immune response to cancer-associated polypeptides of the invention. Variability in the immune response to the polypeptides may be used to indicate the stage of cancer in a subject. For example, some cancer-associated polypeptides may trigger an immune response at different stages of the cancer than that triggered by other cancer-associated polypeptides. The cancer-specific diagnoses described herein above may also be based on the variations in immune responses to the different cancer-associated polypeptides.

The invention includes kits for assaying the presence of cancer-associated polypeptides and/or antibodies that specifically bind to cancer-associated polypeptides. An example of a kit may include an antibody or antigen-binding fragment thereof, that binds specifically to a cancer-associated polypeptide. The antibody or antigen-binding fragment thereof, may be applied to a tissue or cell sample from a patient with cancer, suspected of having cancer, or believed to be free of cancer and the sample then processed to assess whether specific binding occurs between the antibody and a polypeptide or other component of the sample.

Another example of such a kit may include the above-mentioned polypeptides bound to a substrate, for example a dipstick, which is dipped into a blood or body fluid sample of a subject. The surface of the substrate may then be processed using procedures well known to those of skill in the art, to assess whether specific binding occurred between the polypeptides and agents (e.g. antibodies) in the subject's sample. For example, procedures may include, but are not limited to, contact with a secondary antibody, or other method that indicates the presence of specific binding.

In addition, the antibody or antigen-binding fragment thereof, may be applied to a body fluid sample, such as blood or lymph node fluid, from a subject, either suspected of having cancer, diagnosed with cancer, or believed to be free of cancer. As will be understood by one of skill in the art, such binding assays may also be performed with a sample or object contacted with an antibody and/or cancer-associated polypeptide that is in solution, for example in a 96-well plate or applied directly to an object surface.

Another example of a kit of the invention, is a kit that provides components necessary to determine the level of expression of one or more cancer-associated nucleic acid molecules

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 39 -

of the invention. Such components may include primers useful for amplification of one or more cancer-associated nucleic acid molecules and/or other chemicals for PCR amplification.

Another example of a kit of the invention, is a kit that provides components necessary to determine the level of expression of one or more cancer-associated nucleic acid molecules
5 of the invention using a method of hybridization.

The foregoing kits can include instructions or other printed material on how to use the various components of the kits for diagnostic purposes.

The invention further includes nucleic acid or protein microarrays with CT antigens or nucleic acids encoding such polypeptides. In this aspect of the invention, standard techniques
10 of microarray technology are utilized to assess expression of the CT antigens and/or identify biological constituents that bind such polypeptides. The constituents of biological samples include antibodies, lymphocytes (particularly T lymphocytes), and the like. Protein microarray technology, which is also known by other names including: protein chip technology and solid-phase protein array technology, is well known to those of ordinary skill
15 in the art and is based on, but not limited to, obtaining an array of identified peptides or proteins on a fixed substrate, binding target molecules or biological constituents to the peptides, and evaluating such binding. See, e.g., G. MacBeath and S.L. Schreiber, "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination," *Science* 289(5485):1760-1763, 2000. Nucleic acid arrays, particularly arrays that bind CT antigens,
20 also can be used for diagnostic applications, such as for identifying subjects that have a condition characterized by CT antigen expression.

Microarray substrates include but are not limited to glass, silica, aluminosilicates, borosilicates, metal oxides such as alumina and nickel oxide, various clays, nitrocellulose, or nylon. The microarray substrates may be coated with a compound to enhance synthesis of a
25 probe (peptide or nucleic acid) on the substrate. Coupling agents or groups on the substrate can be used to covalently link the first nucleotide or amino acid to the substrate. A variety of coupling agents or groups are known to those of skill in the art. Peptide or nucleic acid probes thus can be synthesized directly on the substrate in a predetermined grid. Alternatively, peptide or nucleic acid probes can be spotted on the substrate, and in such
30 cases the substrate may be coated with a compound to enhance binding of the probe to the substrate. In these embodiments, presynthesized probes are applied to the substrate in a precise, predetermined volume and grid pattern, preferably utilizing a computer-controlled

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 40 -

robot to apply probe to the substrate in a contact-printing manner or in a non-contact manner such as ink jet or piezo-electric delivery. Probes may be covalently linked to the substrate.

Targets are peptides or proteins and may be natural or synthetic. The tissue may be obtained from a subject or may be grown in culture (e.g. from a cell line).

5 In some embodiments of the invention one or more control peptide or protein molecules are attached to the substrate. Preferably, control peptide or protein molecules allow determination of factors such as peptide or protein quality and binding characteristics, reagent quality and effectiveness, hybridization success, and analysis thresholds and success.

10 In other embodiments, one or more control peptide or nucleic acid molecules are attached to the substrate. Preferably, control nucleic acid molecules allow determination of factors such as binding characteristics, reagent quality and effectiveness, hybridization success, and analysis thresholds and success.

Nucleic acid microarray technology, which is also known by other names including: DNA chip technology, gene chip technology, and solid-phase nucleic acid array technology, 15 is well known to those of ordinary skill in the art and is based on, but not limited to, obtaining an array of identified nucleic acid probes on a fixed substrate, labeling target molecules with reporter molecules (e.g., radioactive, chemiluminescent, or fluorescent tags such as fluorescein, Cy3-dUTP, or Cy5-dUTP), hybridizing target nucleic acids to the probes, and evaluating target-probe hybridization. A probe with a nucleic acid sequence that perfectly 20 matches the target sequence will, in general, result in detection of a stronger reporter-molecule signal than will probes with less perfect matches. Many components and techniques utilized in nucleic acid microarray technology are presented in *The Chipping Forecast*, Nature Genetics, Vol.21, Jan 1999, the entire contents of which is incorporated by reference herein.

25 According to the present invention, nucleic acid microarray substrates may include but are not limited to glass, silica, aluminosilicates, borosilicates, metal oxides such as alumina and nickel oxide, various clays, nitrocellulose, or nylon. In all embodiments a glass substrate is preferred. According to the invention, probes are selected from the group of nucleic acids including, but not limited to: DNA, genomic DNA, cDNA, and 30 oligonucleotides; and may be natural or synthetic. Oligonucleotide probes preferably are 20 to 25-mer oligonucleotides and DNA/cDNA probes preferably are 500 to 5000 bases in length, although other lengths may be used. Appropriate probe length may be determined by

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 41 -

one of ordinary skill in the art by following art-known procedures. In one embodiment, preferred probes are sets of two or more of the CT antigen nucleic acid molecules set forth herein. Probes may be purified to remove contaminants using standard methods known to those of ordinary skill in the art such as gel filtration or precipitation.

- 5 In one embodiment, the microarray substrate may be coated with a compound to enhance synthesis of the probe on the substrate. Such compounds include, but are not limited to, oligoethylene glycols. In another embodiment, coupling agents or groups on the substrate can be used to covalently link the first nucleotide or oligonucleotide to the substrate. These agents or groups may include, for example, amino, hydroxy, bromo, and carboxy groups.
- 10 These reactive groups are preferably attached to the substrate through a hydrocarbyl radical such as an alkylene or phenylene divalent radical, one valence position occupied by the chain bonding and the remaining attached to the reactive groups. These hydrocarbyl groups may contain up to about ten carbon atoms, preferably up to about six carbon atoms. Alkylene radicals are usually preferred containing two to four carbon atoms in the principal chain.
- 15 These and additional details of the process are disclosed, for example, in U.S. Patent 4,458,066, which is incorporated by reference in its entirety.

- In one embodiment, probes are synthesized directly on the substrate in a predetermined grid pattern using methods such as light-directed chemical synthesis, photochemical deprotection, or delivery of nucleotide precursors to the substrate and
- 20 subsequent probe production.

- In another embodiment, the substrate may be coated with a compound to enhance binding of the probe to the substrate. Such compounds include, but are not limited to: polylysine, amino silanes, amino-reactive silanes (Chipping Forecast, 1999) or chromium. In this embodiment, presynthesized probes are applied to the substrate in a precise,
- 25 predetermined volume and grid pattern, utilizing a computer-controlled robot to apply probe to the substrate in a contact-printing manner or in a non-contact manner such as ink jet or piezo-electric delivery. Probes may be covalently linked to the substrate with methods that include, but are not limited to, UV-irradiation. In another embodiment probes are linked to the substrate with heat.

- 30 Targets for microarrays are nucleic acids selected from the group, including but not limited to: DNA, genomic DNA, cDNA, RNA, mRNA and may be natural or synthetic. In

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 42 -

all embodiments, nucleic acid target molecules from human tissue are preferred. The tissue may be obtained from a subject or may be grown in culture (e.g. from a cell line).

In embodiments of the invention one or more control nucleic acid molecules are attached to the substrate. Preferably, control nucleic acid molecules allow determination of factors such as nucleic acid quality and binding characteristics, reagent quality and effectiveness, hybridization success, and analysis thresholds and success. Control nucleic acids may include but are not limited to expression products of genes such as housekeeping genes or fragments thereof.

In some embodiments, one or more control peptide or nucleic acid molecules are attached to the substrate. Preferably, control nucleic acid molecules allow determination of factors such as binding characteristics, reagent quality and effectiveness, hybridization success, and analysis thresholds and success.

Expression of CT antigen polypeptides can also be determined using protein measurement methods. Preferred methods of specifically and quantitatively measuring proteins include, but are not limited to: mass spectroscopy-based methods such as surface enhanced laser desorption ionization (SELDI; e.g., Ciphergen ProteinChip System, Ciphergen Biosystems, Fremont CA), non-mass spectroscopy-based methods, and immunohistochemistry-based methods such as two-dimensional gel electrophoresis.

SELDI methodology may, through procedures known to those of ordinary skill in the art, be used to vaporize microscopic amounts of tumor protein and to create a "fingerprint" of individual proteins, thereby allowing simultaneous measurement of the abundance of many proteins in a single sample. Preferably SELDI-based assays may be utilized to classify tumor samples with respect to the expression of a variety of CT antigens. Such assays preferably include, but are not limited to the following examples. Gene products discovered by RNA microarrays may be selectively measured by specific (antibody mediated) capture to the SELDI protein disc (e.g., selective SELDI). Gene products discovered by protein screening (e.g., with 2-D gels), may be resolved by "total protein SELDI" optimized to visualize those particular markers of interest from among CT antigens.

Tumors can be classified based on the measurement of multiple CT antigens. Classification based on CT antigen expression can be used to stage disease, monitor progression or regression of disease, and select treatment strategies for the cancer patients.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 43 -

The invention also involves agents such as polypeptides which bind to CT antigen polypeptides. Such binding agents can be used, for example, in screening assays to detect the presence or absence of CT antigen polypeptides and complexes of CT antigen polypeptides and their binding partners and in purification protocols to isolated CT antigen polypeptides and complexes of CT antigen polypeptides and their binding partners. Such agents also can be used to inhibit the native activity of the CT antigen polypeptides, for example, by binding to such polypeptides.

The invention, therefore, embraces peptide binding agents which, for example, can be antibodies or fragments of antibodies having the ability to selectively bind to CT antigen polypeptides. Antibodies include polyclonal and monoclonal antibodies, prepared according to conventional methodology.

Significantly, as is well-known in the art, only a small portion of an antibody molecule, the paratope, is involved in the binding of the antibody to its epitope (see, in general, Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). The pFc' and Fc regions, for example, are effectors of the complement cascade but are not involved in antigen binding. An antibody from which the pFc' region has been enzymatically cleaved, or which has been produced without the pFc' region, designated an F(ab')₂ fragment, retains both of the antigen binding sites of an intact antibody. Similarly, an antibody from which the Fc region has been enzymatically cleaved, or which has been produced without the Fc region, designated an Fab fragment, retains one of the antigen binding sites of an intact antibody molecule. Proceeding further, Fab fragments consist of a covalently bound antibody light chain and a portion of the antibody heavy chain denoted Fd. The Fd fragments are the major determinant of antibody specificity (a single Fd fragment may be associated with up to ten different light chains without altering antibody specificity) and Fd fragments retain epitope-binding ability in isolation.

Within the antigen-binding portion of an antibody, as is well-known in the art, there are complementarity determining regions (CDRs), which directly interact with the epitope of the antigen, and framework regions (FRs), which maintain the tertiary structure of the paratope (see, in general, Clark, 1986; Roitt, 1991). In both the heavy chain Fd fragment and the light chain of IgG immunoglobulins, there are four framework regions (FR1 through FR4) separated respectively by three complementarity determining regions (CDR1 through CDR3).

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 44 -

The CDRs, and in particular the CDR3 regions, and more particularly the heavy chain CDR3, are largely responsible for antibody specificity.

It is now well-established in the art that the non-CDR regions of a mammalian antibody may be replaced with similar regions of conspecific or heterospecific antibodies while retaining the epitopic specificity of the original antibody. This is most clearly manifested in the development and use of "humanized" antibodies in which non-human CDRs are covalently joined to human FR and/or Fc/pFc' regions to produce a functional antibody. See, e.g., U.S. patents 4,816,567, 5,225,539, 5,585,089, 5,693,762 and 5,859,205.

Fully human monoclonal antibodies also can be prepared by immunizing mice transgenic for large portions of human immunoglobulin heavy and light chain loci. See, e.g., U.S. patents 5,545,806, 6,150,584, and references cited therein. Following immunization of these mice (e.g., XenoMouse (Abgenix), HuMAb mice (Medarex/GenPharm)), monoclonal antibodies can be prepared according to standard hybridoma technology. These monoclonal antibodies will have human immunoglobulin amino acid sequences and therefore will not provoke human anti-mouse antibody (HAMA) responses when administered to humans.

Thus, as will be apparent to one of ordinary skill in the art, the present invention also provides for F(ab')₂, Fab, Fv and Fd fragments; chimeric antibodies in which the Fc and/or FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; chimeric F(ab')₂ fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; chimeric Fab fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; and chimeric Fd fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences. The present invention also includes so-called single chain antibodies.

Accordingly, the invention involves polypeptides of numerous size and type that bind specifically to CT antigen polypeptides, and complexes of both CT antigen polypeptides and their binding partners. These polypeptides may be derived also from sources other than antibody technology. For example, such polypeptide binding agents can be provided by degenerate peptide libraries which can be readily prepared in solution, in immobilized form or as phage display libraries. Combinatorial libraries also can be synthesized of peptides

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 45 -

containing one or more amino acids. Libraries further can be synthesized of peptoids and non-peptide synthetic moieties.

Phage display can be particularly effective in identifying binding peptides useful according to the invention. Briefly, one prepares a phage library (using e.g. m13, fd, or
5 lambda phage), displaying inserts from 4 to about 80 amino acid residues using conventional procedures. The inserts may represent, for example, a completely degenerate or biased array. One then can select phage-bearing inserts which bind to the CT antigen polypeptide. This process can be repeated through several cycles of reselection of phage that bind to the CT antigen polypeptide. Repeated rounds lead to enrichment of phage bearing particular
10 sequences. DNA sequence analysis can be conducted to identify the sequences of the expressed polypeptides. The minimal linear portion of the sequence that binds to the CT antigen polypeptide can be determined. One can repeat the procedure using a biased library containing inserts containing part or all of the minimal linear portion plus one or more additional degenerate residues upstream or downstream thereof. Yeast two-hybrid screening
15 methods also may be used to identify polypeptides that bind to the CT antigen polypeptides. Thus, the CT antigen polypeptides of the invention, or a fragment thereof, can be used to screen peptide libraries, including phage display libraries, to identify and select peptide binding partners of the CT antigen polypeptides of the invention. Such molecules can be used, as described, for screening assays, for purification protocols, for interfering directly
20 with the functioning of CT antigen and for other purposes that will be apparent to those of ordinary skill in the art.

As detailed herein, the foregoing antibodies and other binding molecules may be used for example to identify tissues expressing protein or to purify protein. Antibodies also may be coupled to specific diagnostic labeling agents for imaging of cells and tissues that express
25 CT antigens or to therapeutically useful agents according to standard coupling procedures. Diagnostic agents include, but are not limited to, barium sulfate, iocetamic acid, iopanoic acid, ipodate calcium, diatrizoate sodium, diatrizoate meglumine, metrizamide, tyropanoate sodium and radiodiagnostics including positron emitters such as fluorine-18 and carbon-11, gamma emitters such as iodine-123, technitium-99m, iodine-131 and indium-111, nuclides
30 for nuclear magnetic resonance such as fluorine and gadolinium. Other diagnostic agents useful in the invention will be apparent to one of ordinary skill in the art.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 46 -

As used herein, "therapeutically useful agents" include any therapeutic molecule which desirably is targeted selectively to a cell expressing one of the cancer antigens disclosed herein, including antineoplastic agents, radioiodinated compounds, toxins, other cytostatic or cytolytic drugs, and so forth. Antineoplastic therapeutics are well known and

5 include: aminoglutethimide, azathioprine, bleomycin sulfate, busulfan, carmustine, chlorambucil, cisplatin, cyclophosphamide, cyclosporine, cytarabidine, dacarbazine, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, taxol, etoposide, fluorouracil, interferon- α , lomustine, mercaptopurine, methotrexate, mitotane, procarbazine HCl, thioguanine, vinblastine sulfate and vincristine sulfate. Additional antineoplastic agents include those

10 disclosed in Chapter 52, Antineoplastic Agents (Paul Calabresi and Bruce A. Chabner), and the introduction thereto, 1202-1263, of Goodman and Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division). Toxins can be proteins such as, for example, pokeweed anti-viral protein, cholera toxin, pertussis toxin, ricin, gelonin, abrin, diphtheria exotoxin, or *Pseudomonas* exotoxin. Toxin

15 moieties can also be high energy-emitting radionuclides such as cobalt-60.

In some embodiments, antibodies prepared according to the invention are specific for complexes of MHC molecules and the CT antigens described herein.

When "disorder" is used herein, it refers to any pathological condition where the CT antigens are expressed. An example of such a disorder is cancer, including but not limited to:

20 biliary tract cancer; bladder cancer; breast cancer; brain cancer including glioblastomas and medulloblastomas; cervical cancer; choriocarcinoma; colon cancer; endometrial cancer; esophageal cancer; gastric cancer; head and neck cancer; hematological neoplasms including acute lymphocytic and myelogenous leukemia, multiple myeloma, AIDS-associated leukemias and adult T-cell leukemia lymphoma; intraepithelial neoplasms including Bowen's

25 disease and Paget's disease; liver cancer; lung cancer including small cell lung cancer and non-small cell lung cancer; lymphomas including Hodgkin's disease and lymphocytic lymphomas; neuroblastomas; oral cancer including squamous cell carcinoma; ovarian cancer including those arising from epithelial cells, stromal cells, germ cells and mesenchymal cells; pancreatic cancer; prostate cancer; rectal cancer; sarcomas including leiomyosarcoma,

30 rhabdomyosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, synovial sarcoma and osteosarcoma; skin cancer including melanoma, Kaposi's sarcoma, basocellular cancer, and squamous cell cancer; testicular cancer including germinal tumors such as seminoma, non-seminoma

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 47 -

(teratomas, choriocarcinomas), stromal tumors, and germ cell tumors; thyroid cancer including thyroid adenocarcinoma and medullar carcinoma; transitional cancer and renal cancer including adenocarcinoma and Wilms tumor.

Samples of tissue and/or cells for use in the various methods described herein can be obtained through standard methods such as tissue biopsy, including punch biopsy and cell scraping, and collection of blood or other bodily fluids by aspiration or other methods.

In certain embodiments of the invention, an immunoreactive cell sample is removed from a subject. By "immunoreactive cell" is meant a cell which can mature into an immune cell (such as a B cell, a helper T cell, or a cytolytic T cell) upon appropriate stimulation.

Thus immunoreactive cells include CD34⁺ hematopoietic stem cells, immature T cells and immature B cells. When it is desired to produce cytolytic T cells which recognize a CT antigen, the immunoreactive cell is contacted with a cell which expresses a CT antigen under conditions favoring production, differentiation and/or selection of cytolytic T cells; the differentiation of the T cell precursor into a cytolytic T cell upon exposure to antigen is similar to clonal selection of the immune system.

Some therapeutic approaches based upon the disclosure are premised on a response by a subject's immune system, leading to lysis of antigen presenting cells, such as cancer cells which present one or more CT antigens. One such approach is the administration of autologous CTLs specific to a CT antigen/MHC complex to a subject with abnormal cells of the phenotype at issue. It is within the ability of one of ordinary skill in the art to develop such CTLs *in vitro*. An example of a method for T cell differentiation is presented in International Application number PCT/US96/05607. Generally, a sample of cells taken from a subject, such as blood cells, are contacted with a cell presenting the complex and capable of provoking CTLs to proliferate. The target cell can be a transfectant, such as a COS cell. These transfectants present the desired complex of their surface and, when combined with a CTL of interest, stimulate its proliferation. COS cells are widely available, as are other suitable host cells. Specific production of CTL clones is well known in the art. The clonally expanded autologous CTLs then are administered to the subject.

Another method for selecting antigen-specific CTL clones has recently been described (Altman et al., *Science* 274:94-96, 1996; Dunbar et al., *Curr. Biol.* 8:413-416, 1998), in which fluorogenic tetramers of MHC class I molecule/peptide complexes are used to detect specific CTL clones. Briefly, soluble MHC class I molecules are folded *in vitro* in the

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 48 -

presence of β_2 -microglobulin and a peptide antigen which binds the class I molecule. After purification, the MHC/peptide complex is purified and labeled with biotin. Tetramers are formed by mixing the biotinylated peptide-MHC complex with labeled avidin (e.g. phycoerythrin) at a molar ratio of 4:1. Tetramers are then contacted with a source of CTLs such as peripheral blood or lymph node. The tetramers bind CTLs which recognize the peptide antigen/MHC class I complex. Cells bound by the tetramers can be sorted by fluorescence activated cell sorting to isolate the reactive CTLs. The isolated CTLs then can be expanded *in vitro* for use as described herein.

To detail a therapeutic methodology, referred to as adoptive transfer (Greenberg, *J. Immunol.* 136(5): 1917, 1986; Riddel et al., *Science* 257: 238, 1992; Lynch et al, *Eur. J. Immunol.* 21: 1403-1410, 1991; Kast et al., *Cell* 59: 603-614, 1989), cells presenting the desired complex (e.g., dendritic cells) are combined with CTLs leading to proliferation of the CTLs specific thereto. The proliferated CTLs are then administered to a subject with a cellular abnormality which is characterized by certain of the abnormal cells presenting the particular complex. The CTLs then lyse the abnormal cells, thereby achieving the desired therapeutic goal.

The foregoing therapy assumes that at least some of the subject's abnormal cells present the relevant HLA/CT antigen complex. This can be determined very easily, as the art is very familiar with methods for identifying cells which present a particular HLA molecule, as well as how to identify cells expressing DNA of the pertinent sequences, in this case a CT antigen sequence. Once cells presenting the relevant complex are identified via the foregoing screening methodology, they can be combined with a sample from a patient, where the sample contains CTLs. If the complex presenting cells are lysed by the mixed CTL sample, then it can be assumed that a CT antigen is being presented, and the subject is an appropriate candidate for the therapeutic approaches set forth *supra*.

Adoptive transfer is not the only form of therapy that is available in accordance with the invention. CTLs can also be provoked *in vivo*, using a number of approaches. One approach is the use of non-proliferative cells expressing the complex. The cells used in this approach may be those that normally express the complex, such as irradiated tumor cells or cells transfected with one or both of the genes necessary for presentation of the complex (i.e. the antigenic peptide and the presenting HLA molecule). Chen et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 110-114, 1991) exemplifies this approach, showing the use of transfected cells

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 49 -

expressing HPVE7 peptides in a therapeutic regime. Various cell types may be used. Similarly, vectors carrying one or both of the genes of interest may be used. Viral or bacterial vectors are especially preferred. For example, nucleic acids which encode a CT antigen polypeptide or peptide may be operably linked to promoter and enhancer sequences which direct expression of the CT antigen polypeptide or peptide in certain tissues or cell types. The nucleic acid may be incorporated into an expression vector. Expression vectors may be unmodified extrachromosomal nucleic acids, plasmids or viral genomes constructed or modified to enable insertion of exogenous nucleic acids, such as those encoding CT antigen, as described elsewhere herein. Nucleic acids encoding a CT antigen also may be inserted into a retroviral genome, thereby facilitating integration of the nucleic acid into the genome of the target tissue or cell type. In these systems, the gene of interest is carried by a microorganism, e.g., a Vaccinia virus, pox virus, herpes simplex virus, retrovirus or adenovirus, and the materials de facto "infect" host cells. The cells which result present the complex of interest, and are recognized by autologous CTLs, which then proliferate.

A similar effect can be achieved by combining the CT antigen or an immune response stimulatory fragment thereof with an adjuvant to facilitate incorporation into antigen presenting cells *in vivo*. The CT antigen polypeptide is processed to yield the peptide partner of the HLA molecule while a CT antigen peptide may be presented without the need for further processing. Generally, subjects can receive an intradermal injection of an effective amount of the CT antigen. Initial doses can be followed by booster doses, following immunization protocols standard in the art.

The invention involves the use of various materials disclosed herein to "immunize" subjects or as "vaccines". As used herein, "immunization" or "vaccination" means increasing or activating an immune response against an antigen. It does not require elimination or eradication of a condition but rather contemplates the clinically favorable enhancement of an immune response toward an antigen. Generally accepted animal models can be used for testing of immunization against cancer using a CT antigen nucleic acid. For example, human cancer cells can be introduced into a mouse to create a tumor, and one or more CT antigen nucleic acids can be delivered by the methods described herein. The effect on the cancer cells (e.g., reduction of tumor size) can be assessed as a measure of the effectiveness of the CT antigen nucleic acid immunization. Of course, testing of the foregoing animal model using more conventional methods for immunization include the administration of one or more

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 50 -

CT antigen polypeptides or peptides derived therefrom, optionally combined with one or more adjuvants and/or cytokines to boost the immune response. Methods for immunization, including formulation of a vaccine composition and selection of doses, route of administration and the schedule of administration (e.g. primary and one or more booster doses), are well known in the art. The tests also can be performed in humans, where the end point is to test for the presence of enhanced levels of circulating CTLs against cells bearing the antigen, to test for levels of circulating antibodies against the antigen, to test for the presence of cells expressing the antigen and so forth.

As part of the immunization compositions, one or more CT antigens or stimulatory fragments thereof are administered with one or more adjuvants to induce an immune response or to increase an immune response. An adjuvant is a substance incorporated into or administered with antigen which potentiates the immune response. Adjuvants may enhance the immunological response by providing a reservoir of antigen (extracellularly or within macrophages), activating macrophages and stimulating specific sets of lymphocytes.

Adjuvants of many kinds are well known in the art. Specific examples of adjuvants include monophosphoryl lipid A (MPL, SmithKline Beecham), a congener obtained after purification and acid hydrolysis of *Salmonella minnesota* Re 595 lipopolysaccharide; saponins including QS21 (SmithKline Beecham), a pure QA-21 saponin purified from *Quillja saponaria* extract; DQS21, described in PCT application WO96/33739 (SmithKline Beecham); QS-7, QS-17, QS-18, and QS-L1 (So et al., *Mol. Cells* 7:178-186, 1997); incomplete Freund's adjuvant; complete Freund's adjuvant; montanide; immunostimulatory oligonucleotides (see e.g. CpG oligonucleotides described by Kreig et al., *Nature* 374:546-9, 1995); vitamin E and various water-in-oil emulsions prepared from biodegradable oils such as squalene and/or tocopherol. Preferably, the peptides are administered mixed with a combination of DQS21/MPL. The ratio of DQS21 to MPL typically will be about 1:10 to 10:1, preferably about 1:5 to 5:1 and more preferably about 1:1. Typically for human administration, DQS21 and MPL will be present in a vaccine formulation in the range of about 1 µg to about 100 µg. Other adjuvants are known in the art and can be used in the invention (see, e.g. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2nd Ed., 1986). Methods for the preparation of mixtures or emulsions of peptide and adjuvant are well known to those of skill in the art of vaccination.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 51 -

Other agents which stimulate the immune response of the subject can also be administered to the subject. For example, other cytokines are also useful in vaccination protocols as a result of their lymphocyte regulatory properties. Many other cytokines useful for such purposes will be known to one of ordinary skill in the art, including interleukin-12 (IL-12) which has been shown to enhance the protective effects of vaccines (see, e.g., *Science* 268: 1432-1434, 1995), GM-CSF and IL-18. Thus cytokines can be administered in conjunction with antigens and adjuvants to increase the immune response to the antigens.

There are a number of immune response potentiating compounds that can be used in vaccination protocols. These include costimulatory molecules provided in either protein or nucleic acid form. Such costimulatory molecules include the B7-1 and B7-2 (CD80 and CD86 respectively) molecules which are expressed on dendritic cells (DC) and interact with the CD28 molecule expressed on the T cell. This interaction provides costimulation (signal 2) to an antigen/MHC/TCR stimulated (signal 1) T cell, increasing T cell proliferation and effector function. B7 also interacts with CTLA4 (CD152) on T cells and studies involving CTLA4 and B7 ligands indicate that the B7-CTLA4 interaction can enhance antitumor immunity and CTL proliferation (Zheng P., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (11):6284-6289 (1998)).

B7 typically is not expressed on tumor cells so they are not efficient antigen presenting cells (APCs) for T cells. Induction of B7 expression would enable the tumor cells to stimulate more efficiently CTL proliferation and effector function. A combination of B7/IL-6/IL-12 costimulation has been shown to induce IFN-gamma and a Th1 cytokine profile in the T cell population leading to further enhanced T cell activity (Gajewski et al., *J. Immunol.*, 154:5637-5648 (1995)). Tumor cell transfection with B7 has been discussed in relation to *in vitro* CTL expansion for adoptive transfer immunotherapy by Wang et al., (*J. Immunol.*, 19:1-8 (1986)). Other delivery mechanisms for the B7 molecule would include nucleic acid (naked DNA) immunization (Kim J., et al. *Nat Biotechnol.*, 15:7:641-646 (1997)) and recombinant viruses such as adeno and pox (Wendtner et al., *Gene Ther.*, 4:7:726-735 (1997)). These systems are all amenable to the construction and use of expression cassettes for the coexpression of B7 with other molecules of choice such as the antigens or fragment(s) of antigens discussed herein (including polytopes) or cytokines. These delivery systems can be used for induction of the appropriate molecules *in vitro* and for *in vivo* vaccination situations. The use of anti-CD28 antibodies to directly stimulate T

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 52 -

cells *in vitro* and *in vivo* could also be considered. Similarly, the inducible co-stimulatory molecule ICOS which induces T cell responses to foreign antigen could be modulated, for example, by use of anti-ICOS antibodies (Hutloff et al., *Nature* 397:263-266, 1999).

5 Lymphocyte function associated antigen-3 (LFA-3) is expressed on APCs and some tumor cells and interacts with CD2 expressed on T cells. This interaction induces T cell IL-2 and IFN-gamma production and can thus complement but not substitute, the B7/CD28 costimulatory interaction (Parra et al., *J. Immunol.*, 158:637-642 (1997), Fenton et al., *J. Immunother.*, 21:2:95-108 (1998)).

10 Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) is expressed on leukocytes and interacts with ICAM-1 expressed on APCs and some tumor cells. This interaction induces T cell IL-2 and IFN-gamma production and can thus complement but not substitute, the B7/CD28 costimulatory interaction (Fenton et al., *J. Immunother.*, 21:2:95-108 (1998)). LFA-1 is thus a further example of a costimulatory molecule that could be provided in a vaccination protocol in the various ways discussed above for B7.

15 Complete CTL activation and effector function requires Th cell help through the interaction between the Th cell CD40L (CD40 ligand) molecule and the CD40 molecule expressed by DCs (Ridge et al., *Nature*, 393:474 (1998), Bennett et al., *Nature*, 393:478 (1998), Schoenberger et al., *Nature*, 393:480 (1998)). This mechanism of this costimulatory signal is likely to involve upregulation of B7 and associated IL-6/IL-12 production by the DC (APC). The CD40-CD40L interaction thus complements the signal 1 (antigen/MHC-TCR) and signal 2 (B7-CD28) interactions.

20 The use of anti-CD40 antibodies to stimulate DC cells directly, would be expected to enhance a response to tumor antigens which are normally encountered outside of a inflammatory context or are presented by non-professional APCs (tumor cells). In these situations Th help and B7 costimulation signals are not provided. This mechanism might be used in the context of antigen pulsed DC based therapies or in situations where Th epitopes have not been defined within known TRA precursors.

30 A CT antigen polypeptide, or a fragment thereof, also can be used to isolate their native binding partners. Isolation of such binding partners may be performed according to well-known methods. For example, isolated CT antigen polypeptides can be attached to a substrate (e.g., chromatographic media, such as polystyrene beads, or a filter), and then a solution suspected of containing the binding partner may be applied to the substrate. If a

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 53 -

binding partner which can interact with CT antigen polypeptides is present in the solution, then it will bind to the substrate-bound CT antigen polypeptide. The binding partner then may be isolated.

It will also be recognized that the invention embraces the use of the CT antigen cDNA sequences in expression vectors, as well as to transfect host cells and cell lines, be these prokaryotic (e.g., *E. coli*), or eukaryotic (e.g., dendritic cells, B cells, CHO cells, COS cells, yeast expression systems and recombinant baculovirus expression in insect cells). Especially useful are mammalian cells such as human, mouse, hamster, pig, goat, primate, etc. They may be of a wide variety of tissue types, and include primary cells and cell lines. Specific examples include keratinocytes, peripheral blood leukocytes, bone marrow stem cells and embryonic stem cells. The expression vectors require that the pertinent sequence, i.e., those nucleic acids described *supra*, be operably linked to a promoter.

The invention also contemplates delivery of nucleic acids, polypeptides or peptides for vaccination. Delivery of polypeptides and peptides can be accomplished according to standard vaccination protocols which are well known in the art. In another embodiment, the delivery of nucleic acid is accomplished by *ex vivo* methods, i.e. by removing a cell from a subject, genetically engineering the cell to include a CT antigen, and reintroducing the engineered cell into the subject. One example of such a procedure is the use of dendritic cells as delivery and antigen presentation vehicles for the administration of CT antigens in vaccine therapies. Another example of such a procedure is outlined in U.S. Patent 5,399,346 and in exhibits submitted in the file history of that patent, all of which are publicly available documents. In general, it involves introduction *in vitro* of a functional copy of a gene into a cell(s) of a subject, and returning the genetically engineered cell(s) to the subject. The functional copy of the gene is under operable control of regulatory elements which permit expression of the gene in the genetically engineered cell(s). Numerous transfection and transduction techniques as well as appropriate expression vectors are well known to those of ordinary skill in the art, some of which are described in PCT application WO95/00654. *In vivo* nucleic acid delivery using vectors such as viruses and targeted liposomes also is contemplated according to the invention.

In preferred embodiments, a virus vector for delivering a nucleic acid encoding a CT antigen is selected from the group consisting of adenoviruses, adeno-associated viruses, poxviruses including vaccinia viruses and attenuated poxviruses, Semliki Forest virus,

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 54 -

Venezuelan equine encephalitis virus, retroviruses, Sindbis virus, and Ty virus-like particle. Examples of viruses and virus-like particles which have been used to deliver exogenous nucleic acids include: replication-defective adenoviruses (e.g., Xiang et al., *Virology* 219:220-227, 1996; Eloit et al., *J. Virol.* 71:5375-5381, 1997; Chengalvala et al., *Vaccine* 15:335-339, 1997), a modified retrovirus (Townsend et al., *J. Virol.* 71:3365-3374, 1997), a nonreplicating retrovirus (Irwin et al., *J. Virol.* 68:5036-5044, 1994), a replication defective Semliki Forest virus (Zhao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3009-3013, 1995), canarypox virus and highly attenuated vaccinia virus derivative (Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11349-11353, 1996), non-replicative vaccinia virus (Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11341-11348, 1996), replicative vaccinia virus (Moss, *Dev. Biol. Stand.* 82:55-63, 1994), Venezuelan equine encephalitis virus (Davis et al., *J. Virol.* 70:3781-3787, 1996), Sindbis virus (Pugachev et al., *Virology* 212:587-594, 1995), and Ty virus-like particle (Allsopp et al., *Eur. J. Immunol.* 26:1951-1959, 1996). In preferred embodiments, the virus vector is an adenovirus or an alphavirus.

Another preferred virus for certain applications is the adeno-associated virus, a double-stranded DNA virus. The adeno-associated virus is capable of infecting a wide range of cell types and species and can be engineered to be replication-deficient. It further has advantages, such as heat and lipid solvent stability, high transduction frequencies in cells of diverse lineages, including hematopoietic cells, and lack of superinfection inhibition thus allowing multiple series of transductions. The adeno-associated virus can integrate into human cellular DNA in a site-specific manner, thereby minimizing the possibility of insertional mutagenesis and variability of inserted gene expression. In addition, wild-type adeno-associated virus infections have been followed in tissue culture for greater than 100 passages in the absence of selective pressure, implying that the adeno-associated virus genomic integration is a relatively stable event. The adeno-associated virus can also function in an extrachromosomal fashion.

In general, other preferred viral vectors are based on non-cytopathic eukaryotic viruses in which non-essential genes have been replaced with the gene of interest. Non-cytopathic viruses include retroviruses, the life cycle of which involves reverse transcription of genomic viral RNA into DNA with subsequent proviral integration into host cellular DNA. Adenoviruses and retroviruses have been approved for human gene therapy trials. In general, the retroviruses are replication-deficient (i.e., capable of directing synthesis of the desired

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 55 -

proteins, but incapable of manufacturing an infectious particle). Such genetically altered retroviral expression vectors have general utility for the high-efficiency transduction of genes *in vivo*. Standard protocols for producing replication-deficient retroviruses (including the steps of incorporation of exogenous genetic material into a plasmid, transfection of a packaging cell lined with plasmid, production of recombinant retroviruses by the packaging cell line, collection of viral particles from tissue culture media, and infection of the target cells with viral particles) are provided in Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual," W.H. Freeman Co., New York (1990) and Murry, E.J. Ed. "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991).

Preferably the foregoing nucleic acid delivery vectors: (1) contain exogenous genetic material that can be transcribed and translated in a mammalian cell and that can induce an immune response in a host, and (2) contain on a surface a ligand that selectively binds to a receptor on the surface of a target cell, such as a mammalian cell, and thereby gains entry to the target cell.

Various techniques may be employed for introducing nucleic acids of the invention into cells, depending on whether the nucleic acids are introduced *in vitro* or *in vivo* in a host. Such techniques include transfection of nucleic acid-CaPO₄ precipitates, transfection of nucleic acids associated with DEAE, transfection or infection with the foregoing viruses including the nucleic acid of interest, liposome mediated transfection, and the like. For certain uses, it is preferred to target the nucleic acid to particular cells. In such instances, a vehicle used for delivering a nucleic acid of the invention into a cell (e.g., a retrovirus, or other virus; a liposome) can have a targeting molecule attached thereto. For example, a molecule such as an antibody specific for a surface membrane protein on the target cell or a ligand for a receptor on the target cell can be bound to or incorporated within the nucleic acid delivery vehicle. Preferred antibodies include antibodies which selectively bind a CT antigen, alone or as a complex with a MHC molecule. Especially preferred are monoclonal antibodies. Where liposomes are employed to deliver the nucleic acids of the invention, proteins which bind to a surface membrane protein associated with endocytosis may be incorporated into the liposome formulation for targeting and/or to facilitate uptake. Such proteins include capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half life, and the like. Polymeric delivery

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 56 -

systems also have been used successfully to deliver nucleic acids into cells, as is known by those skilled in the art. Such systems even permit oral delivery of nucleic acids.

When administered, the therapeutic compositions of the present invention can be administered in pharmaceutically acceptable preparations. Such preparations may routinely contain pharmaceutically acceptable concentrations of salt, buffering agents, preservatives, compatible carriers, supplementary immune potentiating agents such as adjuvants and cytokines and optionally other therapeutic agents.

The therapeutics of the invention can be administered by any conventional route, including injection or by gradual infusion over time. The administration may, for example, be oral, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, intracavity, subcutaneous, or transdermal. When antibodies are used therapeutically, a preferred route of administration is by pulmonary aerosol. Techniques for preparing aerosol delivery systems containing antibodies are well known to those of skill in the art. Generally, such systems should utilize components which will not significantly impair the biological properties of the antibodies, such as the paratope binding capacity (see, for example, Sciarra and Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp. 1694-1712; incorporated by reference). Those of skill in the art can readily determine the various parameters and conditions for producing antibody aerosols without resort to undue experimentation. When using antisense preparations of the invention, slow intravenous administration is preferred.

The compositions of the invention are administered in effective amounts. An "effective amount" is that amount of a CT antigen composition that alone, or together with further doses, produces the desired response, e.g. increases an immune response to the CT antigen. In the case of treating a particular disease or condition characterized by expression of one or more CT antigens, such as cancer, the desired response is inhibiting the progression of the disease. This may involve only slowing the progression of the disease temporarily, although more preferably, it involves halting the progression of the disease permanently. This can be monitored by routine methods or can be monitored according to diagnostic methods of the invention discussed herein. The desired response to treatment of the disease or condition also can be delaying the onset or even preventing the onset of the disease or condition.

Such amounts will depend, of course, on the particular condition being treated, the severity of the condition, the individual patient parameters including age, physical condition,

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 57 -

size and weight, the duration of the treatment, the nature of concurrent therapy (if any), the specific route of administration and like factors within the knowledge and expertise of the health practitioner. These factors are well known to those of ordinary skill in the art and can be addressed with no more than routine experimentation. It is generally preferred that a maximum dose of the individual components or combinations thereof be used, that is, the highest safe dose according to sound medical judgment. It will be understood by those of ordinary skill in the art, however, that a patient may insist upon a lower dose or tolerable dose for medical reasons, psychological reasons or for virtually any other reasons.

The pharmaceutical compositions used in the foregoing methods preferably are sterile and contain an effective amount of CT antigen or nucleic acid encoding CT antigen for producing the desired response in a unit of weight or volume suitable for administration to a patient. The response can, for example, be measured by determining the immune response following administration of the CT antigen composition via a reporter system by measuring downstream effects such as gene expression, or by measuring the physiological effects of the CT antigen composition, such as regression of a tumor or decrease of disease symptoms. Other assays will be known to one of ordinary skill in the art and can be employed for measuring the level of the response.

The doses of CT antigen compositions (e.g., polypeptide, peptide, antibody, cell or nucleic acid) administered to a subject can be chosen in accordance with different parameters, in particular in accordance with the mode of administration used and the state of the subject. Other factors include the desired period of treatment. In the event that a response in a subject is insufficient at the initial doses applied, higher doses (or effectively higher doses by a different, more localized delivery route) may be employed to the extent that patient tolerance permits.

In general, for treatments for eliciting or increasing an immune response, doses of CT antigen are formulated and administered in doses between 1 ng and 1 mg, and preferably between 10 ng and 100 µg, according to any standard procedure in the art. Where nucleic acids encoding CT antigen or variants thereof are employed, doses of between 1 ng and 0.1 mg generally will be formulated and administered according to standard procedures. Other protocols for the administration of CT antigen compositions will be known to one of ordinary skill in the art, in which the dose amount, schedule of injections, sites of injections, mode of administration (e.g., intra-tumoral) and the like vary from the foregoing. Administration of

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 58 -

CT antigen compositions to mammals other than humans, e.g. for testing purposes or veterinary therapeutic purposes, is carried out under substantially the same conditions as described above.

Where CT antigen peptides are used for vaccination, modes of administration which effectively deliver the CT antigen and adjuvant, such that an immune response to the antigen is increased, can be used. For administration of a CT antigen peptide in adjuvant, preferred methods include intradermal, intravenous, intramuscular and subcutaneous administration. Although these are preferred embodiments, the invention is not limited by the particular modes of administration disclosed herein. Standard references in the art (e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, 1990) provide modes of administration and formulations for delivery of immunogens with adjuvant or in a non-adjuvant carrier.

When administered, the pharmaceutical preparations of the invention are applied in pharmaceutically-acceptable amounts and in pharmaceutically-acceptable compositions. The term "pharmaceutically acceptable" means a non-toxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredients. Such preparations may routinely contain salts, buffering agents, preservatives, compatible carriers, and optionally other therapeutic agents. When used in medicine, the salts should be pharmaceutically acceptable, but non-pharmaceutically acceptable salts may conveniently be used to prepare pharmaceutically-acceptable salts thereof and are not excluded from the scope of the invention. Such pharmacologically and pharmaceutically-acceptable salts include, but are not limited to, those prepared from the following acids: hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, nitric, phosphoric, maleic, acetic, salicylic, citric, formic, malonic, succinic, and the like. Also, pharmaceutically-acceptable salts can be prepared as alkaline metal or alkaline earth salts, such as sodium, potassium or calcium salts.

A CT antigen composition may be combined, if desired, with a pharmaceutically-acceptable carrier. The term "pharmaceutically-acceptable carrier" as used herein means one or more compatible solid or liquid fillers, diluents or encapsulating substances which are suitable for administration into a human. The term "carrier" denotes an organic or inorganic ingredient, natural or synthetic, with which the active ingredient is combined to facilitate the application. The components of the pharmaceutical compositions also are capable of being co-mingled with the molecules of the present invention, and with each other, in a manner

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 59 -

such that there is no interaction which would substantially impair the desired pharmaceutical efficacy.

The pharmaceutical compositions may contain suitable buffering agents, including: acetic acid in a salt; citric acid in a salt; boric acid in a salt; and phosphoric acid in a salt.

5 The pharmaceutical compositions also may contain, optionally, suitable preservatives, such as: benzalkonium chloride; chlorobutanol; parabens and thimerosal.

The pharmaceutical compositions may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any of the methods well-known in the art of pharmacy. All methods include the step of bringing the active agent into association with a carrier which constitutes
10 one or more accessory ingredients. In general, the compositions are prepared by uniformly and intimately bringing the active compound into association with a liquid carrier, a finely divided solid carrier, or both, and then, if necessary, shaping the product.

Compositions suitable for oral administration may be presented as discrete units, such as capsules, tablets, lozenges, each containing a predetermined amount of the active
15 compound. Other compositions include suspensions in aqueous liquids or non-aqueous liquids such as a syrup, elixir or an emulsion.

Compositions suitable for parenteral administration conveniently comprise a sterile aqueous or non-aqueous preparation of CT antigen polypeptides or nucleic acids, which is preferably isotonic with the blood of the recipient. This preparation may be formulated
20 according to known methods using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The sterile injectable preparation also may be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally-acceptable diluent or solvent, for example, as a solution in 1,3-butane diol. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution, and isotonic sodium chloride solution. In addition,
25 sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose any bland fixed oil may be employed including synthetic mono- or di-glycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid may be used in the preparation of injectables. Carrier formulation suitable for oral, subcutaneous, intravenous, intramuscular, etc. administrations can be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA.

30 As used herein with respect to nucleic acids, the term "isolated" means: (i) amplified *in vitro* by, for example, polymerase chain reaction (PCR); (ii) recombinantly produced by cloning; (iii) purified, as by cleavage and gel separation; or (iv) synthesized by, for example,

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 60 -

chemical synthesis. An isolated nucleic acid is one which is readily manipulable by recombinant DNA techniques well known in the art. Thus, a nucleotide sequence contained in a vector in which 5' and 3' restriction sites are known or for which polymerase chain reaction (PCR) primer sequences have been disclosed is considered isolated but a nucleic acid sequence existing in its native state in its natural host is not. An isolated nucleic acid may be substantially purified, but need not be. For example, a nucleic acid that is isolated within a cloning or expression vector is not pure in that it may comprise only a tiny percentage of the material in the cell in which it resides. Such a nucleic acid is isolated, however, as the term is used herein because it is readily manipulable by standard techniques known to those of ordinary skill in the art. An isolated nucleic acid as used herein is not a naturally occurring chromosome.

As used herein with respect to polypeptides, "isolated" means separated from its native environment and present in sufficient quantity to permit its identification or use. Isolated, when referring to a protein or polypeptide, means, for example: (i) selectively produced by expression cloning or (ii) purified as by chromatography or electrophoresis. Isolated proteins or polypeptides may, but need not be, substantially pure. The term "substantially pure" means that the proteins or polypeptides are essentially free of other substances with which they may be found in nature or *in vivo* systems to an extent practical and appropriate for their intended use. Substantially pure polypeptides may be produced by techniques well known in the art. Because an isolated protein may be admixed with a pharmaceutically acceptable carrier in a pharmaceutical preparation, the protein may comprise only a small percentage by weight of the preparation. The protein is nonetheless isolated in that it has been separated from the substances with which it may be associated in living systems, i.e. isolated from other proteins.

Examples

Example 1: Identification of CT antigens

Much attention has been given to the potential of CT antigens as targets for cancer vaccine development, and, other than mutational antigens and virus encoded antigens, they clearly represent the most specific tumor antigens discovered to date. However, the CT

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 61 -

antigens also provide a new way to think about cancer and its evolution during the course of the disease.

The starting point for this view is the fact that CT antigen expression is restricted to early germ cell development and cancer. Germ cells give rise to gametes (oocytes and spermatocytes) and trophoblastic cells that contribute to the formation of the chorion and the placenta. Primitive germ cells arise in the wall of the yolk sack and during embryogenesis migrate to the future site of the gonads. In oogenesis, the process begins before birth, with oogonia differentiating into primary oocytes. The primary oocytes, which reach their maximal numbers during fetal development, are arrested at the initial phase of meiosis, and do not renew and complete meiosis until ovulation and fertilization. In contrast, spermatogenesis begins at puberty and is a continuous process of mitosis to maintain the spermatogonia pool and meiosis to generate the mature sperm population. CT antigens, like SCP-1 and OY-TES-1, the proacrosomal binding protein precursor, are clearly important in gametogenesis, and it is likely that the other CT antigens with their restricted expression in gametes and trophoblasts also play a critical role in early germ cell development.

One possibility to account for aberrant CT expression in cancer relates to the global demethylation associated with certain cancers (42). The promoter region of the MAGE gene has binding sites for transcriptional activators and these sites are methylated in normal somatic cells but demethylated in MAGE-expressing cancer cells and testis. Although cancer-associated demethylation could therefore account for CT (MAGE) expression in tumors, it does not easily accommodate the usual observation of non-coordinate expression patterns (sets) of different CT antigens in most tumors. Also, the marked heterogeneity in CT expression in some tumors (34, 43) is also not easily explicable by a global demethylation process.

Another mechanism for reactivating CT expression in cancer has to do with mutations in regulatory regions of the CT genes. Although no mutations in CT genes have been found to date, more extensive sequencing, particularly in the promoter region, needs to be done before this can be excluded. However, mutation of CT genes is unlikely to be a common mechanism for the induction of CT expression in cancer.

Another possibility to account for the appearance of CT antigens in cancer is the induction or activation of a gametogenic program in cancer. According to this view, the different CT sets seen in cancer would replicate the corresponding sets of CT antigens

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 62 -

normally expressed during different stages of gametogenesis or trophoblast development. Triggering events for inducing the gametogenic program could be a mutation in an as yet unidentified master switch in germ cell development, or an activation of this master switch by threshold mutations in oncogenes, suppressor genes, or other genes in cancer. It is also

5 possible that activation of a single CT gene could be the switch for activating other genes in the gametogenic program. Supporting evidence for this idea comes from the study of synovial sarcoma, where a translocation event involving the SYT gene on chromosome 18 and the SSX-1 or SSX-2 gene on chromosome X is associated with high expression of unrelated CT antigens, such as NY-ESO-1 and MAGE (44, 45). Extending this line of

10 reasoning and relating it to the role of demethylation in the appearance of CT antigens, a demethylation state in cancer (whatever its cause) could induce the gametogenic program and result in the activation of silent CT genes. Alternatively, demethylation may be an intrinsic part of the gametogenic program and therefore a consequence, not a cause, of switching on the gametogenic program and CT genes in cancer.

15 In addition to questions about mechanisms for reactivating CT antigen expression in cancer, another important issue is whether expression of these genes in the cancer cell contributes to its malignant behavior. The finding that gametes, trophoblasts and cancers share a battery of antigens restricted to these cell types suggests extending the search for other shared characteristics.

20 It was a similarity in the biological features of trophoblasts and cancer cells that prompted the Scottish embryologist John Beard at the turn of the last century to propose his trophoblastic theory of cancer (46, 47). In his view, cancers arise from germ cells that stray or are arrested in their trek to the gonads. Under the influence of carcinogenic stimuli, such cells undergo a conversion to malignant trophoblastic cells. These malignant trophoblastic

25 cells take on features of the resident cell types in different organs, but the resulting cancers, no matter their site of origin or how distinct they appear morphologically, are of trophoblastic origin. Beard ascribed the invasive, destructive and metastatic features of cancer to functions normally displayed by trophoblastic cells, e.g., invasion of blood vessels, growth into the uterine wall, and spread beyond the uterus. From a contemporary perspective, Beard's idea

30 that cancers are derived from arrested germ cells seems incompatible with our growing knowledge of serological and molecular markers that distinguish different pathways of normal differentiation and their preservation in cancer. Beard's insight that trophoblasts and

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 63 -

cancer cells share common features is better explained by the induction of a gametogenic program in resident cancer cells, rather than the derivation of cancer from an aberrant germ cell. The end result, however, would be the same - selected features of cells undergoing gametogenesis and trophoblast development being imposed on transformed somatic cells.

5 In addition to CT antigens, other features shared by germ cells and cancer are identified. For example, SCP-1, a critical element in the meiotic program, is expressed in non-germ cell cancers. The induction of a meiotic program in a somatic cell, normal or malignant, likely leads to chromosomal anarchy, a prime feature of advanced cancers. Accordingly, other proteins uniquely associated with meiosis and expressed in cancer cells
10 also are identified as candidate CT antigens.

OY-TES-1, the proacrosin binding protein precursor that is part of the unique program leading to the formation of spermatozoa, has been identified as a CT antigen. Accordingly, other mature sperm-specific gene products that are expressed in cancer cells also are identified as candidate CT antigens.

15 In addition, expression of CT antigens by trophoblasts sheds new light on an old issue - the much studied sporadic production of human chorionic gonadotropin (HCG) and other trophoblastic hormones by human cancers (e.g., 48, 49, 50). The production of HCG by cancer cells has been generally viewed as yet another indication of the genetic instability of cancer cells, resulting in the random and aberrant activation of silent genes during
20 carcinogenesis and tumor progression. However, it can also be viewed as a consequence of the induction of a gametogenic/trophoblastic program in cancer, one that would also result in the semi-coordinate expression of CT antigens. Activation of this program would also confer other properties of germ cells, gametes, and trophoblasts on cancer cells, but these are more difficult to relate in any precise fashion. Nonetheless, immortalization, invasion, lack
25 of adhesion, migratory behavior, induction of blood vessels, demethylation, and downregulation of MHC, are some features shared by cancer and by cells undergoing germ cell/gamete/trophoblast differentiation pathways. The metastatic properties of cancer may also have counterparts in the migratory behavior of germ cells, and in the propensity of normal trophoblast cells to migrate to other organs, such as the lung, during normal
30 pregnancy, but then to undergo involution at term.

In pursuing the idea of a program change in cancer leading to the expression of gametogenic features, a hypothesis termed "Gametogenic Program Induction in Cancer"

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 64 -

(GPIC), it might be well to distinguish at least four different pathways involved in germ cell development: A) germ cell → germ cell, B) germ cell → oogonia → oocytes, C) germ cell → spermatogonia → sperm, and D) germ cell → trophoblast. The meiotic program would be common to B and C, proteins like OY-TES-1 would be restricted to C, and HCG would be a characteristic of D. The reason for distinguishing these pathways and ultimately stages in each pathway is that the variety of patterns or sets of CT antigens observed in different cancers may be a reflection of the germ cell program, e.g., pathway and stage that has been induced in these cancers.

With this background and framework of thinking about the relation of gametogenesis and cancer development, there are a number of approaches to be taken to identify additional CT antigens.

1. The search for new CT antigens is accomplished using several methodologies, including SEREX (see, for example, ref. 10), particularly with libraries from testis, normal or malignant trophoblasts, or tumors or tumor cell lines (growing with or without demethylating agents) that express a range of CT antigens, and by extending the use of representational difference analysis. Bioinformatics and chip technology are used for mining databanks for transcripts that show cancer/gamete/trophoblast specificity (e.g., screening annotation of sequence records).

2. The expression pattern of known CT antigens in normal gametogenesis and trophoblast development is determined to identify markers that distinguish different pathways and stages in the normal gametogenic program. This information provides a basis for interpreting the complex patterns of CT expression in cancers in relation to gametogenic pathways/stages, and provides new ways to classify cancer on the basis of CT phenotypes.

3. The frequency of expression of individual CT antigens in different tumor types has been defined for those CT antigens known to date. In addition to analyzing frequency of expression for CT antigens identified by the methods described herein, additional information is gathered about the composite CT phenotype of individual tumors, and how frequently these composite CT patterns are seen in tumors of different origin. Databases of clinical, genotypic, phenotypic and CT antigen expression data for individual tumors are established to compare the properties of individual tumors and establish correlations between the data. With this information, correlations of CT expression with other biological features of the

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 65 -

tumor, e.g., growth rate, local vs. invasive, primary vs. metastatic, different metastatic deposits in the same patient, etc. can be established.

4. Determining which stage in the life history of cancer that CT (gametogenic) features are induced can be approached in model systems in the mouse, *in vitro* systems with human cells, or with naturally occurring tumors in man that show incremental stages in tumor progression. As discussed above, there is evidence that CT expression is a sign of greater malignancy.

5. The heterogeneous expression of CT antigens in a large proportion of human cancers needs to be understood. This may reflect a quantitative difference in levels of mRNA/protein in CT⁺ and CT⁻ cells, or there may be a qualitative distinction between CT⁺ and CT⁻ cells in CT mRNA/protein expression. Laser dissection microscopy may be one way to analyze this question and cloning of tumor cells from a tumor with heterogeneous CT expression is another approach to understand heterogeneous expression. There is a growing impression that established human cancer cell lines show a higher frequency of CT antigen expression than what would be expected from CT typing of the corresponding tumor type, particularly tumors with a low frequency of CT expression. This could be a secondary consequence of *in vitro* culture, or it could be that CT⁺ cells (even if they represent only a minority population of the tumor) have a growth advantage for propagating *in vitro*, and possibly also *in vivo*.

6. Although CT antigens provide a strong link between the gametogenic program and cancer, it is determined whether other distinguishing features of gamete development are expressed by cancer and whether their expression is correlated with CT antigen expression. The many reports over the last three decades of HCG production by certain human cancers provides a specific starting point to explore this issue and ask whether the production of HCG is correlated with CT antigen expression, particularly a unique pattern of CT expression, such as a pattern reflecting the trophoblast program.

7. Transgenic and knock-out approaches using mouse CT counterparts, and transfection analysis with CT coding genes in normal and malignant human cells are performed to define the role of CT antigens in gametogenesis and trophoblast development and their functional significance in cancer.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 66 -

Example 2: Identification of CT gene products

In order to identify new CT gene products, the Unigene database, a compilation of both EST and Genbank databases, was mined for transcripts expressed exclusively in cancer and normal testis. Subsequent RT-PCR analysis of candidate transcripts identified several

5 gene products with highly restricted mRNA expression patterns, including three newly defined CT genes.

Methods and Materials*Bioinformatic Identification of Cancer/Testis-Associated Unigene Clusters*

10 The cDNA X profiler tool of the Cancer Genome Anatomy Project (<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler>) was used to search the Unigene database in the following manner. First, 2 pools of expressed sequence tags (ESTs) were established. Pool A consisted of ESTs derived from 6 normal testis cDNA libraries, and Pool B consisted of ESTs derived from 188 tumor-derived cDNA libraries (all histological types). The X

15 profiler search engine was directed to identify those Unigene clusters containing ESTs from both Pool A and Pool B, and exclude Unigene clusters containing ESTs from any other normal tissue cDNA library. Tissue expression patterns of the resultant Unigene clusters were also analyzed by *in silico* Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) using the SAGE:Gene to tag mapping tool associated with each Unigene cluster entry. Their relation

20 to known gene products was determined by BLAST searches of nucleotide and protein databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) or by motif analysis of putative protein translations (<http://motif.genome.ad.jp>). Furthermore, BLAST searches of representative ESTs from all identified Unigene clusters were performed against the human genome sequence database in order to obtain gene mapping information and to determine intron/exon

25 boundaries used in PCR primer design.

Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) analysis

Total RNA from 20 different normal human tissues was purchased from Clontech Laboratories Incorporated (Palo Alto, CA) and Ambion Incorporated (Austin, Texas). Tumor

30 tissues were derived from surgical specimens obtained from Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Weill Medical College of Cornell University and Krankenhaus Nordwest (Frankfurt, Germany). Total RNA from tumor tissues was prepared by the guanidinium thiocyanate method.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 67 -

The cDNA preparations used as templates in the RT-PCR reactions were prepared using the Superscript first strand synthesis kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). The cDNA was synthesized by incubating 5 µg of total RNA in 40 µl of 1X reverse transcriptase buffer containing 100 ng random hexamers, 0.5 mM dNTP, 5.0 mM MgCl₂, 10 µM DTT, 80 U ribonuclease inhibitor and 100 U Superscript II reverse transcriptase at 42°C for 50 min. Control templates for assessing amplification of genomic DNA were prepared as duplicate samples lacking reverse transcriptase.

Oligonucleotide primers, homologous to ESTs present in selected Unigene clusters, were synthesized commercially (Invitrogen Life Technologies). DNA sequences of relevant primer pairs are provided below.

CT15 forward: 5' AGGAATTATGAAACCACTTG (SEQ ID NO:1)
 CT15 reverse: 5' GACAACAGTTGTATCAGACC (SEQ ID NO:2)
 CT16 forward: 5' CAAGGAGAGGTCGTCTCTCG (SEQ ID NO:3)
 CT16 reverse: 5' GGATCTTGTACATGCTCACTCATATC (SEQ ID NO:4)
 CT16.2 forward: 5' CCAGATTAAGAATAACGTTTC (SEQ ID NO:5)
 CT16.2 reverse: 5' AGAGGAAATGACCAAGAGTC (SEQ ID NO:6)
 CT17 forward: 5' ACAAGACTAGCTTATGTGTGG (SEQ ID NO:7)
 CT17 reverse: 5' TTGAGCAAGAATCTTGACTTC (SEQ ID NO:8)

RT-PCR was performed as follows. Twenty-five µl PCR reaction mixtures, consisting of 2 µl cDNA (or 2.0 µl of genomic DNA amplification controls), 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 µM gene specific forward and reverse primers, and 2.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies), were heated to 94°C for 2 min., followed by 34 thermal cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 1 min., and a final cycle of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 and 72°C for 5 min. Thermal cycling was performed using an ABI 7700 Sequence Detector. Resultant PCR products were analyzed in 2% Agarose/Tris- Acetate-EDTA gels and their identity was verified by DNA sequencing.

Real-time quantitative reverse transcription(RT)-PCR

Total RNA samples from 8 different normal adult tissues and 8 tumor specimens were prepared and reverse transcribed into cDNA as described above. Gene-specific TaqMan

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 68 -

probes and PCR primers were designed using Primer Express software (PE Biosystems, Foster City CA) and synthesized commercially (PE Biosystems). DNA sequences of relevant taqman primer pairs and probes are provided below.

- 5 CT15taqman forward: 5' GGGAGTATTGACAGTGGCAATTT (SEQ ID NO:9)
CT15taqman reverse: 5' TGTCTCAATGTAGCGCCTTTC (SEQ ID NO:10)
CT15taqman probe: 5' CCACCTGTAGCTATACCAGCCAGACTCCC (SEQ ID NO:11)
CT16taqman forward: 5' GCAGAGTCCCCTCCCTGAC (SEQ ID NO:12)
CT16taqman reverse: 5' ACAGGAACTGGCTCTGCTTAAGA (SEQ ID NO:13)
 - 10 CT16taqman probe: 5' TCAGGACCATCTCCAGGTGCATCCTC (SEQ ID NO:14)
CT17taqman forward: 5' CCAGAGTCTCATGTTAAATCACTTACA (SEQ ID NO:15)
CT17taqman reverse: 5' GAAACACTTCCTCTTTCTTTAAGTACAA (SEQ ID NO:16)
CT17taqman probe: 5' ACCCAGAAAGACCACCACTTTGCAGGTA (SEQ ID NO:17)
- 15 Multiplex PCR reactions were prepared using 2.0 μ l of cDNA (or 2.0 μ l of genomic DNA amplification controls), diluted in TaqMan Universal PCR Master Mix supplemented with 200 nM Fam (6-carboxy-fluorescein) labeled gene-specific TaqMan probe, 300-900 nM gene specific forward and reverse primers (predetermined optimum concentration), and Vic labeled human beta glucuronidase, or phosphoglycerol kinase endogenous control
- 20 probe/primer mixtures (proprietary dye, PE Biosystems). Six 25 μ l PCR reactions were prepared for each cDNA sample (3 per each endogenous control). PCR consisted of 40 cycles of 95°C denaturation (15 seconds) and 60°C annealing/extension (60 seconds). Thermal cycling and fluorescent monitoring were performed using an ABI 7700 sequence analyzer (PE Biosystems). The cycle interval at which a PCR product is first detected above a
- 25 fixed threshold, termed cycle threshold (Ct), was determined for each sample, and the average of triplicate samples was recorded. The copy number of gene-specific transcripts per μ g of RNA starting material was determined by comparison with a standard curve of Ct values generated from known concentrations of cDNA encoding the homologous gene product. To normalize the quantity of mRNA present in the total RNA samples, the Ct values
- 30 obtained from the endogenous control were subtracted from the gene specific Ct values (Δ Ct = Ct FAM – Ct VIC). Real-time RT-PCR of triplicate samples yielded two sets of three Δ Ct values per each RNA sample (1 set per each endogenous control), and the mean of the six

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 69 -

ΔCt values was calculated. The concentration of gene specific mRNA in normal or tumor-derived tissue, relative to normal testis was calculated by equating the normalized Ct values ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ of normal or tumor tissue - ΔCt of normal testis), and determining the relative concentration (Relative Concentration = $2^{-\Delta\Delta Ct}$). The transcript copy number per μg of
5 normalized total RNA was calculated by multiplying the mean relative concentration for each cDNA sample by the copy number in testicular tissue, which was determined from the standard curve (copy number = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ x copy number testis).

Results

10 Bioinformatic Analyses

1325 different Unigene clusters with *in silico* expression profiles resembling CT antigens were identified by mining the Unigene database for gene clusters containing expressed sequence tags (ESTs) derived exclusively from both tumor tissue and normal testis cDNA libraries. These cancer/testis-associated Unigene clusters represented 61 known genes
15 and 1264 uncharacterized genes. As shown in Table 2, the Unigene clusters were placed into 2 categories. Group I consisted of 859 different gene clusters containing ESTs derived exclusively from testis and tumor cDNA libraries, termed *cancer/testis (CT)-related* Unigene clusters. Group II consisted of 400 different gene clusters containing ESTs derived exclusively from testis and germ cell tumors (but not other types of cancer), termed *testis-*
20 *related* Unigene clusters. An additional 66 gene clusters were not pursued further since their respective Unigene database entries were modified during the course of this study, or literature reports of known gene products indicated they were expressed in other normal tissues, in addition to testis. In accordance with the Unigene database, the present study designates specific gene clusters as Homo sapiens.numerical description (e.g. Hs.123456).

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 70 -

Table 2. *In Silico* classification of cancer/testis-associated Unigene clusters

Category of Unigene Cluster	Category Description	Sub-Category	Sub-Category Description	Number of Unigene Clusters in Each Sub-Category
Group I	Cancer/Testis-related Unigene Clusters: contain ESTs only from testis (or germ cell tumors) and tumor derived cDNA libraries	IA	SAGE tags present only in tumor and/or cell line SAGE libraries	311
		IB	No reliable SAGE tags	265
		IC	SAGE tags present in normal tissue-derived SAGE libraries	283
Group II	Testis-related Unigene Clusters: contain ESTs only from testis and germ cell tumor cDNA libraries	IIA	SAGE tags present only in tumor and/or cell line SAGE libraries	139
		IIB	No reliable SAGE tags	171
		IIC	SAGE tags present in normal tissue-derived SAGE libraries	90

5 The mRNA expression patterns of Group I and Group II Unigene clusters were further analyzed by *in silico* serial analysis of gene expression (SAGE). As shown in Table 2, group I and II Unigene clusters were further subdivided into subgroups A, B, and C, based on the presence and tissue distribution of homologous SAGE tags. Subgroups IA and IIA have SAGE tags that are present only in tumor and/or cell line derived SAGE libraries.

10 Subgroups IB and IIB have no reliable SAGE tags. Subgroups IC and IIC have SAGE tags that are present in normal tissue SAGE libraries. Four known cancer testis antigens were identified among the 1325 Unigene clusters, including CT11p/Hs.293266 (Group IA), GAGE 4/Hs.183199 (Group IB), MAGEB1/Hs.73021 (Group IC), and SAGE/Hs.195292 (Group IIA).

15

Identification of tissue- restricted mRNA transcripts by RT-PCR

The mRNA expression patterns of 73 of the 1325 Unigene clusters identified in the current study were analyzed by RT-PCR using a panel of RNA samples derived from 20 normal tissues. Several criteria were used for choosing these particular cancer/testis-associated Unigene clusters for RT-PCR analysis. Since a large proportion of known CT antigens map to chromosome X, all cancer/testis-associated Unigene clusters mapping to chromosome X were tested (19 total). Also, since melanoma and sarcoma express a large number of CT antigens, 10 cancer/testis-associated Unigene clusters having ESTs derived

20

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 71 -

from melanoma or sarcoma libraries were tested. Those cancer/testis-associated Unigene clusters having functional significance in relation to cancer (e.g., transcription factors, adhesion molecules) were also tested (21 total). The remaining 23 Unigene clusters analyzed were chosen at random. In relation to cancer/testis-associated Unigene cluster sub-groupings, 59 *CT-related* Unigene clusters (38 from Group IA, 9 from Group IB, 12 from Group IC) and 14 *testis-related* Unigene clusters (6 from Group IIA, 7 from Group IIB and 1 from Group IIC) were analyzed by RT-PCR.

As shown in Fig. 1, ten of the 73 Unigene clusters analyzed by RT-PCR were considered differentially expressed, with transcripts detected in a limited number of normal tissues, i.e., mRNA expression detected in less than 7/20 normal tissues, and are listed in Table 3.

Table 3. Cancer/Testis (CT)-associated Unigene clusters identified by database mining having restricted expression profiles in normal tissues as determined by conventional RT-PCR

Unigene cluster	Category of CT-associated Unigene Cluster (Table 2)	Expression Profiles ¹	Gene Product Description
Hs.121554	IA	Testis only	An uncharacterized gene product with homology to members of the cystatin family of protease inhibitors
Hs.183009	IA	Testis and brain	Regulatory factor X, 4 (RFX4)
Hs.178062	IA	Testis only	An uncharacterized gene product with homology to phospholipase A1
Hs.245431	IB	Testis only	An uncharacterized gene product with homology to GAGE genes
Hs.177959	IC	Testis only	A disintegrin and metalloproteinase 2 (ADAM2/fertilin β)
Hs.97643	IC	Testis only	An uncharacterized gene product termed testis-specific protein TSP-NY
Hs.128836	IC	Testis, ovary, lung, cervix,	An uncharacterized gene product with no protein motifs or similarities
Hs.195932	IIA	Testis only ²	An uncharacterized gene product termed testis transcript Y 12 (TTY12)
Hs.293317	IIA	Testis, prostate, ovary, lung, colon, breast	An uncharacterized gene product with homology to GAGE genes
Hs.189184	IIA	Testis only	Ubiquitin 3 (Ubqln 3)

¹Normal tissue RNA panel included brain, testis, kidney, liver, pancreas, placenta, small intestine, heart, prostate, adrenal gland, spleen, fetal brain, colon, stomach, lung, bladder, ovary, breast, cervix and skeletal muscle

²Gene maps to chromosome Y. For this reason, RNA samples derived solely from female donors (kidney, colon, bladder, placenta, ovary, breast, cervix) are not applicable.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 72 -

The mRNA expression patterns of the remaining 63 gene products were ubiquitously expressed in normal tissues (43 Unigene gene clusters), or yielded ambiguous RT-PCR results resulting from amplification of intronless DNA (8 Unigene gene clusters), non-specific amplification (4 Unigene gene clusters), or could not be amplified (8 Unigene gene clusters). Of the 10 differentially expressed transcripts identified, 7 were expressed only in testis (0/19 other normal tissue), and 3 other gene products were detected in a limited number of normal tissues besides testis and ovary (Fig. 1A). Of the 7 testis-restricted transcripts, 2 encode known proteins, Ubiquilin 3 (Ubqln 3, Hs.189184, Group IIA) and disintegrin and metalloproteinase 2 or fertilin β (ADAM2, Hs.177959, Group IC) and 5 encode uncharacterized gene products, Hs.121554 (Group IA), Hs.178062 (Group IA), Hs.245431 (Group IB), Hs.97643 (Group IC) and Hs.195932 (Group IIA). With regard to the presence of SAGE tags corresponding to known gene product ADAM2/ Hs.177959 in normal colon tissue (Group IC), our RT-PCR expression data provides no evidence for ADAM2/ Hs.177959 expression in normal colon (Fig. 1A). In addition to the 7 testis-restricted transcripts, 3 other Unigene clusters were expressed in a limited number of normal tissues. Transcripts encoding Regulatory factor X4 (RFX4, Hs.183009, Group IA) were detected only in testis and brain (0/18 other normal tissues). Two uncharacterized transcripts, Hs.128836 (Group IC) and Hs.293317 (IIA) were expressed in testis, ovary, cervix and lung (0/16 other normal tissues) and testis, prostate, ovary, lung, breast and colon (0/14 other normal tissues), respectively.

Expression of CT-associated Unigene clusters in cancer

All seven of the testis-restricted transcripts can be considered CT gene products based on the presence of identical sequences in tumor derived EST libraries (Group I Unigene clusters) or SAGE libraries (Group IIA Unigene clusters). To confirm this *in silico* expression profile, the tissue restricted transcripts defined in the current study were analyzed by RT-PCR using a panel of RNA samples derived from a variety of malignant tissues. As shown in Fig. 1B, 3 of the 7 testis-restricted transcripts, ADAM2/Hs.177959, Hs.245431, and Hs.178062 were also expressed in tumor tissue, and represent newly defined CT genes. These CT gene products represent 1 known gene product and 2 uncharacterized transcripts. The known protein, ADAM2/Hs.177959, was expressed exclusively in testis and in 2/16 cases of renal cancer (Tables 3 and 4).

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 73 -

Table 4. Conventional RT-PCR analysis of mRNA expression frequencies of newly defined Cancer/Testis (CT) genes in normal and malignant tissues

Tissues	CT genes		
	Hs.177959/ CT15 (ADAM2)	Hs.245431/ CT16	Hs.178062/ CT17
Normal Tissues	Testis only	Testis only	Testis only
Melanoma	0/18	4/18	0/18
Lung Cancer	0/18	7/18	0/18
Colon Cancer	0/9	1/9	0/9
Breast Cancer	0/18	1/18	1/18
Renal Cancer	2/16	7/16	4/16
Ovarian Cancer	0/4	0/4	0/4
Melanoma Cell lines ²	0/8	4/8	0/8
Other Tumor Cell lines ³	0/4	SW1045, LU-17	0/4

5

¹Normal tissue RNA panel included brain, testis, kidney, liver, pancreas, placenta, small intestine, heart, prostate, adrenal gland, spleen, fetal brain, colon, stomach, lung, bladder, ovary, breast, cervix and skeletal muscle

²Melanoma cell lines included SK-MEL-28, -23, -19, -109, -37, -10, -30, and -139

10 ³Additional tumor cell lines tested include SK-LU-14 and SK-LU-17 lung cancer cells, and SW1045 and Fuji sarcoma cells

In accordance with proposed nomenclature for CT antigens (21), ADAM2 was given the CT designation CT15. ADAM2/CT15 is a member of the metalloproteinase-like, disintegrin-like cysteine-rich domain family of sperm surface proteins involved in egg/sperm interactions (51). The nucleotide and amino acid sequences for CT15/Hs.177959 are set forth as SEQ ID NOs:18 and 19.

Another of the CT gene products identified in the current study, designated CT16, is an uncharacterized transcript represented by the Hs.245431 Unigene cluster. CT16/Hs.245431 was expressed in 4/18 melanomas, 7/18 lung cancers 1/18 breast cancers, 1/9 colon cancers and 7/16 renal cancers (Tables 3 and 4). It was also expressed in several tumor cell lines, including SK-LU-17 lung cancer, SW1045 sarcoma, and 4/8 melanoma cell lines (SK-MEL-19, -109, -37, and -10), but not in normal melanocytes. The CT16/Hs.245431 cDNA sequence consists of 763 nucleotides (Genbank Acc# BC009230), containing a complete open reading frame, which encodes a putative full-length protein of 110 amino acids. The predicted CT16/Hs.245431 amino acid sequence is 30%-40% identical to members of the CT antigen family, GAGE-A (15), and 40%-50% identical to the

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 74 -

GAGE-B/PAGE-1 (52). The nucleotide and amino acid sequences of Hs.245431 are presented as SEQ ID Nos:20 and 21, respectively.

The third newly defined CT gene product, designated CT17, represents the Hs.178062 Unigene cluster, and was expressed in 1/18 breast cancers and 4/16 renal cancers (Tables 3 and 4). The CT17/Hs.178062 cDNA sequence is composed of 877 nucleotides (SEQ ID NO:22; Genbank accession # AA470035), encoding a partial protein of 202 amino acids (SEQ ID NO:23), which is 30% identical to phosphatidylserine-specific phospholipase A1 (53).

Expression of the remaining 4 testis-restricted gene products, TSPNY/Hs.97643 (SEQ ID NOs:24 and 25), TTY12/Hs.195932 (SEQ ID Nos: 26 and 27), Ubqln 3/Hs.189184 (SEQ ID Nos:28 and 29) and Hs.121554 (SEQ ID Nos:30 and 31) (Table 2), was not detected in tumor tissue.

Three gene products defined in the current study as being expressed in a limited number of normal tissues were also expressed in tumor tissue (Table 5).

Table 5. Conventional RT-PCR analysis of mRNA expression frequencies of differentially expressed, non-CT genes in normal and malignant tissues

Tissues	Differentially Expressed Non-CT genes		
	Hs.183009 (RFX4)	Hs.128836	Hs.293317 (CT16.2)
Normal Tissues ¹	Testis, Brain	Testis, Ovary, Lung, Cervix	Testis, Ovary, Lung, Colon, Breast, Prostate
Melanoma	0/18	0/18	9/18
Lung Cancer	0/18	7/18	14/18
Colon Cancer	1/9	1/9	3/9
Breast Cancer	0/18	2/18	6/18
Renal Cancer	0/16	2/16	14/16
Ovarian Cancer	0/4	2/4	2/4
Melanoma Cell lines ²	4/8	0/8	0/8
Other Tumor Cell lines ³	0/4	LU-14	SW1045, LU-17

¹Normal tissue RNA panel included brain, testis, kidney, liver, pancreas, placenta, small intestine, heart, prostate, adrenal gland, spleen, fetal brain, colon, stomach, lung, bladder, ovary, breast, cervix and skeletal muscle

²Melanoma cell lines included SK-MEL-28, -23, -19, -109, -37, -10, -30, and -139

³Additional tumor cell lines tested include SK-LU-14 and SK-LU-17 lung cancer cells, and SW1045 and Fuji sarcoma cells

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 75 -

The known gene, Regulatory factor X 4 (RFX4, Hs.183009), was expressed exclusively in testis and brain, and also in 1/9 colon cancers, and 4/8 melanoma cell lines (SK-MEL-19, -37, -10, and -30), but not in normal melanocytes (Tables 3 and 5). RFX4/Hs.183009 (SEQ ID NOs:32 and 33) is presented in the Unigene database as a translocation product in breast cancer involving the ubiquitously expressed estrogen receptor 1 gene located on chromosome 6 and a novel, RFX-like gene (RFX-4) on chromosome 12 (54).

A second differentially expressed transcript, represented by the Hs.128836 Unigene cluster, was expressed in normal testis, ovary, cervix and lung, and also in 7/18 lung cancers, 2/4 ovarian cancers, 2/18 breast cancers, 1/9 colon cancers and 2/16 renal cancers (Tables 3 and 5). The cDNA sequence of Hs.128836 is composed of 558 nucleotides (SEQ ID NO:34) encoding a putative partial protein of 164 amino acids (SEQ ID NO:35) with no similarity to characterized proteins or known protein motifs.

A third differentially expressed transcript, represented by the Hs.293317 Unigene cluster, was expressed in normal testis, ovary, lung, breast, prostate and colon, and also in 9/18 melanomas, 14/18 lung cancers, 6/18 breast cancers, 14/16 renal cancers, 2/4 ovarian cancers, and 3/9 colon cancers (Tables 3 and 5). Transcripts were also detected in 2 tumor cell lines, SW1045 sarcoma and SK-LU-17 lung cancer, but not in 8 melanoma cell lines, although it was expressed in normal melanocytes. Hs.293317 is a novel cDNA sequence, composed of 549 nucleotides (GenBank # AW002915) having a complete open reading frame encoding a putative full length protein of 110 amino acids that is 89% identical to the newly defined CT gene, CT16/Hs.245431 described above. Based on the similarity with CT16/Hs.245431, Hs.293317 has been designated CT16.2. The contig for the gene identified by Unigene cluster Hs.293317 is presented as SEQ ID NO:36. The polypeptide translation of the contig is presented as SEQ ID NO:37.

Quantitative analysis of Cancer/Testis gene expression

To further investigate the mRNA expression profiles of CT15, CT16 and CT17, quantitative real time RT-PCR was performed using an RNA panel derived from various normal tissues and tumor specimens. For comparison, prototype CT antigens, NY-ESO-1 (18) and MAGE-3 (55), were also analyzed in this manner. The normalized level of CT gene

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 76 -

expression in normal tissues and cancer, relative to their expression level in testis, is given in Table 6.

Table 6. Quantitative analysis of mRNA encoding Cancer/Testis gene products in normal and malignant tissues relative to testis

Tissue	Expression Level of mRNA Transcripts Encoding CT Gene Products in Various Tissues Relative to mRNA in Normal Testis				
	CT15/ ADAM2	CT16/ Hs.245431	CT17/ Hs.178062	NY-ESO-1	MAGE-3
Brain	0	0	0	3%	0
Kidney	0	0.1%	0	0	0
Liver	0	0.4%	0	0	0
Pancreas	1.0%	0	0	0	0
Colon	0	0	0	2%	0
Lung	0	0	0	3%	0
Ovary	0	0	0	52%	0
Tumor #1 ¹	2%	310%	289%	14%	8%
Tumor #2	0.8%	6400%	19%	19%	11%
Tumor #3	0.07%	320%	0	6%	30%

¹ Expression CT15/ADAM2 was analyzed in 3 renal cancer specimens (Tumor #1, RCC1; tumor #2, RCC5; tumor #3, RCC6). Expression of CT16 was analyzed in 2 melanoma specimens (tumor #1, Mel-1; tumor #2 Mel-11) and a breast cancer specimen (tumor #3, HBR-297). Expression of CT17 was analyzed in a breast cancer (tumor #1, HBR-297), renal cancer (tumor #2, RCC5) and a melanoma specimen (tumor #3, Mel-1). Expression of NY-ESO-1 was analyzed in two lung cancer specimens (tumor #1, LU356; tumor #2, LU339) and a renal cancer specimen (tumor #3, RCC1). Expression of MAGE-3 was analyzed in two lung cancer specimens (tumor #1, Mel-1; tumor #2, Mel-11) and a lung cancer specimen (tumor #3, LU356).

Overall, real time RT-PCR analyses revealed either no expression, or considerably lower levels (3% or less) of CT gene transcripts in normal, non-gametogenic tissues compared with normal testis. In normal tissues, CT15 expression was detected in pancreas at 1% of the level detected in testis. In the case of CT16 mRNA expression in normal tissues, transcripts were detected only in kidney and liver, at 0.1% and 0.4% of the level detected in testis, respectively. Expression of both CT17 and MAGE-3 mRNA was restricted to testis. In the case of NY-ESO-1, the expression level in normal brain, colon and lung was 3%, 2% and 3%, respectively, of the level detected in testis. NY-ESO-1 was also detected in normal ovary at 52% of the level detected in testis. The copy number of CT transcripts per μ g of total RNA was also calculated based on these relative expression levels (Table 6) and a comparison with a standard curve of homologous cDNA of known copy number. The expression level of CT genes in testis showed wide variation, with CT15 having the highest

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 77 -

copy number (445,000 copies/ μ g RNA), followed by CT16 (149,000 copies/ μ g RNA), NY-ESO-1 (31,300 copies/ μ g RNA), CT17 (16,100 copies/ μ g RNA) and MAGE-3 (15,060 copies/ μ g RNA).

The expression level of CT genes in tumor tissue was also analyzed by quantitative real time RT-PCR. In renal cancer specimens, RCC1, RCC5 and RCC6, the expression level of CT15 was 2%, 0.07% and 0.8% of the level detected in testis (Table 6), respectively. Both the RCC1 and RCC6 tumors were positive for CT15 expression by conventional RT-PCR, while RCC5 was negative (Fig. 1B). As shown in Table 6, the level of CT16 expression in two melanoma samples was 3.1 and 64 times the level, respectively. In a breast cancer specimen, the level of CT16 expression was 3.2 times the level detected in testis. These two melanoma samples, and the breast cancer sample, were positive for CT16 expression when analyzed by conventional RT-PCR (Fig. 1B). In a breast cancer specimen (HBR297) and renal cancer specimen (RCC5), the level of CT17 expression was 2.89 and 0.19 times the level detected in testis (Table 6), respectively, which is consistent with conventional RT-PCR results. The level of NY-ESO-1 expression in two lung cancer specimens was 14% and 19% of the level detected in testis (Table 6), respectively. In a renal cancer specimen, NY-ESO-1 was expressed at a level that was 6% of the level detected in testis. Finally, MAGE-3 expression in two melanoma specimens and a lung cancer specimen was 8%, 11% and 30% of the level detected in testis, respectively.

Discussion

Expressed sequence tag (EST) databases are a repository of the human transcriptome, containing a wealth of nucleic acid sequence information and mRNA expression data. An extension of the EST database is Unigene, which pools information from public domain sequencing projects, including, EST, Genbank, ORESTES, and human genome projects, and links this information to a number of relevant databases, e.g., those dedicated to scientific literature, the human genome, the proteome, single nucleotide polymorphisms, and gene mutations. In conjunction with the Cancer Genome Anatomy Project, the Unigene database also provides tools for analyzing EST data, including *in silico* serial analysis of gene expression (SAGE), gene expression profiling, and digital differential display. In view of the immunotherapeutic importance of CT antigens, i.e., that they represent promising target

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 78 -

molecules for antigen-specific cancer vaccines, the current study mined the Unigene database for gene clusters containing ESTs derived exclusively from cancer and testis cDNA libraries.

The current bioinformatic analysis identified approximately 1300 different cancer/testis-associated Unigene clusters. Preliminary evidence in support of the approach used to search the Unigene database was provided by the presence of four known CT antigens, CT11p, GAGE 4, MAGEB1, and SAGE, among these 1300 cancer/testis-associated Unigene clusters identified in the current study. Conversely, this bioinformatic analysis failed to identify members of 9 other previously identified CT gene families cited in the literature. The reason for this is that the database search tool (X profiler) used in the current study does not cross-reference more than two groups of cDNA libraries. Unigene clusters corresponding to the CT antigens not identified in the present study contain ESTs derived from cDNA libraries outside of the two cross-referenced pools (normal testis and cancer). For example, NY-ESO-1, SSX-2/HOM-MEL-40, and CT-7 Unigene clusters contain ESTs from placenta; BAGE, SCP-1, and CT-10 Unigene clusters contain ESTs from cell lines; the BRDT/CT9 Unigene cluster contains an EST from a subtracted testis library; and the sp32/OY-TES-1 Unigene cluster contains ESTs from normal retina and fetal heart. Also, the CTAGE-1 Unigene cluster contains only normal testis ESTs, but not tumor-derived ESTs.

The mRNA expression patterns of 73 of these cancer/testis-associated Unigene clusters were examined by RT-PCR using a panel of RNA samples derived from various normal and malignant tissues. Three of the 73 gene products, CT15/Hs.177959, CT16/Hs.245431, and CT17/Hs.178062, were shown by conventional RT-PCR to be expressed exclusively in testis and malignant tissues, and therefore have expression profiles analogous to CT antigens. Other similarities exist between the newly defined CT genes and known CT antigens. Two of the identified CT genes, CT16/Hs.245431 and CT17/Hs.178062, represent Unigene clusters that contain ESTs from testis, as well as melanoma and sarcoma cDNA libraries, respectively. These two tumor types are known to express a large proportion of the known CT antigens (56). Also, CT16/Hs.245431 maps to chromosome X, the site in the genome where 8 of the 14 known CT antigens map. Furthermore, the frequency of mRNA expression of the newly defined CT genes in cancer is consistent with those of previously defined CT antigens (20% - 40% of a given tumor type, ref. 21), ranging from 11% - 44% in the case of CT16 expression in colon cancer and renal cancer, respectively, and 5% - 25% in the case of CT17 expression in breast cancer and renal

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 79 -

cancer, respectively. Conversely, the apparent restricted nature of CT15/ADAM2 expression in normal testis and renal cancer is unique among CT genes. However, a relatively small sample size was examined in the current study, and a much broader mRNA expression may provide a more definitive conclusion regarding their expression frequencies in cancer.

5 With the exception of a proacrosin binding protein, OY-TES-1 (30), and synaptonemal complex protein-1 (20), the biological functions of CT antigens are not known. In the current study, two of the identified CT gene products encode proteins with known functions or functional motifs. ADAM2/CT15/Hs.177959, is a member of the metalloproteinase-like, disintegrin-like cysteine-rich domain family of cell surface
10 proteases/adhesion molecules, and is believed to be involved egg /sperm membrane interactions (51). Although ADAM2/CT15 lacks a functional metalloproteinase domain it does contain a disintegrin domain, which may bind to integrin $\alpha_6\beta_1$, or other similar molecules (57). Another CT gene product, CT17/Hs.178062 has similarity with phospholipases, which during fertilization play a role in sperm acrosomal exocytosis (58).

15 The remaining CT gene, CT16/Hs.245431, and its relative CT16.2/Hs.293317, are 30-50% similar to GAGE proteins (15, 52). Based on the similarities among the GAGE A family (90% or greater amino acid identity), and between the GAGE-A and GAGE-B families (40 – 50% amino acid identity), it was concluded that Hs.245431/CT16 represents a member of a new GAGE gene family, tentatively termed the CT16 family, which also includes the tissue-
20 restricted gene product, CT16.2/Hs.293317. The biological functions of GAGE proteins are not known, and few immunological responses to GAGE proteins have been reported. With the exception of GAGE-A1 and CT16, the majority of GAGE genes, including CT16.2, are expressed in a narrow range of normal adult tissues (59). Given the similarity among members of individual GAGE gene families, it is possible that the lack of an immune
25 response to GAGE proteins reflects tolerance to highly similar, and more universally expressed GAGE genes.

In addition to CT genes, the current study also identified three highly tissue restricted gene products, RFX4/Hs.183009, Hs.128836, and Hs.293317, which are also expressed in cancer. RFX4 was expressed only in normal testis and brain, as well as in 1/9 colon cancers
30 and 4/8 melanoma cell lines. RFX4 can therefore be considered a putative member of a group of proteins, termed cancer/testis/brain antigens (CTB antigens). Other CTB antigens include CDR (60), Ma1(61), and Ma2 (62), which were identified by Posner and colleagues

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 80 -

as the target molecules recognized by autoantibodies in patients with paraneoplastic syndromes. RFX4 belongs to a family of DNA binding proteins that regulate transcription of MHC class II genes (63). Defects in genes encoding RFX proteins, such as RFXANK, RFX5 and RFXAP, lead to the development of Bare Lymphocyte Syndrome, a severe autosomal recessive immunodeficiency disease (reviewed in 64). Given the down-regulated expression of MHC genes in testis, brain and cancer, expression of RFX genes in these tissues may be of significance. Two uncharacterized transcripts, Hs.128836 and Hs.293317, also had mRNA expression profiles restricted to a limited number of normal tissues and cancer. Due to a lack of functional domains, the biological significance of these gene products remains to be determined.

In addition to the 3 CT genes and 3 tissue restricted transcripts, 4 other gene products having testis-restricted expression profiles were identified, including Hs.121554, Hs.97643, Hs.195932, and Hs.189184. Unigene clusters corresponding to these 4 testis restricted gene products also contain ESTs and/or SAGE tags derived from tumor tissue.

Continued expression analysis of these gene products, using enlarged panels of RNA derived from a wider variety of malignant tissues, may lead to their detection in tumor tissue and subsequent classification as CT genes. With regard to the remaining 1200 cancer/testis-associated Unigene clusters which were not examined by RT-PCR, further study will focus on those gene products having *in silico* expression profiles corresponding to *CT-related* (Group I) Unigene clusters and *testis-related* Unigene clusters with SAGE tags derived from tumor tissues (Group IIA). A method described by Loging and colleagues for rapid expression screening by real-time RT-PCR should advance these studies (65).

The use of individual CT gene products as target molecules for generic cancer vaccines may be inadequate based on their relatively low expression frequencies among cancer patient populations, heterogeneous expression within the tumor itself and antigen loss by a given tumor. An alternative is the development of polyvalent cancer vaccine containing epitopes encoded by many different CT genes. Such polyvalent vaccines would be an effective way to increase the number of cancer patients eligible for vaccination and may also overcome some of the obstacles associated with tumor heterogeneity and immune escape. To this end, the current study added CT15, CT16 and CT17 to the repertoire of proteins available for polyvalent CT cancer vaccines. Furthermore, ADAM2/CT15 can be considered a target molecule with dual immunotherapeutic value, since its cell surface localization makes it a

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 81 -

potential target for monoclonal antibody based immunotherapies as well. In conclusion, the Unigene database contains a wealth of information, that when tapped into, can lead to the discovery of new cancer-related genes of therapeutic significance.

5 **Example 3: Identification of an additional CT gene product and related genes**

A search of the Unigene database for ESTs with similarity to the CT antigen CT16, identified as described above, yielded two Unigene clusters, Hs.43879 and Hs.16323. These clusters were designated (for reasons described below) CT19.2 (nucleic acid: SEQ ID NO:38; polypeptide: SEQ ID NO:39) and CT19.3 (nucleic acid: SEQ ID NO:40; polypeptide: SEQ ID NO:41), respectively. Using specific primers for the sequences (CT19.2 primers: SEQ ID NOs:42 and 43; CT19.3 primers: SEQ ID NOs:44 and 45), it was determined by RT-PCR analysis that both Hs.43879/CT19.2 and Hs.16323/CT19.3 were expressed in a limited number of normal tissues, in addition to cancer and testis.

To determine if other family members existed, the Human Genome database was searched for homologous genes using sequences within the Hs.43879/CT19.2 Unigene cluster. This search yielded a hypothetical transcript on chromosome X (located within bp 179682 to 182918 of ref[NT_025297.5]HsX_25453 Homo sapiens chromosome X working draft sequence segment). This sequence, designated CT19.1 (nucleic acid: SEQ ID NO:46; polypeptide: SEQ ID NO:47), was determined to be 90% and 84% identical to Hs.43879/CT19.2 and Hs.16323/CT19.3, respectively, and to have the same intron/exon structure as Hs.43879/CT19.2 and Hs.16323/CT19.3.

Primers were designed to the most unique region of CT19.1. The CT19.1 primers (see below, SEQ ID NO:58 and 59) and do not amplify Hs.43879/CT19.2 or Hs.16323/CT19.3 sequences. Expression of a CT19.1 transcript was detected in fetal brain, testis, and a variety of tumors (hence its designation as a CT antigen, CT19.1, see below). In some cases, two bands were detected by RT-PCR, with the resultant low molecular weight band detected consistently, while the higher molecular weight band was detected more sporadically. Both bands were sequenced, and only the low molecular weight band (SEQ ID NO:46) gave a predicted protein product (SEQ ID NO:47) similar to Hs.43879/CT19.2 and Hs.16323/CT19.3, while the higher molecular weight band yielded a translated protein which was truncated (there is a stop codon in the additional sequence). Thus, the low molecular weight band is the CT19.1 sequence.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 82 -

Expression analysis

The mRNA expression profiles of CT19.1, CT19.2 and CT19.3 were determined in normal and malignant tissues using the gene-specific primers identified below in 35 cycles of

5 RT-PCR (as described in Example 2). The results are presented in Table 7, below.

CT19.1 primers:

GEF1: ACCAAGGAGAAGCGTACCAC (SEQ ID NO:58)

GER2: GGGACCATCTCTGCATTCATC (SEQ ID NO:59)

10

Hs.43879/CT19.2 primers

GDF: AGGCCGAGGAGAAGTGTACC (SEQ ID NO:42)

GDR: AACCTGTGGTTGCCTGTCAC (SEQ ID NO:43)

15 Hs.16323/CT19.3 primers

GD2F: AGCCGTCTGGACTCTTTCTC (SEQ ID NO:44)

GD2R: TGATTCCCTTCACCTGCTTC (SEQ ID NO:45)

20 Table 7. RT-PCR analysis of mRNA expression frequencies of newly defined CT19 genes in normal and malignant tissues

Tissues	CT19 genes		
	CT19.1	Hs.43879/ CT19.2	Hs.16323/ CT19.3
Normal Tissues ¹	Testis, fetal brain only	Testis, placenta, prostate, lung, breast	Testis, ovary, placenta, prostate, lung, cervix
Melanoma	1/14		
Lung Cancer	2/22	3/18	11/18
Colon Cancer	2/9		2/9
Renal Cancer	1/11	1/11	2/11

¹Normal tissue RNA panel included brain, testis, kidney, liver, pancreas, placenta, small intestine, heart, prostate, adrenal gland, spleen, fetal brain, colon, stomach, lung, bladder, 25 ovary, breast, cervix and skeletal muscle

Protein Alignments

The alignment of CT19.2 with the GAGE-A1 protein sequence (SEQ ID NO:57) is shown below. Vertical lines indicate amino acid identity between these sequences.

30

PCT/US02/09808

5

GAGE A1	MSWGSRSTYRPPRRPVYVPEMIGMPRPSPQSDVEVEPATPSEEGEATQRQDPAALAAQGE-
CT19.2	MWGSRSTYRPPRRKSPVPELIGPML--HPGDSEPPQ--BEPPTE-SR-DPAFQGEREE
GAGE A1	DEGASAGQGPKEPRAHSQEGHQHPQTGCCECDGPDGQEMDPNPSEVKTPSEBGEKQSQC
CT19.2	DQGAETQVPDLGADQLQSLSKSTGSGCGNDPGDKGLKPSQSPQKPEGGDRQRPV

10 CT19.1 MIWVRSTYRPRRSVFPPELIGLPMPLEDEEPQKEPPTSRDPTP-----
CT19.2 MIWGRSTYRPRRSVFPPELIGLPMPLEDEEPQKEPPTSRDPAFGQERSEDQGAAR
15 CT19.3 MSWGRSTYRPRRSVLQPELIGAMLEPTEDEEPKEEKPPTKSRNPTPDQKREDQGAAR

CT19.1 --VPDLTDLQLSQSQTGDECRDGPDKGKILPKSEQFKMPEGG
20 CT19.2 TVPDLDLQLSQSQTGCGNGDDQDKGILPKSEQFKMPEGGRDQPV
CT19.3 IQPDLDLQLSQTGDCGCGTGVKGIILPKAEFKMPEAGSEKSGV

30 **Example 4: Identification of choriocarcinoma/tumor (ChT) gene products**

Briefly, two pools of Expressed Sequence Tags (ESTs) were established. Pool A consisted of all ESTs from 3 choriocarcinoma cDNA libraries and Pool B consisted of all ESTs from 3,289 tumor-derived cDNA libraries (of many histological types). The Xpro tool of CGAP was used to search the UniGene database for UniGene clusters containing ESTs from both Pool A and Pool B, and exclude clusters containing ESTs from normal tissue cDNA libraries.

This search yielded 49 Choriocarcinoma/Tumor (ChT)-related UniGene clusters, including four known gene products (three of which were CT antigens: LAGE, MAGE-A6, MAGE-A12) and 45 were novel. 31 of the 49 ChT-related Unigene clusters represented

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 84 -

intronless sequences (single exons, pseudogenes, genomic contaminants) and were not studied. The remaining 18 ChT-related Unigene clusters had definitive intron/exon boundaries and 15 (after excluding known CT antigen sequences) were analyzed by RT-PCR in a panel of normal and malignant tissues. Two of the ChT gene products, Hs.313507/CT 20 (SEQ ID NO:48) and Hs.197664 (SEQ ID NO:51), had interesting mRNA expression profiles as described below. In addition, the Hs.313507/CT 20 Unigene cluster had two types of transcripts, a testis cDNA sequence termed FLJ32909 and 11 tumor derived ESTs, with bp 770-961 of FLJ32909 missing from the tumor derived ESTs. These different transcripts, i.e., putative splice variants, encode two different protein products: isoform A (SEQ ID NO:49) is the product of the EST transcripts and isoform B (SEQ ID NO:50), is the product of the testis transcript. Hs.197664 encodes a single protein product (SEQ ID NO:52), which is 30% similar to NY-CO-41/methyl CpG binding protein 2.

Expression Analysis

RT-PCR was performed for 35 cycles as described above using the following primers. The results are presented in Table 8.

Hs.313507/CT 20 primers:

CCCT11F: TGGGACATCCATCAGATAAG (SEQ ID NO:53)

CCCT11R: TTTATGGCTGCATAGTATTC (SEQ ID NO:54)

Hs.197664 primers:

CCCT5F: GCTATGGGAGAACCTGCGTTC (SEQ ID NO:55)

CCCT5R: TCCCTGGCTTTCTTCACCTC (SEQ ID NO:56)

Table 8. RT-PCR analysis of mRNA expression frequencies in normal and malignant tissues

Tissues	Hs.313507/ CT20	Hs.197664
Normal Tissues ¹	Testis only	Testis, ovary, prostate only
Melanoma	5/14	2/13
Lung Cancer	6/22	
Colon Cancer	1/9	
Renal Cancer	2/11	2/11

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 85 -

¹Normal tissue RNA panel included brain, testis, kidney, liver, pancreas, placenta, small intestine, heart, prostate, adrenal gland, spleen, fetal brain, colon, stomach, lung, bladder, ovary, breast, cervix and skeletal muscle

5 **Example 5: Confirming the identity of the CT antigens**

The length of the sequences identified above can be extended, providing additional sequence regions with which to search for related sequences in the gene databases. Elongation of the sequences described above is done using standard methods, (e.g. PCR) to extend the DNA sequences beyond the regions currently known, particularly for those
10 sequences that encode an apparently incomplete protein. PCR-based amplification methods include 5'RACE, which allows the isolation of the missing 5' ends of the known, partial cDNAs. In addition, 3' RACE is also used to extend the missing 3' ends of the cDNAs. These additional end regions are sequenced, and the information used to screen the databases for matches and homologies.

15 Another method for lengthening the known sequences is through traditional library screening procedures, which allow isolation of longer sequences from libraries. Once extended sequences are identified, they are used to search the gene databases for sequence matches and the subsequent examination of expression patterns. The libraries used in the screening procedures are general libraries, or more tissue-specific or developmental stage-specific libraries.
20

Example 6: Preparation of recombinant CT antigens

CT antigens (e.g., CT15, CT16, CT17, CT19.1 and CT20) were expressed as his-tagged proteins in *E. coli* using histidine-tag-containing vector pQE30 (Qiagen, Valencia,
25 CA) as described in ref. 40. The induction of recombinant protein synthesis and subsequent purification by Ni²⁺ column were performed as described (Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:1004-1008, 1994).

In alternative methods, the clones encoding CT antigens are subcloned into a baculovirus expression vector, and the recombinant expression vectors are introduced into
30 appropriate insect cells. Baculovirus/insect cloning systems are preferred because post-translational modifications are carried out in the insect cells. Another preferred eukaryotic system is the *Drosophila* Expression System from Invitrogen. Clones which express high amounts of the recombinant protein are selected and used to produce the recombinant

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 86 -

proteins. Other systems, including yeast expression systems and mammalian cell culture systems also can be used.

Example 7: Preparation of antibodies to CT antigens

5 The recombinant CT antigens produced as in Example 6 above are used to generate polyclonal antisera and monoclonal antibodies according to standard procedures. The antisera and antibodies so produced are tested for correct recognition of the CT antigens by using the antisera/antibodies in assays of cell extracts of patients known to express the particular CT antigen (e.g. an ELISA assay). These antibodies can be used for experimental
10 purposes (e.g. localization of the CT antigens, immunoprecipitations, Western blots, etc.) as well as diagnostic purposes (e.g., testing extracts of tissue biopsies, testing for the presence of CT antigens).

The antibodies are useful for accurate and simple typing of cancer tissue samples for expression of the CT antigens.

15

Example 8: Expression of CT antigens in cancers of similar and different origin.

The expression of one or more of the CT antigens is tested in a range of tumor samples to determine which, if any, other malignancies should be diagnosed and/or treated by the methods described herein. Tumor cell lines and tumor samples are tested for CT antigen
20 expression, preferably by RT-PCR or real time PCR according to the procedures described above. Northern blots also are used to test the expression of the CT antigens. Antibody based assays, such as ELISA and western blot, also can be used to determine protein expression. A preferred method of testing expression of CT antigens (in other cancers and in additional same type cancer patients) is allogeneic serotyping using a modified SEREX
25 protocol.

In all of the foregoing, extracts from the tumors of patients who provided sera for the initial isolation of the CT antigens are used as positive controls. The cells containing recombinant expression vectors described in the Examples above also can be used as positive controls.

30

The results generated from the foregoing experiments provide panels of multiple cancer associated nucleic acids and/or polypeptides for use in diagnostic (e.g. determining the

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 87 -

existence of cancer, determining the prognosis of a patient undergoing therapy, etc.) and therapeutic methods (e.g., vaccine composition, etc.).

Example 9: HLA typing of patients positive for CT antigens

5 To determine which HLA molecules present peptides derived from the CT antigens of the invention, cells of the patients which express the CT antigens are HLA typed. Peripheral blood lymphocytes are taken from the patient and typed for HLA class I or class II, as well as for the particular subtype of class I or class II. Tumor biopsy samples also can be used for typing. HLA typing can be carried out by any of the standard methods in the art of clinical
10 immunology, such as by recognition by specific monoclonal antibodies, or by HLA allele-specific PCR (e.g. as described in WO97/31126).

Example 10: Characterization of CT antigen peptides presented by MHC class I and class II molecules.

15 Antigens which provoke an antibody response in a subject may also provoke a cell-mediated immune response. Cells process proteins into peptides for presentation on MHC class I or class II molecules on the cell surface for immune surveillance. Peptides presented by certain MHC/HLA molecules generally conform to motifs. These motifs are known in some cases, and can be used to screen the CT antigens for the presence of potential class I
20 and/or class II peptides. Summaries of class I and class II motifs have been published (e.g., Rammensee et al., *Immunogenetics* 41:178-228, 1995). Based on the results of experiments such as those described above, the HLA types which present the individual CT antigens are known. Motifs of peptides presented by these HLA molecules thus are preferentially searched.

25 One also can search for class I and class II motifs using computer algorithms. For example, computer programs for predicting potential CTL epitopes based on known class I motifs has been described (see, e.g., Parker et al., *J. Immunol.* 152:163, 1994; D'Amaro et al., *Human Immunol.* 43:13-18, 1995; Drijfhout et al., *Human Immunol.* 43:1-12, 1995). Computer programs for predicting potential T cell epitopes based on known class II motifs
30 has also been described (see, e.g. Sturmiolo et al., *Nat Biotechnol* 17(6):555-61, 1999). HLA binding predictions can conveniently be made using an algorithm available via the Internet on the National Institutes of Health World Wide Web site at URL <http://bimas.dcrf.nih.gov>. See

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 88 -

also the website of: SYFPEITHI: An Internet Database for MHC Ligands and Peptide Motifs (access via <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/> or <http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/EpPredict.htm>. Methods for determining HLA class II peptides and making substitutions thereto are also known (e.g. Strominger and Wucherpfennig (PCT/US96/03182)).

Example 11: Identification of the portion of a cancer associated polypeptide encoding an antigen

To determine if the CT antigens identified and isolated as described above can provoke a cytolytic T lymphocyte response, the following method is performed. CTL clones are generated by stimulating the peripheral blood lymphocytes (PBLs) of a patient with autologous normal cells transfected with one of the clones encoding a CT antigen polypeptide or with irradiated PBLs loaded with synthetic peptides corresponding to the putative protein and matching the consensus for the appropriate HLA class I molecule (as described above) to localize an antigenic peptide within the CT antigen clone (*see, e.g., Knuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3511-3515, 1984; van der Bruggen et al., *Eur. J. Immunol.* 24:3038-3043, 1994). These CTL clones are screened for specificity against COS cells transfected with the CT antigen clone and autologous HLA alleles as described by Brichard et al. (*Eur. J. Immunol.* 26:224-230, 1996). CTL recognition of a CT antigen is determined by measuring release of TNF from the cytolytic T lymphocyte or by ^{51}Cr release assay (Herin et al., *Int. J. Cancer* 39:390-396, 1987). If a CTL clone specifically recognizes a transfected COS cell, then shorter fragments of the CT antigen clone transfected in that COS cell are tested to identify the region of the gene that encodes the peptide. Fragments of the CT antigen clone are prepared by exonuclease III digestion or other standard molecular biology methods. Synthetic peptides are prepared to confirm the exact sequence of the antigen.

Optionally, shorter fragments of CT antigen cDNAs are generated by PCR. Shorter fragments are used to provoke TNF release or ^{51}Cr release as above.

Synthetic peptides corresponding to portions of the shortest fragment of the CT antigen clone which provokes TNF release are prepared. Progressively shorter peptides are synthesized to determine the optimal CT antigen tumor rejection antigen peptides for a given HLA molecule.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 89 -

A similar method is performed to determine if the CT antigen contains one or more HLA class II peptides recognized by T cells. One can search the sequence of the CT antigen polypeptides for HLA class II motifs as described above. In contrast to class I peptides, class II peptides are presented by a limited number of cell types. Thus for these experiments, dendritic cells or B cell clones which express HLA class II molecules preferably are used.

References

1. Boyse EA, Miyazawa M, Aoki T, Old LJ. Ly-A and Ly-B: two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse. *Proc Royal Soc Brit* 1968; 170: 175-193. (PMID:4385242)
2. Boyse EA, Old LJ. Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. *Ann Rev Genet* 1969; 3: 269-290.
3. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2420-2424. (PMID: 221923)
4. Lilly F, Boyse EA, Old LJ. Genetic basis of susceptibility to viral leukemogenesis. *Lancet* 1965; ii:1207-1209.
5. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore NC, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670. (PMID: 1103152)
6. Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ohta N, Old LJ, Boon T. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 1992; 35: 145-152. (PMID: 1537606)
7. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 90 -

- B, Knuth A, and Boon, T, A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643-1647. (PMID: 1840703)
- 5 8. Old LJ. Cancer immunology: The search for specificity. *Cancer Res* 1981; 41: 361-375. (PMID: 7004632)
9. Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, Old LJ. T cell-mediated cytotoxicity against malignant melanoma: Analysis with IL-2-dependent T cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3511-3515. (PMID: 6610177)
- 10
10. Sahin, U, Türeci Ö, Schmitt, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11810-11813. (PMID: 8524854)
- 15
11. Old LJ, Chen YT. New paths in human cancer serology. *J Exp Med* 1998; 187:1163-1167. (PMID: 9547328)
- 20
12. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethé B, Lurquin C, Brasseur R, Chomez P, De Backer O, Cavenee W, and Boon T. Structure, chromosomal localization and expression of twelve genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994; 40: 360-369. (PMID: 7927540)
- 25
13. Muscatelli F, Walker AP, De Plaen E, Stafford AN, Monaco AP. Isolation and characterization of a new MAGE gene family in the Xp21.3 region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4987-4991. (PMID: 7761436)
- 30
14. Boël P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P. BAGE, a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 1995; 2: 167-175. (PMID: 7895173)

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 91 -

15. Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995;182: 689-698. (PMID: 7544395)
16. De Backer O, Arden KC, Boretta M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancer and in normal testis. *Cancer Res* 1999; 59: 3157-65. (PMID: 10397259)
17. Güre AO, Türeci Ö, Sahin U, Tsang S, Scanlan MJ, Jager E, Knuth A, Pfreundschuh M, Old LJ, Chen YT. SSX, a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int. J. Cancer* 1997; 72: 965-971. (PMID: 9378559)
18. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci Ö, Güre AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1997; 94: 1914-1918. (PMID: 9050879)
19. Lethe B, Lucas S, Michaux L, De Smet C, Godelaine D, Serrano A, De Plaen E, Boon T. LAGE-1: a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer* 1998;76:903-908. (PMID: 9626360)
20. Türeci Ö, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a new member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5211-5216. (PMID: 9560255)
21. Chen YT, Güre AO, Tsang S, Stockert E, Jäger E, Knuth A, Old LJ. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6919-6923. (PMID: 9618514)

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 92 -

22. Lucas S, De Smet C, Arden KC, Viars CS, Lethe B, Lurquin C, Boon T. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* 1998; 58: 743-752. (PMID: 9485030)
- 5 23. Sahin U, Koslowski M., Türeci Ö, Eberle T, Zwick C, Romeike B, Moringlane JR, Schwechheimer K, Feiden W., Pfeundschuh M. Expression of cancer/testis genes in human brain tumors. *Clin Cancer Res* 2000;10: 3916-3922. (PMID: 11051238)
24. Scanlan MJ, Altorki NK, Güre AO, Williamson B, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene CT9. *Cancer Lett.* 2000; 150:155-164. (PMID: 10704737)
- 10 25. Güre AO, Stockert E, Arden KC, Boyer AD, Viars CS, Scanlan MJ, Old LJ, Chen YT. CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational difference analysis. *Int. J. Cancer* 2000; 85: 726-732. (PMID: 10699956)
- 15 26. Lucas S, De Plaen E, Boon T. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2 and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int. J. Cancer* 2000; 87 :55-60. (PMID: 10861452)
27. Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN. CTp11, a novel member of the family of human cancer/testis antigens. *Cancer Res.* 1999, 59: 6223-6239. (PMID: 10626816)
- 25 28. Martelange V, De Smet C, De Palen E, Lurquin C, Boon, T. Identification on a human sarcoma of two new genes with tumor-specific expression. *Cancer Res* 2000; 60: 3848-3855. (PMID: 10919659)
- 30 29. Eichmüller S, Usener D, Dummer R, Stein A, Thiel D, Schadendorf D. Serological detection of cutaneous T cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci*

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 93 -

USA 2001; 98: 629-634. (PMID: 11149944)

30. Ono T, Kurashige T, Harada N, Noguchi Y, Saika T, Niikawa N, Aoe M, Nakamura S, Higashi T, Hiraki A, Wada H, Kumon H, Old L, Nakayama E. Identification of
5 proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:3 282-3287. (PMID: 11248070)
31. Jungbluth A, Busam K, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, Spagnoli GC, Old LJ. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer*. 2000;
10 85 :460-5. (PMID: 10699915)
32. Jungbluth A, Busam K, Iversen, K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Zhang P, Old, LJ. Cancer-Testis (CT) antigens MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, and CT7 are expressed in female germ cells. *Mod Pathol*. In press 2001.
15
33. Jungbluth A, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Old LJ, Vogel M. Expression of CT (Cancer/Testis) antigens MAGE, NY-ESO-1, and CT7 in placenta. *German Soc for Pathol*. Submitted 2001.
- 20 34. Jungbluth A, Stockert E, Chen YT, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altorki N, Busam KJ, Old LJ. Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous expression pattern of MAGE-1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours. *British Journ Cancer* 2000; 83: 493-497. (PMID: 10945497)
- 25 35. Meuwissen RJL, Offenberg, HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heting C. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 1992;11: 5091-5100. (PMID: 1464329)
- 30 36. Baba T, Niida Y, Michikawa Y, Kashiwabara S, Kodaira K, Takenaka M, Kohno N, Gerton GL, Arai Y. An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *J Biochem* 1994; 269:10133-10140. (PMID: 8144514)

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 94 -

37. Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, Lethe B, Carrel S, Arienti F, Suter L, Vanwijck R, Bourlond A, Humblet Y, Vacca A, Conese M, Lahaye T, Degiovanni G, Deraemaecker R, Beauduin M, Sastre X, Salamon E, Dréno B, Jäger E, Knuth A, Chevreau C, Suci S, Lachapelle J-M, Pouillart P, Parmiani G, Lejeune F, Cerottini J-C, Boon T, Marchand M. Expression of MAGE gene in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1995; 63 :375-380. (PMID: 7591235)
38. Patard JJ, Brasseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, Francois P, Abi-Aad A, VanCangh P, Abbou CC, Chopin D, Boon T. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer* 1995; 64:60-64. PMID: 7665250)
39. Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungluth A, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Tsushima T, Kumon H, Old LJ, Nakayama E. NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res.* 2001; 61:4671-4674.
40. Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan M, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old, LJ. A survey of the humoral response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 1998;187:1349-1354. (PMID: 9547346)
41. Jäger E., Nagata Y, Gnjatich S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: Correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4760-4765. (PMID: 10781081)
42. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996; 93:7149-7153 (.PMID: 8692960)

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 95 -

43. Jungbluth A, Chen YT, Stockert E, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altorki N, Old LJ. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant tumors. *Int J Cancer*. 2001; 92:856-860.
- 5 44. Jungbluth A, Antonescu C, Busam K, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Ladanyi M, Old, LJ. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1, but not MAGE-A1 or CT7. *Int J Cancer*. 2001; 94(2):252-6.
- 10 45. Antonescu C, Busam K, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Spagnoli G, Ladanyi M, Old LJ, Jungbluth, A. MAGE antigen expression in monophasic and biphasic synovial sarcoma. *Mod Path*. Submitted 2001.
46. Beard J. The cancer problem. *Lancet* 1905;1:281-203.
- 15 47. Gurchot C. The trophoblast theory of cancer. *Oncology* 1975; 31: 310-333. (PMID: 1107920)
48. Iles RK, Chard T. Human Chorionic Gonadotropin Expression by Bladder Cancers: Biology and Clinical Potential. *J Urol* 1991; 145 :453-458. (PMID: 1705292)
- 20 49. Acevedo HF, Tong JY, Hartsock RJ. Human Chorionic Gonadotropin-Beta Subunit Gene Expression in Cultured Human Fetal and Cancer Cells of Different Types and Origins. *Cancer* 1995; 76: 1467-1475. (PMID: 8620425)
- 25 50. Dirnhofer S, Koessler P, Ensigner C, Feichtinger H, Madersbacher S, Berger P. Production of Trophoblastic Hormones by Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: Association to Tumor Stage and Grade. *Hum Path* 1998; 29: 377-382. (PMID: 9563788)
- 30 51. Vidaeus CM, von Kapp-Herr C, Golden WL, Eddy RL, Shows TB, Herr JC. Human fertilin beta: identification, characterization, and chromosomal mapping of an ADAM

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 96 -

- gene family member. *Mol Reprod Dev.* 1997;46:363-9.
52. Brinkmann U, Vasmatazis G, Lee B, Yerushalmi N, Essand M, Pastan I. PAGE-1, an
X chromosome-linked GAGE-like gene that is expressed in normal and neoplastic
prostate, testis, and uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:10757-62.
53. Nagai Y, Aoki J, Sato T, Amano K, Matsuda Y, Arai H, et al. An alternative splicing
form of phosphatidylserine-specific phospholipase A1 that exhibits
lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase activity in humans. *J. Biol. Chem.*
1999;274:11053-9.
54. Dotzlaw H, Alkhalaf M, Murphy LC. Characterization of estrogen receptor variant
mRNAs from human breast cancers. *Mol Endocrinol.* 1992;6:773-85.
55. Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E,
et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by
autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1994;179:921-30.
56. Chen YT, Scanlan M J, Obata Y, Old LJ. Identification of human tumor antigens by
serological expression cloning. (2000) In: Rosenberg SA. Principles and Practice of
Biologic Therapy of Cancer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000:557-
70.
57. Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and
protease activity. *Trends Genet.* 2000;16:83-7.
58. Roldan ER. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Front Biosci.*
1998; 3:D1109-19.
59. Scarcella DL, Chow CW, Gonzales MF, Economou C, Brasseur F, Ashley DM.
Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for
specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:335-41.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 97 -

60. Dropcho EJ, Chen YT, Posner JB, Old LJ. Cloning of a brain protein identified by autoantibodies from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:4552-56.
- 5 61. Dalmau J, Gultekin SH, Voltz R, Hoard R, DesChamps T, Balmaceda C, et al. Ma1, a novel neuron- and testis-specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain*. 1999;122: 27-39.
- 10 62. Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, Gerstner E, Eichen J, Posner JB, et al. A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Engl J Med*. 1999;340:1788-95.
- 15 63. Steimle V, Durand B, Barras E, Zufferey M, Hadam MR, Mach B, et al. A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev* 1995;9:1021-32.
64. Mach B, Steimle V, Reith W. MHC class II-deficient combined immunodeficiency: a disease of gene regulation. *Immunol Rev*. 1994;138:207-21.
- 20 65. Loging WT, Lal A, Siu IM, Loney TL, Wikstrand CJ, Marra MA, et al. Identifying potential tumor markers and antigens by database mining and rapid expression screening. *Genome Res*. 2000;10:1393-1402.

25 EQUIVALENTS

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

All references disclosed herein are incorporated by reference in their entirety.

30 We claim:

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 98 -

Claims

1. A method of diagnosing a cancer, comprising:
contacting a non-testis biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, and determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.
2. The method of claim 1, wherein the agent is selected from the group consisting of
(a) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48 or a fragment thereof,
(b) an antibody that binds to an expression product of a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48,
(c) an agent that binds to a complex of an HLA molecule and a fragment of an expression product of a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48 and
(d) a polypeptide that binds the antibody that binds the expression product or fragment.
3. The method of claim 1, wherein the cancer is characterized by expression of a plurality of human CT antigen precursors and wherein the agent is a plurality of agents, each of which is specific for a different human CT antigen precursor, and wherein said plurality of agents is at least 2, at least 3, at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, or at least 8, at least 9 or at least 10 such agents.
4. A method of diagnosing a cancer, comprising:
contacting a non-testis, non-brain biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 99 -

that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:32, and

determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

5

5. A method of diagnosing a cancer, comprising:

contacting a non-testis, non-ovary, non-cervix, non-lung biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:34, and

10

determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

15 6. A method of diagnosing a cancer, comprising:

contacting a non-testis, non-ovary, non-lung, non-breast, non-prostate, non-colon biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:36, and

20

determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

25 7. A method of diagnosing a cancer, comprising:

contacting a non-testis, non-placenta, non-lung, non-breast, non-prostate biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:38, and

30

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 100 -

determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

8. A method of diagnosing a cancer, comprising:

5 contacting a non-testis, non-ovary, non-placenta, non-lung, non-prostate, non-cervix biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as
10 SEQ ID NO:40, and

determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

9. A method of diagnosing a cancer, comprising:

15 contacting a non-testis, non-ovary, non-prostate biological sample isolated from a subject with an agent that specifically binds to a nucleic acid molecule, an expression product thereof, a fragment of the expression product thereof complexed with an HLA molecule, or an antibody that binds the expression product or fragment, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:51, and

20 determining the interaction between the agent and the nucleic acid molecule or the expression product to diagnose the cancer in the subject.

10. A method for determining regression, progression or onset of a cancer characterized by expression of abnormal levels of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising
25 a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, comprising

monitoring a plurality of non-testis samples obtained at different times from a subject who has or is suspected of having the cancer, for a parameter selected from the group consisting of

- 30
- (i) the protein,
 - (ii) a peptide derived from the protein,
 - (iii) an antibody which selectively binds the protein or peptide,

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 101 -

- (iv) cytolytic T cells specific for a complex of the peptide derived from the protein and an MHC molecule, and
- (v) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48; and
- 5 comparing the parameters from the plurality of samples to determine regression, progression or onset of the cancer.
11. The method of claim 10, wherein the sample is a body fluid, a body effusion, cell or a tissue.
- 10 12. The method of claim 10, wherein the step of monitoring comprises contacting the sample with a detectable agent selected from the group consisting of
- (a) an antibody or fragment thereof which selectively binds the protein of (i), or the peptide of (ii),
- 15 (b) a protein or peptide which binds the antibody of (iii),
- (c) a cell which presents the complex of the peptide and MHC molecule of (iv), and
- (d) at least one nucleic acid probe or primer that hybridizes to the nucleic acid molecule of (v) or its complement.
- 20 13. The method of claim 12, wherein the antibody, the protein, the peptide, the cell or the nucleic acid probe or primer is labeled with a radioactive label or an enzyme.
14. The method of claim 10, wherein the protein is a plurality of proteins, the parameter is
- 25 a plurality of parameters, each of the plurality of parameters being specific for a different of the plurality of proteins, at least one of which is a CT antigen protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.
- 30 15. A pharmaceutical preparation for a human subject comprising
- an agent which when administered to the subject enriches selectively the presence of complexes of an HLA molecule and a human CT antigen peptide, and

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 102 -

a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the human CT antigen peptide is a fragment of a human CT antigen encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

5 16. The pharmaceutical preparation of claim 15, wherein the agent comprises a plurality of agents, each of which enriches selectively in the subject complexes of an HLA molecule and a different human CT antigen peptide, wherein at least one of the human CT antigens is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

10

17. The pharmaceutical preparation of claim 15, wherein the agent is selected from the group consisting of

- (1) an isolated polypeptide comprising the human CT antigen peptide,
- (2) an isolated nucleic acid operably linked to a promoter for expressing the isolated
- 15 polypeptide,
- (3) a host cell expressing the isolated polypeptide, and
- (4) isolated complexes of the polypeptide, and an HLA molecule.

20

18. The pharmaceutical preparation of claims 15-17, further comprising an adjuvant.

19. The pharmaceutical preparation of claim 15, wherein the agent is a cell expressing an isolated polypeptide comprising the human CT antigen peptide, and wherein the cell is nonproliferative.

25

20. The pharmaceutical preparation of claim 15, wherein the agent is a cell expressing an isolated polypeptide comprising the human CT antigen peptide, and wherein the cell expresses an HLA molecule that binds the polypeptide.

30

21. The pharmaceutical preparation of claim 20, wherein the cell expresses one or both of the polypeptide and HLA molecule recombinantly.

22. The pharmaceutical preparation of claim 20, wherein the cell is nonproliferative.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 103 -

23. A composition comprising
an isolated agent that binds selectively a polypeptide comprising an amino acid
sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37,
5 39, 41 and 52.
24. The composition of matter of claim 23, wherein the agent is an antibody or an
antigen-binding fragment thereof.
- 10 25. The composition of claim 24, wherein the antibody is a monoclonal antibody, a
chimeric antibody or a humanized antibody.
26. A composition of matter comprising a conjugate of the agent of claims 23 or 24 and a
therapeutic or diagnostic agent.
- 15 27. The composition of matter of claim 26, wherein the conjugate is of the agent and a
therapeutic or diagnostic that is a toxin.
28. A pharmaceutical composition comprising
20 an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the
group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, and
a pharmaceutically acceptable carrier.
29. The pharmaceutical composition of claim 28, wherein the isolated nucleic acid
25 molecule comprises at least two isolated nucleic acid molecules coding for two different
polypeptides, each polypeptide comprising a different human CT antigen.
30. The pharmaceutical composition of claims 28 or 29 further comprising an expression
vector with a promoter operably linked to the isolated nucleic acid molecule.
- 30 31. The pharmaceutical composition of claims 28 or 29 further comprising a host cell
recombinantly expressing the isolated nucleic acid molecule.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 104 -

32. A pharmaceutical composition comprising
an isolated polypeptide comprising a polypeptide encoded by a nucleic acid molecule
comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20,
5 22, 46 and 48, and
a pharmaceutically acceptable carrier.
33. The pharmaceutical composition of claim 32, wherein the isolated polypeptide
comprises at least two different polypeptides, each comprising a different human CT antigen.
- 10 34. The pharmaceutical composition of claims 32 or 33, further comprising an adjuvant.
35. A protein microarray comprising at least one polypeptide encoded by a nucleic acid
molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID
15 NOs:18, 20, 22, 46 and 48, or an antigenic fragment of the polypeptide.
36. The microarray of claim 35, wherein the at least one polypeptide comprises an amino
acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19, 21, 23, 47, 49 and 50.
- 20 37. A protein microarray comprising at least one polypeptide encoded by a nucleic acid
molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID
NOs:24, 26, 28 and 30, or an antigenic fragment of the polypeptide.
38. The microarray of claim 37, wherein the at least one polypeptide comprises an amino
25 acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:25, 27, 29 and 31.
39. A protein microarray comprising at least one polypeptide encoded by a nucleic acid
molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID
NOs:32, 34, 36, 38, 40 and 51, or an antigenic fragment of the polypeptide.
- 30 40. The microarray of claim 39, wherein the at least one polypeptide comprises an amino
acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:33, 35, 37, 39, 41 and 52.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 105 -

41. A protein microarray comprising a plurality of antibodies or antigen-binding fragments thereof that specifically bind at least one polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, or an antigenic fragment of the polypeptide.
42. The microarray of claim 41, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19, 21, 23, 47, 49 and 50.
43. A protein microarray comprising a plurality of antibodies or antigen-binding fragments thereof that specifically bind at least one polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:24, 26, 28 and 30, or an antigenic fragment of the polypeptide.
44. The microarray of claim 43, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:25, 27, 29 and 31.
45. A protein microarray comprising a plurality of antibodies or antigen-binding fragments thereof that specifically bind at least one polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:32, 34, 36, 38, 40 and 51, or an antigenic fragment of the polypeptide.
46. The microarray of claim 45, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:33, 35, 37, 39, 41 and 52.
47. A nucleic acid microarray comprising at least one nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, or a fragment thereof of at least 20 nucleotides that selectively hybridizes to its complement in a biological sample.
48. A nucleic acid microarray comprising at least one nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:24, 26, 28 and 30, or

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 106 -

a fragment thereof of at least 20 nucleotides that selectively hybridizes to its complement in a biological sample.

49. A nucleic acid microarray comprising at least one nucleic acid molecule comprising a
5 nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:32, 34, 36, 38, 40
and 51, or a fragment thereof of at least 20 nucleotides that selectively hybridizes to its
complement in a biological sample.

50. An isolated fragment of a human CT antigen which, or a portion of which, binds a
10 HLA molecule or a human antibody, wherein the CT antigen is encoded by a nucleic acid
molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID
NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

51. The fragment of claim 50, wherein the fragment is part of a complex with the HLA
15 molecule.

52. The fragment of claim 50, wherein the fragment is between 8 and 12 amino acids in
length.

20 53. A kit for detecting the expression of two or more human CT antigens comprising
two or more pairs of isolated nucleic acid molecules, each of which consists
essentially of a nucleic acid molecule selected from the group consisting of (a) a 12-32
nucleotide contiguous segment of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs:18, 20, 22,
46 or 48, and (b) complements of (a), wherein the contiguous segments are nonoverlapping,
25 and wherein the nucleic acid molecules in each of the pairs are specific for a human CT
antigen.

54. The kit of claim 53, wherein the pair of isolated nucleic acid molecules is constructed
and arranged to selectively amplify at least a fragment of an isolated nucleic acid molecule
30 selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 107 -

55. A method for treating a subject with a cancer characterized by expression of a human CT antigen, comprising

administering to the subject an amount of an agent, which enriches selectively in the subject the presence of complexes of a HLA molecule and a human CT antigen peptide, effective to ameliorate the disorder, wherein the human CT antigen peptide is a fragment of a human CT antigen encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

56. The method of claim 55, wherein the cancer is characterized by expression of a plurality of human CT antigens and wherein the agent is a plurality of agents, each of which enriches selectively in the subject the presence of complexes of an HLA molecule and a different human CT antigen peptide, wherein at least one of the human CT antigens is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

57. The method of claim 55, wherein the agent is an isolated polypeptide encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

58. A method for treating a subject having a cancer characterized by expression of a human CT antigen in cells of the subject, comprising:

- (i) removing an immunoreactive cell containing sample from the subject,
- (ii) contacting the immunoreactive cell containing sample to the host cell under conditions favoring production of cytolytic T cells against a human CT antigen peptide that is a fragment of the human CT antigen,
- (iii) introducing the cytolytic T cells to the subject in an amount effective to lyse cells which express the human CT antigen, wherein the host cell is transformed or transfected with an expression vector comprising an isolated nucleic acid molecule operably linked to a promoter, wherein the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 108 -

59. The method of claim 58, wherein the host cell recombinantly expresses an HLA molecule which binds the human CT antigen peptide.

60. The method of claim 58, wherein the host cell endogenously expresses an HLA molecule which binds the human CT antigen peptide.

61. A method for treating a subject having a cancer characterized by expression of a human CT antigen in cells of the subject, comprising:

- (i) identifying a nucleic acid molecule expressed by the cells of the cancer, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, or a fragment thereof;
- (ii) transfecting a host cell with a nucleic acid molecule selected from the group consisting of (a) the nucleic acid molecule identified, (b) a fragment of the nucleic acid identified which includes a segment coding for a human CT antigen, (c) degenerates of (a) or (b);
- (iii) culturing said transfected host cells to express the transfected nucleic acid molecule, and;
- (iv) introducing an amount of said host cells or an extract thereof to the subject effective to increase an immune response against the cells of the subject associated with the condition.

62. The method of claim 61, further comprising identifying an MHC molecule which presents a portion of an expression product of the nucleic acid molecule, wherein the host cell expresses the same MHC molecule as identified and wherein the host cell presents an MHC binding portion of the expression product of the nucleic acid molecule.

63. The method of claim 61, wherein the immune response comprises a B-cell response or a T cell response.

64. The method of claim 63, wherein the response is a T-cell response which comprises generation of cytolytic T-cells specific for the host cells presenting the portion of the

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 109 -

expression product of the nucleic acid molecule or cells of the subject expressing the human CT antigen.

65. The method of claim 61, wherein the nucleic acid molecule is selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

66. The method of claims 61 or 62, further comprising treating the host cells to render them non-proliferative.

67. A method for treating or diagnosing or monitoring a subject having a cancer characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis, comprising
administering to the subject an antibody which specifically binds to the protein or a peptide derived therefrom, the antibody being coupled to a therapeutically or diagnostically useful agent, in an amount effective to treat, diagnose or monitor the condition.

68. The method of claim 67, wherein the antibody is a monoclonal antibody or an antigen-binding fragment thereof.

69. The method of claim 68, wherein the monoclonal antibody is a chimeric antibody or a humanized antibody.

70. A method for treating a cancer characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis, comprising
administering to a subject a pharmaceutical composition of any one of claims 15-22 and 28-34 in an amount effective to prevent, delay the onset of, or inhibit the condition in the subject.

71. The method of claim 70, further comprising first identifying that the subject expresses abnormal amounts of the protein in a non-testis tissue.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 110 -

72. A method for treating a subject having a cancer characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis, comprising

- (i) identifying cells from the subject which express abnormal amounts of the protein;
- (ii) isolating a sample of the cells;
- (iii) cultivating the cells, and
- (iv) introducing the cells to the subject in an amount effective to provoke an immune response against the cells.

73. The method of claim 72, further comprising rendering the cells non-proliferative, prior to introducing them to the subject.

74. A method for treating a pathological cell condition characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis, comprising

- administering to a subject in need thereof an effective amount of an agent which inhibits the expression or activity of the protein.

75. The method of claim 74, wherein the agent is an inhibiting antibody which selectively binds to the protein and wherein the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody or an antibody fragment.

76. The method of claim 74, wherein the agent is an antisense nucleic acid molecule which selectively binds to the nucleic acid molecule which encodes the protein.

77. A composition of matter useful in stimulating an immune response to a plurality of a proteins comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19, 21, 23, 47, 49 and 50 comprising

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 111 -

a plurality of peptides that are fragments of the proteins, wherein the peptides bind to one or more MHC molecules presented on the surface of non-testis cells.

78. The composition of matter of claim 77, wherein at least a portion of the plurality of peptides bind to MHC molecules and elicit a cytolytic response thereto.

79. The composition of matter of claim 77, wherein at least one of the proteins is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48.

80. The composition of matter of claim 77, further comprising an adjuvant.

81. The composition of matter of claim 80, wherein said adjuvant is selected from the group consisting of saponins, GM-CSF, interleukins, and immunostimulatory oligonucleotides.

82. An isolated antibody which selectively binds to a complex of:
(i) a peptide that is a fragment of a protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19, 21, 23, 47, 49 and 50, and
(ii) a MHC molecule to which binds the peptide to form the complex, wherein the isolated antibody does not bind to (i) or (ii) alone.

83. The antibody of claim 82, wherein the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, or an antigen-binding fragment thereof.

84. A method for treating or diagnosing or monitoring a subject having a cancer characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis, comprising administering to the subject the antibody of claim 82, the antibody being coupled to a therapeutically or diagnostically useful agent, in an amount effective to treat, diagnose or monitor the condition.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

- 112 -

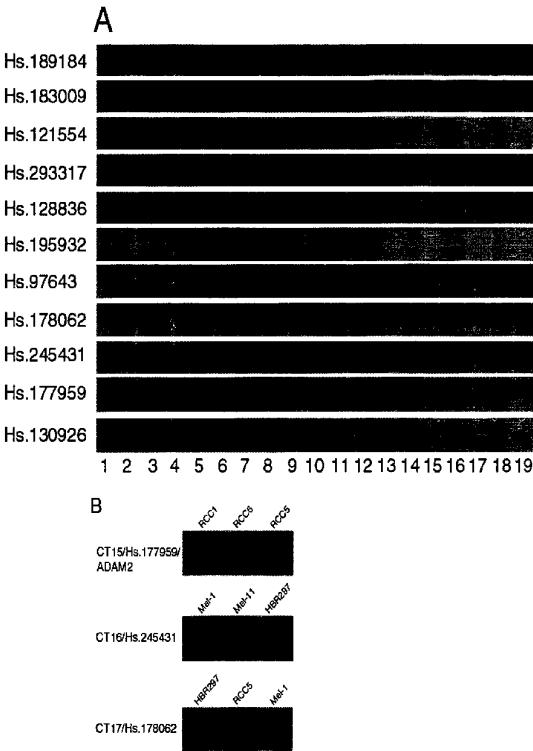
85. A method for treating or diagnosing or monitoring a subject having a cancer characterized by expression of a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 20, 22, 46 and 48, in cells or tissues other than testis, comprising
- 5 administering to the subject the antibody of claim 83, the antibody being coupled to a therapeutically or diagnostically useful agent, in an amount effective to treat, diagnose or monitor the condition.

WO 02/078526

PCT/US02/09808

1/1

Fig. 1



WO 02/078526

PCT/US02/09808

-I-

SEQUENCE LISTING

<110> LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

OLD, LLOYD

SCANLAN, MATTHEW

CHEN, YAO-TSENG

<120> CANCER-TESTIS ANTIGENS

<130> L0461/7125WO(JRV)

<150> 10/054,683

<151> 2002-01-22

<150> 60/280,718

<151> 2001-03-30

<150> 60/285,154

<151> 2001-04-20

<150> 60/327,432

<151> 2001-10-05

<160> 59

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 20

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-2-

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 1

aggaattatg aaaccacttg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 2

gacaacagtt gtatcagacc

20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 3

caaggagagg tegtgtcttc g

21

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-3-

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 4

ggatcttggtt acatgctcac tcatatc

27

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 5

ccagattaag aataacgttc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 6

agaggaaatg accaagagtc

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-4-

<400> 7
acaagactag cttatgtgtg g 21

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

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 8
ttgagcaaga atcttgactt c 21

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 9
gggagtattg acagtggcaa ttt 23

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 10
tgttctcaat gtagcgcctt tc 22

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-5-

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 11

ccacctgtag ctataccagc cagactccc

29

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 12

gcagagtccc ctccctgac

19

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 13

acaggaactg gctctgctta aga

23

<210> 14

<211> 26

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-6-

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 14

tcaggaccat ctccaggtgc atcctc

26

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 15

ccagagtctc atgttaaaat cacttaca

28

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 16

gaaacacttc ctctctttct ttaagtacaa

30

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-7-

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 17

accagaaaag accaccactt tgcaggtg

28

<210> 18

<211> 2640

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 18

catctcgac	ttccaactgc	cctgtaacca	ccaactgcc	ttattcggc	tgggaccag	60
gacttcaagc	catgtgggtc	ttgtttctgc	tcagcgggct	cgccgggctg	cggatggaca	120
gtaattttga	tagtttacct	gtgcaaatta	cagttccgga	gaaaatacgg	tcaataataa	180
aggaagggaat	tgaatcgag	gcattcctaca	aaattgtaat	tgaagggaag	ccatatactg	240
tgaatttaaat	gcaaaaaaac	tttttaccct	ataattttag	agtttacagt	tatagtggca	300
cagggaattat	gaaaccactt	gaccaagatt	ttcagaattt	ctgccactac	caagggtata	360
ttgaagggtta	tccaaaatct	gtggtgatgg	ttagcacatg	tactggactc	aggggcgtac	420
tacagtttga	aaatgttagt	tatggaatag	aacctctgga	gtcttcagtt	ggctttgaac	480
atgtaattta	ccaagtaaaa	cataagaaag	cagatgtttc	cttatataat	gagaaggata	540
ttgaatcaag	agatctgtcc	tttaaatcac	aaagcgacga	gccacagcaa	gattttgcaa	600
agtatataga	aatgcattgt	atagttgaaa	aacaattgta	taatcatatg	gggtctgata	660
caactgttgt	cgctcaaaaa	gttttccagt	tgattggatt	gacgaatgct	atttttgttt	720
catttaatat	tacaattatt	ctgtcttcat	tggagctttg	gatagatgaa	aataaaattg	780
caaccactgg	agaagctaat	gagttattac	acacattttt	aagatggaaa	acattcttacc	840
ttgttttacg	tctctatgat	gtggcatttt	tacttggtta	cagagaaaag	tcaaatatg	900
ttggtgcaac	ctttcaaggg	aagatgtgtg	atgcaaaacta	tgcaggaggt	gttgttctgc	960
acccagaaac	cataagtctg	gaatcacttg	cagttatttt	agctcaatta	ttgagcctta	1020
gtatggggat	cacttatgat	gacattaaca	aatgccagtg	ctcaggagct	gtctgcatta	1080
tgaatccaga	agcaattcat	ttcagtggtg	tgaagatctt	tagtaactgc	agcttcgaag	1140

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-8-

actttgcaca ttttatttca aagcagaagt cccagtgtct tcacaatcag cctcgcttag 1200
atcctttttt caaacagcaa gcagtgtgtg gtaatgcaaa gctggaagca ggagaggagt 1260
gtgactgtgg gactgaacag gattgtgcc ttattggaga aacatgctgt gatattgcc 1320
catgtagatt taaagccggt tcaaactgtg ctgaaggacc atgctgcgaa aactgtctat 1380
ttatgtcaaa agaagaatg ttagagcctt cctttgaaga atgcgacctc cctgaatat 1440
gcaatggatc atctgcatca tgcccagaaa accactatgt tcagactggg catcogtgtg 1500
gactgaatca atggatctgt atagatggag tttgtatgag tggggataaa caatgtacag 1560
acacatttgg caaagaagta gagtttggc cttcagaatg ttattctcac ctttaattcaa 1620
agactgatgt atctggaac tgtgttataa gtgattcagg atacacacag tgtgaagctg 1680
acaatctgca gtgcggaaaa ttaatatgta aatatgtagg taaattttta ttacaaattc 1740
caagagccac tattatttat gccaacataa gtggacatct ctgcattgct gtggaatttg 1800
ccagtgatca tgcagacagc caaagatgt ggataaaga tggaaactct tgtggttcaa 1860
ataaggtttg caggaatcaa agatgttga gttcttcata cttgggttat gattgtacta 1920
ctgacaaatg caatgataga ggtgtatgca ataacaaaa gcactgtcac tgtagtgcct 1980
catatttacc tccagattgc tcagttcaat cagatctatg gccgtgtggg agtattgaca 2040
gtggcaattt tccacctgta gctataccag ccagactccc tgaaggggc tacattgaga 2100
acatttacca tccaaccca atgagatggc catttttctt attcattcct ttctttatta 2160
ttttctgtgt actgattgct ataatggta aagttaattt ccaaaggaaa aaatggagaa 2220
ctgaggacta ttcaagcgat gagcaacctg aaagttagag tgaacctaaa gggtagtctg 2280
gacaacagag atgccatgat atcacttctt ctgagtaat tatctgtgat ggaaggacac 2340
aaaaaaatgg aaagaaaaga atgtacatta cctggtttcc tgggattcaa acctgcata 2400
tgtgatltta atttgaccag aaaatatgat atatatgtat aatttcacag ataatttact 2460
tatttaaaaa tgcataataa tgagttttac attacaaatt tctgtttttt taaagttatc 2520
ttacgtattt tctgttgggt agtagacact aattctgtca gtaggggcat ggtataagga 2580
aatatcataa tgtaatgagg tgggtactatg attaaaagcc actgttacat ttcaaaaaaa 2640

<210> 19

<211> 734

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-9-

<400> 19

```

Met Trp Val Leu Phe Leu Leu Ser Gly Leu Gly Gly Leu Arg Met Asp
1          5          10          15
Ser Asn Phe Asp Ser Leu Pro Val Gln Ile Thr Val Pro Glu Lys Ile
20          25          30
Arg Ser Ile Ile Lys Glu Gly Ile Glu Ser Gln Ala Ser Tyr Lys Ile
35          40          45
Val Ile Glu Gly Lys Pro Tyr Thr Val Asn Leu Met Gln Lys Asn Phe
50          55          60
Leu Pro His Asn Phe Arg Val Tyr Ser Tyr Ser Gly Thr Gly Ile Met
65          70          75          80
Lys Pro Leu Asp Gln Asp Phe Gln Asn Phe Cys His Tyr Gln Gly Tyr
85          90          95
Ile Glu Gly Tyr Pro Lys Ser Val Val Met Val Ser Thr Cys Thr Gly
100          105          110
Leu Arg Gly Val Leu Gln Phe Glu Asn Val Ser Tyr Gly Ile Glu Pro
115          120          125
Leu Glu Ser Ser Val Gly Phe Glu His Val Ile Tyr Gln Val Lys His
130          135          140
Lys Lys Ala Asp Val Ser Leu Tyr Asn Glu Lys Asp Ile Glu Ser Arg
145          150          155          160
Asp Leu Ser Phe Lys Leu Gln Ser Ala Glu Pro Gln Gln Asp Phe Ala
165          170          175
Lys Tyr Ile Glu Met His Val Ile Val Glu Lys Gln Leu Tyr Asn His
180          185          190
Met Gly Ser Asp Thr Thr Val Val Ala Gln Lys Val Phe Gln Leu Ile
195          200          205
Gly Leu Thr Asn Ala Ile Phe Val Ser Phe Asn Ile Thr Ile Ile Leu
210          215          220
Ser Ser Leu Glu Leu Trp Ile Asp Glu Asn Lys Ile Ala Thr Thr Gly
225          230          235          240
Glu Ala Asn Glu Leu Leu His Thr Phe Leu Arg Trp Lys Thr Ser Tyr
245          250          255
Leu Val Leu Arg Pro His Asp Val Ala Phe Leu Leu Val Tyr Arg Glu
260          265          270
Lys Ser Asn Tyr Val Gly Ala Thr Phe Gln Gly Lys Met Cys Asp Ala
275          280          285
Asn Tyr Ala Gly Gly Val Val Leu His Pro Arg Thr Ile Ser Leu Glu

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-10-

290	295	300
Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala Gln Leu Leu Ser Leu Ser Met Gly Ile		
305	310	315 320
Thr Tyr Asp Asp Ile Asn Lys Cys Gln Cys Ser Gly Ala Val Cys Ile		
	325	330 335
Met Asn Pro Glu Ala Ile His Phe Ser Gly Val Lys Ile Phe Ser Asn		
	340	345 350
Cys Ser Phe Glu Asp Phe Ala His Phe Ile Ser Lys Gln Lys Ser Gln		
	355	360 365
Cys Leu His Asn Gln Pro Arg Leu Asp Pro Phe Phe Lys Gln Gln Ala		
	370	375 380
Val Cys Gly Asn Ala Lys Leu Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly		
	385	390 395 400
Thr Glu Gln Asp Cys Ala Leu Ile Gly Glu Thr Cys Cys Asp Ile Ala		
	405	410 415
Thr Cys Arg Phe Lys Ala Gly Ser Asn Cys Ala Glu Gly Pro Cys Cys		
	420	425 430
Glu Asn Cys Leu Phe Met Ser Lys Glu Arg Met Cys Arg Pro Ser Phe		
	435	440 445
Glu Glu Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Ser Ser Ala Ser Cys		
	450	455 460
Pro Glu Asn His Tyr Val Gln Thr Gly His Pro Cys Gly Leu Asn Gln		
	465	470 475 480
Trp Ile Cys Ile Asp Gly Val Cys Met Ser Gly Asp Lys Gln Cys Thr		
	485	490 495
Asp Thr Phe Gly Lys Glu Val Glu Phe Gly Pro Ser Glu Cys Tyr Ser		
	500	505 510
His Leu Asn Ser Lys Thr Asp Val Ser Gly Asn Cys Gly Ile Ser Asp		
	515	520 525
Ser Gly Tyr Thr Gln Cys Glu Ala Asp Asn Leu Gln Cys Gly Lys Leu		
	530	535 540
Ile Cys Lys Tyr Val Gly Lys Phe Leu Leu Gln Ile Pro Arg Ala Thr		
	545	550 555 560
Ile Ile Tyr Ala Asn Ile Ser Gly His Leu Cys Ile Ala Val Glu Phe		
	565	570 575
Ala Ser Asp His Ala Asp Ser Gln Lys Met Trp Ile Lys Asp Gly Thr		
	580	585 590
Ser Cys Gly Ser Asn Lys Val Cys Arg Asn Gln Arg Cys Val Ser Ser		
	595	600 605

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-II-

Ser Tyr Leu Gly Tyr Asp Cys Thr Thr Asp Lys Cys Asn Asp Arg Gly
 610 615 620
 Val Cys Asn Asn Lys Lys His Cys His Cys Ser Ala Ser Tyr Leu Pro
 625 630 635 640
 Pro Asp Cys Ser Val Gln Ser Asp Leu Trp Pro Gly Gly Ser Ile Asp
 645 650 655
 Ser Gly Asn Phe Pro Pro Val Ala Ile Pro Ala Arg Leu Pro Glu Arg
 660 665 670
 Arg Tyr Ile Glu Asn Ile Tyr His Ser Lys Pro Met Arg Trp Pro Phe
 675 680 685
 Phe Leu Phe Ile Pro Phe Phe Ile Ile Phe Cys Val Leu Ile Ala Ile
 690 695 700
 Met Val Lys Val Asn Phe Gln Arg Lys Lys Trp Arg Thr Glu Asp Tyr
 705 710 715 720
 Ser Ser Asp Glu Gln Pro Glu Ser Glu Ser Glu Pro Lys Gly
 725 730

<210> 20

<211> 528

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 20
 ggcaagaggc ttctttcttt ccgcatctt cgttctttcc aacatcttcg ttctttctca 60
 ctgaccgaga ctcagccgtg agagatatga gtgagcatgt aacaagatcc caatcctcag 120
 aaagaggaaa tgaccaagag tcttcccagc cagttggacc tgtgattgtc cagcagccca 180
 ctgaggaaaa acgtcaagaa gaggaaccac caactgataa tcaggggtatt gcacctagtg 240
 gggagatcaa aaatgaagga gcacctgctg ttcaaggagc tgatgtggaa gctttttcaac 300
 aggaactggc tctgcttaag atagaggatg cacctggaga tggctcctgat gtcagggagg 360
 ggactctgcc cacttttgat cccactaaag tgctggaagc aggtgaaggc caactatagg 420
 tttaaaccac gacaaatgaa gactgaaacc aagaatattg ttcttatgct ggaaatttga 480
 ctgctaacat tctcttaata aagttttaca gttttctgca aaaaaaaa 528

<210> 21

<211> 110

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-12-

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 21

```

Met Ser Glu His Val Thr Arg Ser Gln Ser Ser Glu Arg Gly Asn Asp
1           5           10           15
Gln Glu Ser Ser Gln Pro Val Gly Pro Val Ile Val Gln Gln Pro Thr
20           25           30
Glu Glu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Pro Pro Thr Asp Asn Gln Gly Ile
35           40           45
Ala Pro Ser Gly Glu Ile Lys Asn Glu Gly Ala Pro Ala Val Gln Gly
50           55           60
Thr Asp Val Glu Ala Phe Gln Gln Glu Leu Ala Leu Leu Lys Ile Glu
65           70           75           80
Asp Ala Pro Gly Asp Gly Pro Asp Val Arg Glu Gly Thr Leu Pro Thr
85           90           95
Phe Asp Pro Thr Lys Val Leu Glu Ala Gly Glu Gly Gln Leu
100          105          110

```

<210> 22

<211> 877

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 22

```

ggcaccgaggc ttgttcacgg catctttaga aacaaactgc aattttatct catttccttg      60
tcgttcacac aaagattaca agactagcct atgtgtggac tgtgactggt ttaaggaaaa      120
atcatgtcct cggctggggt atcaagccaa gctattttaa ggtgttttaa aagaaaggat      180
ggaaggaaga cctcttagga ccactgtggt ttggatata agtggtagac atccattctg      240
tacctattat ttgtttctca gtataattgt tccagataaa actatgatgg atggctcgtt      300
ttcattttaa ttattaaatc agcttgaaat gattgaagag ccaaggcttt atgaaaagaa      360
caaaccattt tataaacttc aagaagtcaa gattcttgct caattttata atgactttgt      420
aaatatttca agcattgggt tgacatattt ccagagctca aatctgcagt gttccacatg      480
cacatacaag atccagagtc tcatgttaaa atcacttaca taccagaaaa gaccaccact      540
ttgcagggtat aatattgtac ttaaagaaag agaggaagtg tttcttaatc caaacacatg      600

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-13-

```

tacaccaaag aacacataag atgcctctct ccatcaaatg cacttgcttg tgaattaatg   660
gacttgtaaa tgaacaatg caatcagctct ttataatac actgttcaat ttgagattca   720
agtatttcta ttcttggaa aaaatttttaaat caatcaaaaa taaagaaaat aaaaagtcca   780
tacagttaaa cattccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaattggcg gccgcaagct   840
tattcccttt agtgagggtt aatttttagct tggcact                               877

```

<210> 23

<211> 205

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 23

```

Ala Arg Gly Leu Phe Met Ala Ser Leu Glu Thr Asn Cys Asn Phe Ile
1      5      10      15
Ser Phe Pro Cys Arg Ser Tyr Lys Asp Tyr Lys Thr Ser Leu Cys Val
20     25     30
Asp Cys Asp Cys Phe Lys Glu Lys Ser Cys Pro Arg Leu Gly Tyr Gln
35     40     45
Ala Lys Leu Phe Lys Gly Val Leu Lys Glu Arg Met Glu Gly Arg Pro
50     55     60
Leu Arg Thr Thr Val Phe Leu Asp Thr Ser Gly Thr Tyr Pro Phe Cys
65     70     75     80
Thr Tyr Tyr Phe Val Leu Ser Ile Ile Val Pro Asp Lys Thr Met Met
85     90     95
Asp Gly Ser Phe Ser Phe Lys Leu Leu Asn Gln Leu Glu Met Ile Glu
100    105    110
Glu Pro Arg Leu Tyr Glu Lys Asn Lys Pro Phe Tyr Lys Leu Gln Glu
115    120    125
Val Lys Ile Leu Ala Gln Phe Tyr Asn Asp Phe Val Asn Ile Ser Ser
130    135    140
Ile Gly Leu Thr Tyr Phe Gln Ser Ser Asn Leu Gln Cys Ser Thr Cys
145    150    155    160
Thr Tyr Lys Ile Gln Ser Leu Met Leu Lys Ser Leu Thr Tyr Pro Glu
165    170    175
Arg Pro Pro Leu Cys Arg Tyr Asn Ile Val Leu Lys Glu Arg Glu Glu
180    185    190

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-14-

Val Phe Leu Asn Pro Asn Thr Cys Thr Pro Lys Asn Thr
 195 200 205

<210> 24

<211> 2270

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 24
 gggcacattg cagattgttc gggtaaattt aaaatgctag agcatgccct acgtgatgcc 60
 aagatggcgg agacttgat tgtagaagaa aagcaagatt ataagcagaa attgaaggca 120
 cttaagattg aagtaacaa actaaaagag gacctcaatg aaaagacgac agaaaataat 180
 gagcaacgag aagagatcat tcgcctcaag caagagaaaa gttgcctgca cgatgaattg 240
 ctttttactg tagagagaga aaagaggaaa gatgaattgc ttaattattgc gaagtcaaa 300
 caagaacgca caaattcaga actgcacaat ctgagacaga ttatgtataa acaacagagt 360
 gatctgcagt ttcttaattt caatgtggaa aattctcagg aattaatata gatgtatgac 420
 tcaaagatgg aggaatcaaa ggctctggac tccagcagag acatgtgttt atcagacctt 480
 gaaaataacc acccaaaagt cgatattaag agggaaaaaa atcagaagtc actgtttaag 540
 gaccagaaat ttgaagccat gttggttcag caaaataggt cagacaagag ctcttgcgat 600
 gaatgcaaag agaagaaca acagatcgat actgtgtttg gggagaaaaag tgtaattacg 660
 ctgtcatcca tattcaccaa agacttagta gagaacaca acctcccttg gtctctggga 720
 ggaaaaacc agattgaacc cgaaaacaaa attacattgt gcaagatcca caaaaatca 780
 caaaatgtc atggcactgg ggttcagaac gaaggaaaac aacctcaga aacacctact 840
 ttatctgatg agaagcagtg gcattgatgc agtgtttacc tgggcctgac caactgtcca 900
 agttcaaaac atccagaaaa gctgatgta gaatgtcaag atcagatgga aaggtccgaa 960
 atctcatgct gccagaaaaa tgaagcctgt ctgggcgaaa gtggcatgtg tgactccaag 1020
 tgctgccacc cgagtaactt cataattgaa gcccaggcc acatgtctga cgtggagtgg 1080
 atgagtattt tcaagccttc caaaatgcag agaattgtcc gcctcaaatc tgggtgcacc 1140
 tggtcagaaa gcattctgtg cacacaacat gactccccgg caagtgaagt aattgccatc 1200
 caagattccc actctttggg ttcttcaaaa tctgccttga gagaagatga gacggagtcc 1260
 tcttccaata aaaagaactc acctacgagt ttgttaattc acaaagatgc accagcattc 1320

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-15-

```

aatgaaaagg cttcaattgt gttacccctcc caggatgatt tctcgccccc gagcaagctc 1380
cagcgtttgc tggcgggaatc tcgtcagatg gtgacggacc tggagctgaa cacactgctg 1440
cccatcagcc atgagaatct cactggcagt gccacaaata tttctcatct atgtggaagg 1500
cagaagagcag acaccaatac tgaatgaata cttaacccgta aaactgaaag aggattctag 1560
ttcttcataa acggcactta attccagctg ggagcagaac tagaaaagta atttttaaac 1620
atctacactt cattttcaag ttaaccattt ttgtgctgaa gaaatatttt catgtgtaag 1680
aaagtagacc ttattgtaca tatagaaagt tgggaattatg ctaagaatga aaaagacttc 1740
tcgttaaaga tacagactac agttaaatgc tagagaagct ctttaaaaat gtgaatgtca 1800
aatagagaaa gaacccctgc atagaagtg ctgttttaac tatctgattt ttaaaaaatc 1860
tgtgcataca tttaaattct aaacaatagc ttatcagagt cagctcaaaa tatatgagaa 1920
acagtattct ctcattggtt tagcttttga ctttctgtg taaatagaca taaggtgctt 1980
tgatatataa tataaagtgt aactggaaaa tagctcgagg tccttctgtc ccaagctgag 2040
cagagcccca tctttctggg tctatattag tcccacctac tgacacaaac aaaagcttgc 2100
tggagatcag agtttttagac gcatttttaa aaatcttaaa gactaaaaa cttccatttt 2160
aacttgtaaa gtaatttaat tttttaaaga ttatactata tgccctctgtg tctctotata 2220
aagaatagat caacttcagt ccataaaaga tattttttaat attaaagaaa 2270

```

<210> 25

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 25

```

Met Leu Glu His Ala Leu Arg Asp Ala Lys Met Ala Glu Thr Cys Ile
1           5           10          15
Val Lys Glu Lys Gln Asp Tyr Lys Gln Lys Leu Lys Ala Leu Lys Ile
20          25          30
Glu Val Asn Lys Leu Lys Glu Asp Leu Asn Glu Lys Thr Thr Glu Asn
35          40          45
Asn Glu Gln Arg Glu Glu Ile Ile Arg Leu Lys Gln Glu Lys Ser Cys
50          55          60
Leu His Asp Glu Leu Leu Phe Thr Val Glu Arg Glu Lys Arg Lys Asp
65          70          75          80

```

PCT/US02/09808

Glu	Leu	Leu	Asn	Ile	Ala	Lys	Ser	Lys	Gln	Glu	Arg	Thr	Asn	Ser	Glu
85															
Leu	His	Asn	Leu	Arg	Gln	Ile	Tyr	Val	Lys	Gln	Gln	Ser	Asp	Leu	Gln
100															
Phe	Leu	Asn	Phe	Asn	Val	Glu	Asn	Ser	Gln	Glu	Leu	Ile	Gln	Met	Tyr
115															
Asp	Ser	Lys	Met	Glu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Asp	Ser	Ser	Arg	Asp	Met
130															
Cys	Leu	Ser	Asp	Leu	Glu	Asn	Asn	His	Pro	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg
145															
Glu	Lys	Asn	Gln	Lys	Ser	Leu	Phe	Lys	Asp	Gln	Lys	Phe	Glu	Ala	Met
165															
Leu	Val	Gln	Gln	Asn	Arg	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Cys	Asp	Glu	Cys	Lys
180															
Glu	Lys	Lys	Gln	Gln	Ile	Asp	Thr	Val	Phe	Gly	Glu	Lys	Ser	Val	Ile
195															
Thr	Leu	Ser	Ser	Ile	Phe	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Glu	Lys	His	Asn	Leu
210															
Pro	Trp	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Thr	Gln	Ile	Glu	Pro	Glu	Asn	Lys	Ile
225															
Thr	Leu	Cys	Lys	Ile	His	Thr	Lys	Ser	Pro	Lys	Cys	His	Gly	Thr	Gly
245															
Val	Gln	Asn	Glu	Gly	Lys	Gln	Pro	Ser	Glu	Thr	Pro	Thr	Leu	Ser	Asp
260															
Glu	Lys	Gln	Trp	His	Asp	Val	Ser	Val	Tyr	Leu	Gly	Leu	Thr	Asn	Cys
275															
Pro	Ser	Ser	Lys	His	Pro	Glu	Lys	Leu	Asp	Val	Glu	Cys	Gln	Asp	Gln
290															
Met	Glu	Arg	Ser	Glu	Ile	Ser	Cys	Cys	Gln	Lys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu
305															
Gly	Glu	Ser	Gly	Met	Cys	Asp	Ser	Lys	Cys	Cys	His	Pro	Ser	Asn	Phe
325															
Ile	Ile	Glu	Ala	Pro	Gly	His	Met	Ser	Asp	Val	Glu	Trp	Met	Ser	Ile
340															
Phe	Lys	Pro	Ser	Lys	Met	Gln	Arg	Ile	Val	Arg	Leu	Lys	Ser	Gly	Cys
355															
Thr	Cys	Ser	Glu	Ser	Ile	Cys	Gly	Thr	Gln	His	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser
370															
Glu	Leu	Ile	Ala	Ile	Gln	Asp	Ser	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Lys	Ser

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-17-

385 390 395 400
 Ala Leu Arg Glu Asp Glu Thr Glu Ser Ser Ser Asn Lys Lys Asn Ser
 405 410 415
 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Tyr Lys Asp Ala Pro Ala Phe Asn Glu Lys
 420 425 430
 Ala Ser Ile Val Leu Pro Ser Gln Asp Phe Ser Pro Thr Ser Lys
 435 440 445
 Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu Ser Arg Gln Met Val Thr Asp Leu Glu
 450 455 460
 Leu Asn Thr Leu Leu Pro Ile Ser His Glu Asn Leu Thr Gly Ser Ala
 465 470 475 480
 Thr Asn Ile Ser His Leu Cys Gly Arg Gln Lys Ala Asp Thr Asn Thr
 485 490 495
 Glu

<210> 26

<211> 996

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 26
 gtatgttcct gccagaaaag ttgcataact tgggggttaa agacaggaat atggcacaat 60
 gccattgttg gccagtgtcc agacagaaga agagactcat atcacctaaa tgacaaaccc 120
 agaatatgtc acaatgtatc ctgttgaaag gaccagaaac gaggatgaat tgccacatca 180
 tctgggttctg agttctgaga tattcacaag tccccttaga aaacaactca ggcaagagag 240
 ttacatcacc taggagcccg ttccaccctt atgtcacagt gtttcattgtg tacaggacta 300
 agaagaaaagt cacatcacct agatgataga cccagagaca cgtcacaag ctttctgaa 360
 agcatggccc tggcaaaata gtacaatcac ctttgtacct ggtctagcaa tatgtcatta 420
 ttcaagtgtg caggtaccaa ggagaggagc cactactact atgttatatg cctgtgcta 480
 tgtcaaaatg ccttcttttc agcatggccc tggagaagaatg tatcatctca catgtgactg 540
 gcttaggaag atgtcactat cctgccatgt gtgcagggcc catttttagag attagagtta 600
 tgtcttcttc taagtcatgg acccagtgat atatcactat gatgtctgtg agaattggga 660
 ggcaggaatg taatgtcact tgcattctag atccagtgat gtcacaattc ttactgaggg 720
 cagagcccag tcagaagagt catatctttt acaggttggc ccaagtagat gtcaaaaacc 780

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-18-

```

cctatggatt agatttaca taccacacat ctcttgtttt catgtaggag agttgectgc      840
attcatctgt gatgatgaaa gtccttactg tcagccaagt gtgcatatga gactcacaat      900
ttectctgtt tgetaaccac tattatgaca ctctctattc aaccaacgg ttttataaaa      960
catttgtcat tgttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaa                                996

```

<210> 27

<211> 90

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 27

```

Met Ile Asp Pro Glu Thr Arg His Lys Ala Phe Leu Lys Ala Trp Pro
1           5           10           15
Trp Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Val Pro Gly Leu Ala Ile Cys His
20          25          30
Tyr Ser Ser Val Gln Val Pro Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Met Leu
35          40          45
Tyr Ala Leu Cys Tyr Val Lys Met Pro Ser Phe Gln His Gly Pro Gly
50          55          60
Arg Met Tyr His Leu Thr Cys Asp Trp Pro Arg Lys Met Ser Leu Ser
65          70          75          80
Cys His Val Cys Arg Ala His Phe Arg Asp
85          90

```

<210> 28

<211> 2347

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

```

<400> 28
gggaggtttg gagccctgca taaagagaag gacgggacca cagctgactg ctgtgtcccc      60
acagatctgg gectctgct gccaccatgg ccaaaggtgg agaagccctg ccacagggca      120
gccacgcacc agtcaggat cccacctca tcaaggtgac agtgaagacg cccaaagaca      180
aggaggattt ctcagttaca gacacatgca ctatccagca gctgaaggaa gagatatctc      240

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-19-

```

agcgctttaa ggcacacccc gatcagcttg ttctaatttt tgcctggcaaa atcctcaagg 300
atcctgactc actggcacag tgtggagtg cagatggcct cactgtccac ctggatcatc 360
agaggcagca cgttgccatg ggcaatgagt gccagctgc ctctgtccct acccagggcc 420
caagtccctg atcactccct cagccaagct ccatttacct agcagatggg ccccttgctt 480
ttagcttagg tctctcaca ggcctcagta ggcctgggctt ggcttatcgt ggcttccctg 540
accagccaag ctccctgatg cggcagcatg tgcctgtgct tgagtttgtg actcagctca 600
ttgatgacct ctccatcccg ggtctgtctt ccaacacagg cctagtacgc cagctgggtc 660
ttgacaaccc ccatatgcag cagctgatcc agcacaaccc tgagattggg catattctta 720
acaacccgga aattatgcgg cagacactgg agtttttacg taacctggcc atgatgcagg 780
agatgatagc tagccaggac cgggtgctca gtaacttggg gagcattcct ggtgggtaca 840
atgtgttttg cactatgtac acagatatta tggaccaat gcttaacgca gtccaggagc 900
agttttggcg caatcccttt gccactgcca ctactgataa tgcaccaccc accaccagcc 960
aaccttcaag gatggagaat tgtgacctc tccccaccc ctggacttcc acacatggag 1020
gctcaggtag caggcaagga aggcaggatg gggatcagga tgcacctgac attagaaata 1080
ggtttccaaa cttcttggtt attataaggc tctatgacta tctccagcaa ttacacgaga 1140
acccccagtc ctaggaact tatctacagg ggaactgcac tgcctcagc caaagccagg 1200
aaccacaccc atcagtaaac agagttcccc catcgtcacc ctcatctcag gagcctgggt 1260
caggccagcc tctccccag gagtcagtag caatcaaggg aaggctcctc tgcccagctt 1320
tcttgagata cccacagag aacagtactg gacaagggtg agaccaagat ggtgcaggga 1380
aaagctctac tggacatagc acaaacttgc ctgatcttgt ctgggggctg ggagattctg 1440
ccaacagggg tccatttgtt ccttatctt tttcccccac ggcagccatt cctggaatcc 1500
ctgagctctc ctggctgcca tccccggctt atccaagatc tctgaggcca gatggcatga 1560
atccagctcc acagttacag gatgagatac aaccacagct gccactgctg atgcaccttc 1620
aggcagccat ggcaaacccc cgtgccctgc aagccctgcg gcagattgag cagggtctac 1680
aggctctagc tactgaagca cctgcctctc tactctgggt catgccttgc ctgacaggga 1740
cgggtagtgt ggcaggaggt atagagtcta gagaagatcc cttatgtct gaggatcctc 1800
tcccaaatcc acctcctgag gtgttcccag cactggactc tgcagagctg ggcttccctt 1860
ccctccctt tctccatag ctgcaagatt tagtttagtac aaatccccag cagctgcagc 1920
ctgaggctca ctttcagggt cagctggagc aactgcggtc catgggcttt ctgaatcgtg 1980
aagccaatct tcaggccctc attgctacgg gggggcgacgt ggaatgctgt gtggagaagc 2040

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-20-

```

tgagacagtc gtaggagcct taticattca aaccatacgt tttctctgtt gcctttttcc 2100
catatccttag ttccctagct ctcccathtt tgaatacagc tgcattataa accaaattta 2160
ctatgaagtc ctttctgttg gaggcaatgt tgttccagag tcaacgagga agactaatgg 2220
ccaaaacata gtggagggtgc tgtgtgtgag tcaaccactt gtaccactat accactgggg 2280
ggccccagtc taagctctgc ttatgcctat cttgagatgc aattacaccc aatttccaat 2340
gtgaaaa 2347

```

<210> 29

<211> 655

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 29

```

Met Ala Lys Gly Gly Glu Ala Leu Pro Gln Gly Ser Pro Ala Pro Val
1          5          10          15
Gln Asp Pro His Leu Ile Lys Val Thr Val Lys Thr Pro Lys Asp Lys
20          25          30
Glu Asp Phe Ser Val Thr Asp Thr Cys Thr Ile Gln Gln Leu Lys Glu
35          40          45
Glu Ile Ser Gln Arg Phe Lys Ala His Pro Asp Gln Leu Val Leu Ile
50          55          60
Phe Ala Gly Lys Ile Leu Lys Asp Pro Asp Ser Leu Ala Gln Cys Gly
65          70          75          80
Val Arg Asp Gly Leu Thr Val His Leu Val Ile Lys Arg Gln His Arg
85          90          95
Ala Met Gly Asn Glu Cys Pro Ala Ala Ser Val Pro Thr Gln Gly Pro
100         105         110
Ser Pro Gly Ser Leu Pro Gln Pro Ser Ser Ile Tyr Pro Ala Asp Gly
115         120         125
Pro Pro Ala Phe Ser Leu Gly Leu Leu Thr Gly Leu Ser Arg Leu Gly
130         135         140
Leu Ala Tyr Arg Gly Phe Pro Asp Gln Pro Ser Ser Leu Met Arg Gln
145         150         155         160
His Val Ser Val Pro Glu Phe Val Thr Gln Leu Ile Asp Asp Pro Phe
165         170         175

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-21-

Ile Pro Gly Leu Leu Ser Asn Thr Gly Leu Val Arg Gln Leu Val Leu
 180 185 190
 Asp Asn Pro His Met Gln Gln Leu Ile Gln His Asn Pro Glu Ile Gly
 195 200 205
 His Ile Leu Asn Asn Pro Glu Ile Met Arg Gln Thr Leu Glu Phe Leu
 210 215 220
 Arg Asn Pro Ala Met Met Gln Glu Met Ile Arg Ser Gln Asp Arg Val
 225 230 235 240
 Leu Ser Asn Leu Glu Ser Ile Pro Gly Gly Tyr Asn Val Leu Cys Thr
 245 250 255
 Met Tyr Thr Asp Ile Met Asp Pro Met Leu Asn Ala Val Gln Glu Gln
 260 265 270
 Phe Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ala Thr Thr Asp Asn Ala Thr Thr
 275 280 285
 Thr Thr Ser Gln Pro Ser Arg Met Glu Asn Cys Asp Pro Leu Pro Asn
 290 295 300
 Pro Trp Thr Ser Thr His Gly Gly Ser Gly Ser Arg Gln Gly Arg Gln
 305 310 315 320
 Asp Gly Asp Gln Asp Ala Pro Asp Ile Arg Asn Arg Phe Pro Asn Phe
 325 330 335
 Leu Gly Ile Ile Arg Leu Tyr Asp Tyr Leu Gln Gln Leu His Glu Asn
 340 345 350
 Pro Gln Ser Leu Gly Thr Tyr Leu Gln Gly Thr Ala Ser Ala Leu Ser
 355 360 365
 Gln Ser Gln Glu Pro Pro Pro Ser Val Asn Arg Val Pro Pro Ser Ser
 370 375 380
 Pro Ser Ser Gln Glu Pro Gly Ser Gly Gln Pro Leu Pro Glu Glu Ser
 385 390 395 400
 Val Ala Ile Lys Gly Arg Ser Ser Cys Pro Ala Phe Leu Arg Tyr Pro
 405 410 415
 Thr Glu Asn Ser Thr Gly Gln Gly Gly Asp Gln Asp Gly Ala Gly Lys
 420 425 430
 Ser Ser Thr Gly His Ser Thr Asn Leu Pro Asp Leu Val Ser Gly Leu
 435 440 445
 Gly Asp Ser Ala Asn Arg Val Pro Phe Ala Pro Leu Ser Phe Ser Pro
 450 455 460
 Thr Ala Ala Ile Pro Gly Ile Pro Glu Pro Pro Trp Leu Pro Ser Pro
 465 470 475 480
 Ala Tyr Pro Arg Ser Leu Arg Pro Asp Gly Met Asn Pro Ala Pro Gln
 485 490 495

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-22-

Leu Gln Asp Glu Ile Gln Pro Gln Leu Pro Leu Leu Met His Leu Gln
 500 505 510
 Ala Ala Met Ala Asn Pro Arg Ala Leu Gln Ala Leu Arg Gln Ile Glu
 515 520 525
 Gln Gly Leu Gln Val Leu Ala Thr Glu Ala Pro Arg Leu Leu Leu Trp
 530 535 540
 Phe Met Pro Cys Leu Ala Gly Thr Gly Ser Val Ala Gly Gly Ile Glu
 545 550 555 560
 Ser Arg Glu Asp Pro Leu Met Ser Glu Asp Pro Leu Pro Asn Pro Pro
 565 570 575
 Pro Glu Val Phe Pro Ala Leu Asp Ser Ala Glu Leu Gly Phe Leu Ser
 580 585 590
 Pro Pro Phe Leu His Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Thr Asn Pro Gln
 595 600 605
 Gln Leu Gln Pro Glu Ala His Phe Gln Val Gln Leu Glu Gln Leu Arg
 610 615 620
 Ser Met Gly Phe Leu Asn Arg Glu Ala Asn Leu Gln Ala Leu Ile Ala
 625 630 635 640
 Thr Gly Gly Asp Val Asp Ala Ala Val Glu Lys Leu Arg Gln Ser
 645 650 655

 <210> 30
 <211> 899
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

 <400> 30
 ctagagagta tagggcagaa ggaatggcaga tgagtgactc cacatccaga gctgcctccc 60
 tttaatccag gatcctgtcc ttctctgtcct gtaggagtgc ctgttgccag tgtggggtga 120
 gacaagtttg tcccacaggg ctgtctgagc agataagatt aagggctggg tctgtgctca 180
 attaatcctc gtgggcacgg gggctgggaa gagcaaagtc agcggctgcct acagtcagca 240
 ccattgctggg cctgccgtgg aagggaagtc tgtcctgggc gctgctgctg cttctcttag 300
 gctccagatc cctgctgac tatgcctggc atttccacga gcaaaggagc tgtgatgaac 360
 acaatgtcat ggctcgttac ctccctgcc cagtggagtt tgctgtccac acattcaacc 420
 aacagagcaa ggactactat gcctacagac tggggcacat ctggaattcc tgggaaggagc 480
 aggtggagtc caagactgta ttctcaatgg agctactgct ggggagaact aggtgtggga 540

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-23-

```

aatttgaaga cyacattgac aactgccatt tccaagaaag cacagagctg aacaatactt 600
tcacctgctt cttcaccatc agcaccaggc cctggatgac tcagttcagc ctcctgaaca 660
agacctgctt ggagggattc cactgagtga aaccactca caggettgc catgtgtgc 720
tcccacattc cgtggacatc agcactactc tctgaggac tcttcagtgg ctgagcagct 780
ttggacttgt ttgttatcct attttgcag tgtttgagat ctcagatcag tgttttagaa 840
aatccacaca tcttgagcct aatcatgtag tgtatgatcat taaacatcag cattttaag 899

```

<210> 31

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 31

```

Met Leu Gly Leu Pro Trp Lys Gly Gly Leu Ser Trp Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15
Leu Leu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Leu Ile Tyr Ala Trp His Phe His
20          25          30
Glu Gln Arg Asp Cys Asp Glu His Asn Val Met Ala Arg Tyr Leu Pro
35          40          45
Ala Thr Val Glu Phe Ala Val His Thr Phe Asn Gln Gln Ser Lys Asp
50          55          60
Tyr Tyr Ala Tyr Arg Leu Gly His Ile Leu Asn Ser Trp Lys Glu Gln
65          70          75          80
Val Glu Ser Lys Thr Val Phe Ser Met Glu Leu Leu Leu Gly Arg Thr
85          90          95
Arg Cys Gly Lys Phe Glu Asp Asp Ile Asp Asn Cys His Phe Gln Glu
100         105         110
Ser Thr Glu Leu Asn Asn Thr Phe Thr Cys Phe Phe Thr Ile Ser Thr
115         120         125
Arg Pro Trp Met Thr Gln Phe Ser Leu Leu Asn Lys Thr Cys Leu Glu
130         135         140
Gly Phe His
145

```

<210> 32

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-24-

<211> 2186

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 32
tggagaggcc acagctgctg gcttcctggg cttctccaaa ctctgtgtg tggccactgc 60
caccggcagg gagccaggag agagacagaa aggggctgag acagaatgat caaaaggaga 120
gcccaccctg gtgcgggagg cgacaggacc aggcctcgac ggcgcccctc cactgagagc 180
tggattgaaa gatgtctcaa cgaaagtga aacaaacgtt attccagcca cacatctctg 240
gggaatgttt ctaatgatga aaatgaggaa aaagaaaata atagagcatc caagccccac 300
tccactcctg ctactctgca atggctggag gagaactatg agattgcaga gggggtctgc 360
atccctcgca gtgccctcta tatgcattac ctggatttct gcgagaagaa tgatacccaa 420
cctgtcaatg ctgcagcctt tggaaagatc ataaggcagc agtttctca gtaaacacc 480
agaagactcg ggacccgagg acagtcгааг taccattact atggcattgc agtgaaagaa 540
agctcccaat attatgatgt gatgtattcc aagaaggag ctgcctgggt gagtgcagacg 600
ggcaagaaag aagtgcagaa acagacagtg gcatattcac ccggtccaa actcggaaca 660
ctgtgcctag aatttcccaa tgtcaagat ctaaactctg cagccagcct gctgaggag 720
aaggtttcta cttttattat gatgtacaga acacactgtc agagaatact ggacactgta 780
ataagagcca actttgatga ggttcaaagt ttcttctgc acttttgca aggaatgccg 840
ccccacatgc tgcctgtgct gggctcctcc acgggtgtga acattgtcgg cgtgtgtgac 900
tccatcctct acaaagctat ctccggggtg ctgatgcca ctgtgtgca ggcattacct 960
gacagcttaa ctacagtgat tcgaaagttt gccaaagcaac tggatgagtg gctaaaagtg 1020
gtctctccag acctcccaga aaacttgcga aacatcaagt tcgaattgtc gagaagggtc 1080
tcccaaatc tgagacggca aacatcacta aatcatctct gccaggcatc tcgaacagtg 1140
atccacagtg cagacatcac gttccaaatg ctggaagact ggaggacgt ggacctgaac 1200
agcatcacca agcaaacctt ttacaccatg gaagactctc gcgatgagca ccggaaactc 1260
atcacccaat tatatcagga gtttgaccat ctcttgagg agcagtcctc catcgagtcc 1320
tacattgagt ggcctggatac catgggtgac cgctgtgttg tgaagggtgc tgccaagaga 1380
caagggtcct tgaagaaagt ggcccagcag ttctctctga tctggctctg ttctggcaca 1440
agggtgatcc gggacatgac cttgcacagc gcccccagct tcgggtcttt tcacctaat 1500

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-25-

```

cacttaatgt ttgatgacta cgtgctctac ctgttagaat ctctgcactg tcaggagcgg 1560
gccaatgagc tcattgcgagc catgaaggga gaaggaagca ctgcagaagt ccgagaagag 1620
atcatcttga cagaggctgc cgcaccaacc ccttcaccag tgccatcgtt ttctccagca 1680
aaatctgcca catctgtgga agtgccacct ccctctctcc ctgttagcaa tcttccctct 1740
gagtacactg gccctcagcac tacaggtaat ggaagtcct tcaaaaactt tgggtagtta 1800
atgtttgaag aaagggtctt ctgccagcct gggcaacata gtgagacttc atttccacac 1860
acacaaaaag ccagacatct tggctcacac ctgtagtccc agctacttgg gaggtgagg 1920
tgggagaatt gcttgagccc aggagctacg atgcaccac tgcatcttag ccttagtgat 1980
acagtgaac cttgtctcaa aaaaggaaaa acagggtctt ctggaaaaac attctctctc 2040
cacaatctcc aaaagataat gccaaaacct gggatatctc ctggatttgt gaatgacgta 2100
cagggtattca ttattcatt ggtacacatt ctgtatgctg ctgttttcaa gttggcaaat 2160
taagcatatg ataaaatccc aaaact 2186

```

<210> 33

<211> 563

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 33

```

Met Ile Lys Arg Arg Ala His Pro Gly Ala Gly Gly Asp Arg Thr Arg
1           5           10           15
Pro Arg Arg Arg Arg Ser Thr Glu Ser Trp Ile Glu Arg Cys Leu Asn
20           25           30
Glu Ser Glu Asn Lys Arg Tyr Ser Ser His Thr Ser Leu Gly Asn Val
35           40           45
Ser Asn Asp Glu Asn Glu Glu Lys Glu Asn Asn Arg Ala Ser Lys Pro
50           55           60
His Ser Thr Pro Ala Thr Leu Gln Trp Leu Glu Glu Asn Tyr Glu Ile
65           70           75           80
Ala Glu Gly Val Cys Ile Pro Arg Ser Ala Leu Tyr Met His Tyr Leu
85           90           95
Asp Phe Cys Glu Lys Asn Asp Thr Gln Pro Val Asn Ala Ala Ser Phe
100          105          110
Gly Lys Ile Ile Arg Gln Gln Phe Pro Gln Leu Thr Thr Arg Arg Leu

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-26-

115	120	125
Gly Thr Arg Gly Gln Ser Lys Tyr His Tyr Tyr Gly Ile Ala Val Lys 130	135	140
Glu Ser Ser Gln Tyr Tyr Asp Val Met Tyr Ser Lys Lys Gly Ala Ala 145	150	155
Trp Val Ser Glu Thr Gly Lys Lys Glu Val Ser Lys Gln Thr Val Ala 165	170	175
Tyr Ser Pro Arg Ser Lys Leu Gly Thr Leu Leu Pro Glu Phe Pro Asn 180	185	190
Val Lys Asp Leu Asn Leu Pro Ala Ser Leu Pro Glu Glu Lys Val Ser 195	200	205
Thr Phe Ile Met Met Tyr Arg Thr His Cys Gln Arg Ile Leu Asp Thr 210	215	220
Val Ile Arg Ala Asn Phe Asp Glu Val Gln Ser Phe Leu Leu His Phe 225	230	235
Trp Gln Gly Met Pro Pro His Met Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Thr 245	250	255
Val Val Asn Ile Val Gly Val Cys Asp Ser Ile Leu Tyr Lys Ala Ile 260	265	270
Ser Gly Val Leu Met Pro Thr Val Leu Gln Ala Leu Pro Asp Ser Leu 275	280	285
Thr Gln Val Ile Arg Lys Phe Ala Lys Gln Leu Asp Glu Trp Leu Lys 290	295	300
Val Ala Leu His Asp Leu Pro Glu Asn Leu Arg Asn Ile Lys Phe Glu 305	310	315
Leu Ser Arg Arg Phe Ser Gln Ile Leu Arg Arg Gln Thr Ser Leu Asn 325	330	335
His Leu Cys Gln Ala Ser Arg Thr Val Ile His Ser Ala Asp Ile Thr 340	345	350
Phe Gln Met Leu Glu Asp Trp Arg Asn Val Asp Leu Asn Ser Ile Thr 355	360	365
Lys Gln Thr Leu Tyr Thr Met Glu Asp Ser Arg Asp Glu His Arg Lys 370	375	380
Leu Ile Thr Gln Leu Tyr Gln Glu Phe Asp His Leu Leu Glu Glu Gln 385	390	395
Ser Pro Ile Glu Ser Tyr Ile Glu Trp Leu Asp Thr Met Val Asp Arg 405	410	415
Cys Val Val Lys Val Ala Ala Lys Arg Gln Gly Ser Leu Lys Lys Val 420	425	430

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-27-

Ala Gln Gln Phe Leu Leu Met Trp Ser Cys Phe Gly Thr Arg Val Ile
 435 440 445
 Arg Asp Met Thr Leu His Ser Ala Pro Ser Phe Gly Ser Phe His Leu
 450 455 460
 Ile His Leu Met Phe Asp Asp Tyr Val Leu Tyr Leu Leu Glu Ser Leu
 465 470 475 480
 His Cys Gln Glu Arg Ala Asn Glu Leu Met Arg Ala Met Lys Gly Glu
 485 490 495
 Gly Ser Thr Ala Glu Val Arg Glu Glu Ile Ile Leu Thr Glu Ala Ala
 500 505 510
 Ala Pro Thr Pro Ser Pro Val Pro Ser Phe Ser Pro Ala Lys Ser Ala
 515 520 525
 Thr Ser Val Glu Val Pro Pro Pro Ser Ser Pro Val Ser Asn Pro Ser
 530 535 540
 Pro Glu Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Thr Gly Asn Gly Lys Ser Phe Lys
 545 550 555 560
 Asn Phe Gly

<210> 34

<211> 558

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 34
 acagacaaat ggtttatcta ctattggagc catgggtcct gggaatattg gaccacccca 60
 aatagaagag ctcaaagtca tccctgaaac cagcgaggaa aataatgagg acatctggaa 120
 ttccagaagag attccagaag gagcagaata tgatgatatg tgggatgtta gagaaatccc 180
 agagtatgag attatattca gacagcaggt gggaactgaa gatattttt tagggttgtc 240
 aaaaaaggac tctcaacag gttgttgcag tgaactagtg gctaaaatta aattgccaaa 300
 tacaaccct tctgatattc aaattgatat ccaggaaaca atccttgacc ttcgtactcc 360
 tcagaagaag ctgttgataa ctcttctga gctgggtggaa tgtaccagtg ccaaagcatt 420
 ctatatccca gagactgaaa ctcttgaaat ccctatgact atgaaaagag agttagatat 480
 tgctaatttc ttctgaaact gcatgaaaaa gataaaaagt agtaaaatgg cattggtaac 540
 aataaaaaaa ctttgaaa 558

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-28-

<210> 35

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 35

Gln Thr Asn Gly Leu Ser Thr Ile Gly Ala Met Gly Pro Gly Asn Ile
 1 5 10 15
 Gly Pro Pro Gln Ile Glu Glu Leu Lys Val Ile Pro Glu Thr Ser Glu
 20 25 30
 Glu Asn Asn Glu Asp Ile Trp Asn Ser Glu Glu Ile Pro Glu Gly Ala
 35 40 45
 Glu Tyr Asp Asp Met Trp Asp Val Arg Glu Ile Pro Glu Tyr Glu Ile
 50 55 60
 Ile Phe Arg Gln Gln Val Gly Thr Glu Asp Ile Phe Leu Gly Leu Ser
 65 70 75 80
 Lys Lys Asp Ser Ser Thr Gly Cys Cys Ser Glu Leu Val Ala Lys Ile
 85 90 95
 Lys Leu Pro Asn Thr Asn Pro Ser Asp Ile Gln Ile Asp Ile Gln Glu
 100 105 110
 Thr Ile Leu Asp Leu Arg Thr Pro Gln Lys Lys Leu Leu Ile Thr Leu
 115 120 125
 Pro Glu Leu Val Glu Cys Thr Ser Ala Lys Ala Phe Tyr Ile Pro Glu
 130 135 140
 Thr Glu Thr Leu Glu Ile Pro Met Thr Met Lys Arg Glu Leu Asp Ile
 145 150 155 160
 Ala Asn Phe Phe

<210> 36

<211> 538

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 36

ggcacgaggt cgaaaactcc tggaaacctc tgagagagga cagtttccag actcctcggt 60
 agggacgcgg gaagagacca tgtgtgggaa atatgagtga gcatgtgaga acaagatccc 120

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-29-

```

aatcctcaga aagaggaaat gaccaagagt ctccccagcc agttggatct gtgattgtcc 180
aggagcccac tgaggaaaaa cgtcaagaag aggaaccacc aactgataat caggggtattg 240
cacctagtgg ggagatcgaa aatgaaggag cacctgccgt tcaagggcct gacatggaag 300
cttttcaaca ggaactggct ctgcttaaga tagaggatga gcctggagat ggtcctgatg 360
tcaggggaggg gattatgcc accctttgatc tcactaaagt gctggaagca ggtgatgcgc 420
aaccataggt tcaagcaag acaaatgaag actgaaacca agaacgttat tcttaatctg 480
gaaatttgac tgataatatt ctcttaataa agttttaagt tttctgcaaa gaaaaaaa 538

```

<210> 37

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 37

```

Met Ser Glu His Val Arg Thr Arg Ser Gln Ser Ser Glu Arg Gly Asn
1          5          10          15
Asp Gln Glu Ser Ser Gln Pro Val Gly Ser Val Ile Val Gln Glu Pro
20          25          30
Thr Glu Glu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Pro Pro Thr Asp Asn Gln Gly
35          40          45
Ile Ala Pro Ser Gly Glu Ile Glu Asn Glu Gly Ala Pro Ala Val Gln
50          55          60
Gly Pro Asp Met Glu Ala Phe Gln Gln Glu Leu Ala Leu Leu Lys Ile
65          70          75          80
Glu Asp Glu Pro Gly Asp Gly Pro Asp Val Arg Glu Gly Ile Met Pro
85          90          95
Thr Phe Asp Leu Thr Lys Val Leu Glu Ala Gly Asp Ala Gln Pro
100         105         110

```

<210> 38

<211> 520

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-30-

```

<400> 38
gagttgtgag ggtgtgaggg tgcgttcct gctgtctgga ctttttctgt cccactgaga 60
cgcagctgtg tgaatatga ttggcgagg aagatcaaca tataggccta ggccgaggag 120
aagtgtacca cctcctgagc tgattgggac tatgtggag ccoggtgatg aggagcctca 180
gcaagaggaa ccaccaactg aaagtcggga tctgcacct ggtcaggaga gagaagaaga 240
tcagggtgca gctgagactc aagtgcctga cctggaagct galctccagg agctgttcca 300
gtcaaaagact ggggggtgaat gtggaaatgg tctgatgac caggggaaga ttctgccaaa 360
atcagaacaa tttaaaatgc cagaaggagg tgacaggcaa ccacaggttt aatgaagac 420
aagctgaaac aacccaaaac tgtttttatt taagatattt gacttaaaaa tctgaaata 480
aacttttgca gcttttcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 520

```

<210> 39

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

```

Met Ile Trp Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Ser
1         5         10         15
Val Pro Pro Pro Glu Leu Ile Gly Pro Met Leu Glu Pro Gly Asp Glu
20        25        30
Glu Pro Gln Gln Glu Glu Pro Pro Thr Glu Ser Arg Asp Pro Ala Pro
35        40        45
Gly Gln Glu Arg Glu Glu Asp Gln Gly Ala Ala Glu Thr Gln Val Pro
50        55        60
Asp Leu Glu Ala Asp Leu Gln Glu Leu Ser Gln Ser Lys Thr Gly Gly
65        70        75        80
Glu Cys Gly Asn Gly Pro Asp Asp Gln Gly Lys Ile Leu Pro Lys Ser
85        90        95
Glu Gln Phe Lys Met Pro Glu Gly Gly Asp Arg Gln Pro Gln Val
100       105       110

```

<210> 40

<211> 756

<212> DNA

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-31-

<213> Homo sapiens

```

<400> 40
aggctagtag aggcggggg tgtgaatcg cagagggttc tggacacctg cctcagtgtg    60
catgttcaact gggcatcttc cttcgaccc ctttcccac gtggtgaccg ctggggagct    120
gtgagagtgt gaggggcacg ttccagcct ctggactctt tctctctac tgagacgcag    180
cctataggtc cgcaggccag tctcccagc aactgaaata gtgaaatatg agttggcgag    240
gaagatcaac atataggcct aggccaaaga gaagtttaca gcctcctgag ctgattgggg    300
ctatgcttga acccactgat gaagagccta aagaagagaa accaccact aaaagtcgga    360
atctacaccc tgatcagaag agagaagatg atcagggtgc agctgagatt caagtgcctg    420
acctggaagc cgtctccag gagctatgtc agacaaagac tggggatgga tgtgaaggtg    480
gtactgatgt caaggggaag attotacca aagcagagca ttttaaatg ccagaagcag    540
gtgaaggga aacacaggtt taaaggaaga taagctgaaa caacacaaac tgtttttata    600
ttagatattt tactttaaaa tatcttaata aagttttaag cttttctcca aaaaaaaaaa    660
aaaaaaaaa aacttggggg ctctatgggg ggggggaaaa gggggttga aggggcccggg    720
gccatggggg ttccgggacc cagttttttg gtccag                                756

```

<210> 41

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

Met Ser Trp Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Ser
1          5          10          15
Leu Gln Pro Pro Glu Leu Ile Gly Ala Met Leu Glu Pro Thr Asp Glu
20          25          30
Glu Pro Lys Glu Glu Lys Pro Pro Thr Lys Ser Arg Asn Pro Thr Pro
35          40          45
Asp Gln Lys Arg Glu Asp Asp Gln Gly Ala Ala Glu Ile Gln Val Pro
50          55          60
Asp Leu Glu Ala Asp Leu Gln Glu Leu Cys Gln Thr Lys Thr Gly Asp
65          70          75          80

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-32-

Gly Cys Glu Gly Gly Thr Asp Val Lys Gly Lys Ile Leu Pro Lys Ala
85 90 95

Glu His Phe Lys Met Pro Glu Ala Gly Glu Gly Lys Ser Gln Val
100 105 110

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 42
aggccgagga gaagtgtacc 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 43
aacctgtggt tgcctgtcac 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 44
agccgtctgg actctttctc 20

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-33-

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 45

tgatttcct tcaactgctt c

21

<210> 46

<211> 334

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

tgaggatcgc gttcctgctg tcgggaacttt ttctgtcctg ctgagacgca gcgtgtgaaa 60

tatgattttgg agagtaagat caacatatag gcctagacca aggagaagcg taccacctcc 120

tgagctgatt gggcctatgc tggagcccag tgatgaggaa cctcagcaag aggaaccacc 180

aactgaaaagt cgggatacta cacctgtacc tgacctggaa actgatctcc aggagctgtc 240

tcagtcaaag actggggatg aatgcagaga tggtcctgat gacaagggga agattctgcc 300

aaaatcagag caatttaaaa tgccagaagg aggt 334

<210> 47

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Ile Trp Arg Val Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Ser
1 5 10 15Val Pro Pro Pro Glu Leu Ile Gly Pro Met Leu Glu Pro Ser Asp Glu
20 25 30

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-34-

Glu Pro Gln Gln Glu Glu Pro Pro Thr Glu Ser Arg Asp Pro Thr Pro
 35 40 45
 Val Pro Asp Leu Glu Thr Asp Leu Gln Glu Leu Ser Gln Ser Lys Thr
 50 55 60
 Gly Asp Glu Cys Arg Asp Gly Pro Asp Asp Lys Gly Lys Ile Leu Pro
 65 70 75 80
 Lys Ser Glu Gln Phe Lys Met Pro Glu Gly Gly
 85 90

<210> 48
 <211> 1878
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 acagagctgg tgggagctgg gaataggatga aaacctgtgc tcctgtgtgag ttggcaggac 60
 gggagcctcc tgttccctgg ctgctgttgt gccaccgag ccgcagccct ggagccaggc 120
 atccctgtgc ttggggatca gacgagcag gacgagatcc tctccctct ggtgtcagct 180
 gcagctgcc agccatggct gtggtcccg aagtctctgt gctcttggga gctgggagg 240
 cctctgcct cctgccccct acgcactcca gagtctctc tctgttgaga gctaagcaga 300
 catcaggact accagctgca gagaggagct accactgtg gccttcgtct ctgctgagag 360
 ctgaacactc actgggacgc cctgcctatg gaaaccagct gttcactctg ggtctctct 420
 gagctgttct gtcgtctcagt aaaggtcttc ttctgtttac tcgcccccca ttgtctgcc 480
 ttacctcatt catcctggac acaggacaag aacttgggac ttgccgttat ggtggagcta 540
 aaatagctgt aacacaaaca ggattgaaac atgccccctg ctgccacat tgtggatgac 600
 aagaggaggagg gaagaaagga gagaagatct gcgacccttc ggcaaaccca gacttaggag 660
 atcgggagagc caagactgtg acacccttct tggggctctg tggttcctgg cgtctccaag 720
 cttctgggca cctcggtctt ccccggtgcc agtcgtggaa gctgctgtg gccctcattt 780
 gctgtttggg aaactctcta cgctatgaat gttagctggc agcaaacact gccctccact 840
 acaggggcac acagtgttgg tgcctgcttt tccaccctcc acttccaaca ggaagcaagc 900
 acaggaccoca agcattgcag acagttgtat cacgccaatg tgcattcgga gccactgaca 960
 gagtcttgct ttgtcaccga ggctggagta cagtggcgtg atcacagctt actgaaacgt 1020
 ctgcgtctca ggttcaagcg atttttctgc ctcagcctct ggtgtagctg gaattacagt 1080

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-35-

gttagcagtc actgatgctc aaacatgaga agactgggac atccatcaga taagaaacgc 1140
tgcccaaaagt gttagactaa taagtacag ggttgacaa tgaacccaac cactcaacct 1200
tcgggaaaag tctggagag gatgtggaga aataggaaca cttttacact gttggtgagg 1260
ctgtaaacta gttcaacct tgtggaagtc agtgtggcga ttcttcagag atgtagaact 1320
agaaataacca ttgacccag ccatccatt actgggtatg tacccaaagg attataaatc 1380
atgctgctat aaagacacat acacacgtat gtttattgtg gcactattca caacagcaaa 1440
gacatggaat caacccaaat gtccaacaac gatagactgg attaagaaa tgtggcacat 1500
atacaccatg gaatactatg cagccataaa aatgatgag ttcatgtctt ttgtagggac 1560
atggatgagg ctaggagaag caattccttt cctgaggaaa atagaactca ctctgccctg 1620
gcttgatga ggaggaaatag gatataagca gttgaggaa aacggtccat gagttgccat 1680
ccttcctctt tctgctctgc cagaagaggt agagccact gaagaaggag cagaataagg 1740
aatggaacc ttagttacaa gtccaagaaa ttctaccac tctactattt ttttatgtgt 1800
aacttgattt atagttttta ctttgaaga atgtaactat tgtacatgtt tcataaagta 1860
tcaatagctg aatagacc 1878

<210> 49

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Thr Arg Gly Arg Glu Glu Arg Arg Glu Asp Leu Arg Pro Phe Gly
1 5 10 15

Lys Pro Arg Leu Arg Arg Ser Glu Ser Gln Asp Cys Asp Thr Leu Ser
20 25 30

Gly Ala Leu Trp Phe Leu Ala Ser Pro Ser Phe Trp Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Ser Pro Val Pro Val Val Glu Ala Ala Cys Gly Leu His Leu Leu Phe
50 55 60

Gly Lys Leu Ser Thr Leu
65 70

<210> 50

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-36-

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Thr Arg Gly Arg Glu Glu Arg Arg Glu Asp Leu Arg Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Lys Pro Arg Leu Arg Arg Ser Glu Ser Gln Asp Cys Asp Thr Leu Ser
 20 25 30

Gly Ala Leu Trp Phe Leu Ala Ser Pro Ser Phe Trp Ala Pro Arg Leu
 35 40 45

Ser Pro Val Pro Val Val Glu Ala Ala Cys Ala Glu Ser Cys Phe Val
 50 55 60

Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asp His Ser Leu Leu Lys Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Leu Arg Phe Lys Arg Phe Phe Cys Leu Ser Leu Trp Cys Ser Trp
 85 90 95

Asn Tyr Ser Val Ser Ser His
 100

<210> 51

<211> 778

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

caggagtgagg gtcagcagga ggaactctac agctatggga gaacctgcgt tcacctcttt 60

tccaagcctg cctgttcttg ggaagctcaa aaggaacatg atgccctggg ctttacagaa 120

gaaacagaaa atccacatgg ccaaggccca tcggagacga gctgcgaggt ctgctctccc 180

catgagactc accagctgca tcttccggag gccggtgaca aggatcaggt ctcctcctga 240

caaccaggtc agacgcagaa aaggggacga gcacctggag aagccgcagc aactctgcgc 300

ctaccggaga ctgcaggccc tgcagccctg cagcagccaa ggagaagggt caagtccact 360

gcattgggag agcgtcttaa gtatccttgc accggggacg gccagtgaat ctctggacag 420

ggctggtgct gagcgtgtgc gcagcccgtc tgagcccacc cctgggctgt ttccagctgt 480

ggcagggggg ccaaccccag gaatgggttg tcagctccca ccgccctctc ctggccaatt 540

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-37-

```

ggtgactcct gcagatatcc ggagacaggc caggagggtg aagaaagcca gggagagact    600
ggccaaggcc ttgcaggcag acaggctggc caggcaggca gaaatgctga catgtatg    660
aagcgcagtc ctgggctttc ggtccctttc ttttaatgcc catcctcatt cctactctga    720
attgtcacac ttttcccttc cccaccagtt ctttaataaa agtatttgaa aggcaaaa    778

```

<210> 52

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

```

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

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-38-

195 200 205
Leu Ala Arg Gln Ala Glu Met Leu Thr Cys Arg
210 215

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 53

tgggacatcc atcagataag

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 54

tttatggctg catagtattc

20

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-39-

<400> 55
gctatgggag aacctgcgtt c

21

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 56
tccttggtt tttcacct c

21

<210> 57

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Met Ser Trp Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
1 5 10 15
Val Glu Pro Pro Glu Met Ile Gly Pro Met Arg Pro Glu Gln Phe Ser
20 25 30
Asp Glu Val Glu Pro Ala Thr Pro Glu Glu Gly Glu Pro Ala Thr Gln
35 40 45
Arg Gln Asp Pro Ala Ala Ala Gln Glu Gly Glu Asp Glu Gly Ala Ser
50 55 60
Ala Gly Gln Gly Pro Lys Pro Glu Ala His Ser Gln Glu Gln Gly His
65 70 75 80
Pro Gln Thr Gly Cys Glu Cys Glu Asp Gly Pro Asp Gly Gln Glu Met
85 90 95
Asp Pro Pro Asn Pro Glu Glu Val Lys Thr Pro Glu Glu Gly Glu Lys
100 105 110
Gln Ser Gln Cys
115

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-40-

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 58

accaaggaga agcgtaccac

20

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 59

gggaccatct ctgcattcat c

21

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-I-

SEQUENCE LISTING

<110> LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

OLD, LLOYD

SCANLAN, MATTHEW

CHEN, YAO-TSENG

<120> CANCER-TESTIS ANTIGENS

<130> L0461/7125WO(JRV)

<150> 10/054,683

<151> 2002-01-22

<150> 60/280,718

<151> 2001-03-30

<150> 60/285,154

<151> 2001-04-20

<150> 60/327,432

<151> 2001-10-05

<160> 59

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 20

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-2-

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 1
aggaattatg aaaccacttg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 2
gacaacagtt gtatcagacc

20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 3
caaggagagg tcgtgtcttc g

21

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-3-

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 4

ggatcttggtt acatgctcac tcatatc

27

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 5

ccagattaag aataacgttc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 6

agaggaaatg accaagagtc

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-4-

<400> 7
acaagactag cttatgtgtg g 21

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

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 8
ttgagcaaga atcttgactt c 21

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 9
gggagtattg acagtggcaa ttt 23

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 10
tggttccaat gtacgcctt tc 22

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-5-

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 11

ccacctgtag ctataccagc cagactccc

29

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 12

gcagagtccc ctccctgac

19

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 13

acaggaactg gctctgctta aga

23

<210> 14

<211> 26

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-6-

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 14

tcaggaccat ctccaggtgc atcctc

26

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 15

ccagagctctc atgttaaaat cacttaca

28

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 16

gaaacacttc ctctctttct ttaagtacaa

30

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-7-

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 17

accagaaaag accaccactt tgcaggta

28

<210> 18

<211> 2640

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 18

catctcgcac	ttccaactgc	cctgtaacca	ccaactgcc	ttattcggc	tgggaccag	60
gacttcaagc	catgtgggtc	ttgtttctgc	tcagcgggct	cggcgggctg	cggatggaca	120
gtaattttga	tagtttacct	gtgcaaatta	cagttccgga	gaaaatacgg	tcaataataa	180
aggaagggaat	tgaatcgag	gcacccatca	aaattgtaat	tgaagggaat	ccatatactg	240
tgaatttaat	gcaaaaaaac	tttttaccac	ataattttga	agtttacagt	tatagtggca	300
caggaattat	gaaaccactt	gaccaagatt	ttcagaattt	ctgccactac	caagggtata	360
ttgaagggtta	tccaaaatct	gtgggtgatg	ttagcacatg	tactggactc	aggggcgtac	420
tacagtttga	aaatgttagt	tatggaatag	aaccctgga	gtcttcagtt	ggctttgaac	480
atgtaattta	ccaagtaaaa	cataagaaag	cagatgttcc	cttatataat	gagaaggata	540
ttgaatcaag	agatctgtcc	tttaaatcac	aaagcgaga	gccacagcaa	gattttgcaa	600
agtatataga	aatgcattgt	atagttgaaa	aacaattgta	taatcatatg	gggtctgata	660
caactgttgt	cgtcaaaaa	gttttccagt	tgattggatt	gacgaatgct	atttttgttt	720
catttaatat	tacaattatt	ctgtcttcat	tggagctttg	gatagatgea	aataaaattg	780
caaccactgg	agaagctaag	gagttattac	acacattttt	aagatggaaa	acatcttacc	840
ttgttttacg	tctcatgat	gtggcatttt	tacttggtta	cagagaaaag	tcaaatatag	900
ttggtgcaac	ctttcaaggg	aagatgtgtg	atgcaaaacta	tgcaggaggt	gttgttctgc	960
acccagaaac	cataagtcctg	gaatcacttg	cagttatttt	agctcaatta	ttgagcctta	1020
gtatggggat	cacttatgat	gacattaaca	aatgccagtg	ctcaggagct	gtctgcatta	1080
tgaatccaga	agcaattcat	ttcagtgggtg	tgaagatctt	tagtaactgc	agcttcgaag	1140

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-8-

actttgcaca ttttatttca aagcagaagt cccagtgtct tcacaatcag cctcgcttag 1200
atcctttttt caaacagcaa gcagtgtgtg gtaatgcaaa gctggaagca ggagaggagt 1260
gtgactgtgg gactgaacag gatttgtccc ttattggaga aacatgctgt gatattgcca 1320
catgtagatt taaagccggt tcaaatctgt ctgaaggacc atgctgcgaa aactgtctat 1380
ttatgtcaaa agaagaatg tglaggcctt cctttgaaga atgcgacctc cctgaatatt 1440
gcaatggatc atctgcatca tgcccagaaa accactatgt tcagactggg catccgtgtg 1500
gactgaatca atggatctgt atagatggag ttgtatgag tggggataaa caatgtacag 1560
acacatttgg caaagaagta gaggttggcc cttcagaatg ttattctcac ctttaattcaa 1620
agactgatgt atctggaac tgtgtatata gtgattcagg atacacacag tgtgaagctg 1680
acaatctgca gtgcggaaaa ttaatatgta aatatgtagg taaattttta ttacaaattc 1740
caagagccac tattatttat gccaacataa gtggacatct ctgcattgct gtggaatttg 1800
ccagtgtatc tgcagacagc caaaagatgt ggataaaga tggaaactct tgtggttcaa 1860
ataagggttg caggaaatcaa agatgtgtga gttcttcata cttgggttat gattgtacta 1920
ctgacaaatg caatgataga ggtgtatgca ataacaaaa gcactgtcac tgtagtgtct 1980
catatttacc tccagattgc tcagttcaat cagatctatg gcctgggtgg agtattgaca 2040
gtggcaattt tccacctgta gctataccag ccagactccc tgaaggcgcc tacattgaga 2100
acatttacca ttccaaacca atgagatggc catttttctt attcattcct ttctttatta 2160
ttttctgtgt actgattgct ataatgggtg aagttaattt ccaaaggaaa aaatggagaa 2220
ctgaggacta ttcaagcgat gagcaacctg aaagtgaag tgaacctaaa gggtagtctg 2280
gacaacagag atgccatgat atcacttctt cttagagtaat tatctgtgat ggatggacac 2340
aaaaaaatgg aaagaaaaga atgtacatta cctgggtttcc tgggattcaa acctgcata 2400
tgtatttata attgaccag aaaatatgat atatatgtat aatttcacag ataatttact 2460
tatttaaaaa tgcattgataa tgagttttac attacaaatt tctgtttttt taaagttatc 2520
ttacgtatct tctgttggtt agtagacact aattctgtca gtaggggcat ggtataagga 2580
aatatcataa tgtaatgagg tgggtactatg attaaaagcc actgtttacat ttcaaaaaaa 2640

<210> 19

<211> 734

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-9-

<400> 19

```

Met Trp Val Leu Phe Leu Leu Ser Gly Leu Gly Gly Leu Arg Met Asp
1      5      10      15
Ser Asn Phe Asp Ser Leu Pro Val Gln Ile Thr Val Pro Glu Lys Ile
20     25     30
Arg Ser Ile Ile Lys Glu Gly Ile Glu Ser Gln Ala Ser Tyr Lys Ile
35     40     45
Val Ile Glu Gly Lys Pro Tyr Thr Val Asn Leu Met Gln Lys Asn Phe
50     55     60
Leu Pro His Asn Phe Arg Val Tyr Ser Tyr Ser Gly Thr Gly Ile Met
65     70     75     80
Lys Pro Leu Asp Gln Asp Phe Gln Asn Phe Cys His Tyr Gln Gly Tyr
85     90     95
Ile Glu Gly Tyr Pro Lys Ser Val Val Met Val Ser Thr Cys Thr Gly
100    105    110
Leu Arg Gly Val Leu Gln Phe Glu Asn Val Ser Tyr Gly Ile Glu Pro
115    120    125
Leu Glu Ser Ser Val Gly Phe Glu His Val Ile Tyr Gln Val Lys His
130    135    140
Lys Lys Ala Asp Val Ser Leu Tyr Asn Glu Lys Asp Ile Glu Ser Arg
145    150    155    160
Asp Leu Ser Phe Lys Leu Gln Ser Ala Glu Pro Gln Gln Asp Phe Ala
165    170    175
Lys Tyr Ile Glu Met His Val Ile Val Glu Lys Gln Leu Tyr Asn His
180    185    190
Met Gly Ser Asp Thr Thr Val Val Ala Gln Lys Val Phe Gln Leu Ile
195    200    205
Gly Leu Thr Asn Ala Ile Phe Val Ser Phe Asn Ile Thr Ile Ile Leu
210    215    220
Ser Ser Leu Glu Leu Trp Ile Asp Glu Asn Lys Ile Ala Thr Thr Gly
225    230    235    240
Glu Ala Asn Glu Leu Leu His Thr Phe Leu Arg Trp Lys Thr Ser Tyr
245    250    255
Leu Val Leu Arg Pro His Asp Val Ala Phe Leu Leu Val Tyr Arg Glu
260    265    270
Lys Ser Asn Tyr Val Gly Ala Thr Phe Gln Gly Lys Met Cys Asp Ala
275    280    285
Asn Tyr Ala Gly Gly Val Val Leu His Pro Arg Thr Ile Ser Leu Glu

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-10-

```

      290              295              300
Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala Gln Leu Leu Ser Leu Ser Met Gly Ile
305              310              315              320
Thr Tyr Asp Asp Ile Asn Lys Cys Gln Cys Ser Gly Ala Val Cys Ile
              325              330              335
Met Asn Pro Glu Ala Ile His Phe Ser Gly Val Lys Ile Phe Ser Asn
              340              345              350
Cys Ser Phe Glu Asp Phe Ala His Phe Ile Ser Lys Gln Lys Ser Gln
              355              360              365
Cys Leu His Asn Gln Pro Arg Leu Asp Pro Phe Phe Lys Gln Gln Ala
              370              375              380
Val Cys Gly Asn Ala Lys Leu Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly
385              390              395              400
Thr Glu Gln Asp Cys Ala Leu Ile Gly Glu Thr Cys Cys Asp Ile Ala
              405              410              415
Thr Cys Arg Phe Lys Ala Gly Ser Asn Cys Ala Glu Gly Pro Cys Cys
              420              425              430
Glu Asn Cys Leu Phe Met Ser Lys Glu Arg Met Cys Arg Pro Ser Phe
              435              440              445
Glu Glu Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Ser Ser Ala Ser Cys
              450              455              460
Pro Glu Asn His Tyr Val Gln Thr Gly His Pro Cys Gly Leu Asn Gln
465              470              475              480
Trp Ile Cys Ile Asp Gly Val Cys Met Ser Gly Asp Lys Gln Cys Thr
              485              490              495
Asp Thr Phe Gly Lys Glu Val Glu Phe Gly Pro Ser Glu Cys Tyr Ser
              500              505              510
His Leu Asn Ser Lys Thr Asp Val Ser Gly Asn Cys Gly Ile Ser Asp
              515              520              525
Ser Gly Tyr Thr Gln Cys Glu Ala Asp Asn Leu Gln Cys Gly Lys Leu
              530              535              540
Ile Cys Lys Tyr Val Gly Lys Phe Leu Leu Gln Ile Pro Arg Ala Thr
545              550              555              560
Ile Ile Tyr Ala Asn Ile Ser Gly His Leu Cys Ile Ala Val Glu Phe
              565              570              575
Ala Ser Asp His Ala Asp Ser Gln Lys Met Trp Ile Lys Asp Gly Thr
              580              585              590
Ser Cys Gly Ser Asn Lys Val Cys Arg Asn Gln Arg Cys Val Ser Ser
              595              600              605

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-11-

Ser Tyr Leu Gly Tyr Asp Cys Thr Thr Asp Lys Cys Asn Asp Arg Gly
610 615 620

Val Cys Asn Asn Lys Lys His Cys His Cys Ser Ala Ser Tyr Leu Pro
625 630 635 640

Pro Asp Cys Ser Val Gln Ser Asp Leu Trp Pro Gly Gly Ser Ile Asp
645 650 655

Ser Gly Asn Phe Pro Pro Val Ala Ile Pro Ala Arg Leu Pro Glu Arg
660 665 670

Arg Tyr Ile Glu Asn Ile Tyr His Ser Lys Pro Met Arg Trp Pro Phe
675 680 685

Phe Leu Phe Ile Pro Phe Phe Ile Ile Phe Cys Val Leu Ile Ala Ile
690 695 700

Met Val Lys Val Asn Phe Gln Arg Lys Lys Trp Arg Thr Glu Asp Tyr
705 710 715 720

Ser Ser Asp Glu Gln Pro Glu Ser Glu Ser Glu Pro Lys Gly
725 730

<210> 20

<211> 528

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 20
ggcagaggc ttctttttt cgcctcttt cgttctttcc aacatcttcg ttctttctca 60
ctgaccgaga ctcagccgtg agagatatga gtgagcatgt aacaagatcc caatctctag 120
aaagagagaaa tgaccaagag tcttcccagc cagttggacc tgtgattgtc cagcagccca 180
ctgaggaaaa acgtcaagaa gaggaaccac caactgataa tcagggtatt gcacctagtg 240
gggagatcaa aatgaagga gcacctgctg ttcaaggagc tgatgtggaa gcttttcaac 300
aggaactgyc tctgcttaag atagaggatg cacctggaga tggctctgat gtcagggagg 360
ggactctgcc cacttttgat ccactaaag tgctggaagc aggtgaaggg caactatagg 420
tttaaaccaa gacaaatgaa gactgaaacc aagaatattg ttcttatgct ggaaatttga 480
ctgctaacat tctcttaata aagttttaca gttttctgca aaaaaaaaa 528

<210> 21

<211> 110

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-12-

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 21

```

Met Ser Glu His Val Thr Arg Ser Gln Ser Ser Glu Arg Gly Asn Asp
1           5           10           15
Gln Glu Ser Ser Gln Pro Val Gly Pro Val Ile Val Gln Gln Pro Thr
20           25           30
Glu Glu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Pro Pro Thr Asp Asn Gln Gly Ile
35           40           45
Ala Pro Ser Gly Glu Ile Lys Asn Glu Gly Ala Pro Ala Val Gln Gly
50           55           60
Thr Asp Val Glu Ala Phe Gln Gln Glu Leu Ala Leu Leu Lys Ile Glu
65           70           75           80
Asp Ala Pro Gly Asp Gly Pro Asp Val Arg Glu Gly Thr Leu Pro Thr
85           90           95
Phe Asp Pro Thr Lys Val Leu Glu Ala Gly Glu Gly Gln Leu
100          105          110

```

<210> 22

<211> 877

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 22

```

ggcagcagagc ttgttcacgg catccttaga aacaaactgc aattttatct catttccttg      60
tcgttcatac aaagattaca agactagcct atgtgtggac tgtgactgtt ttaaggaaaa      120
atcatgtcct cggctggggt atcaagccaa gctatttaaa ggtgttttaa aagaaaggat      180
ggaaggaaga cctcttagga ccactgtgtt ttgggataca agtgggtacat atccattctg      240
tacctattat ttgtttctca gtataattgt tccagataaa actatgatgg atggctcgtt      300
ttcatttaaa ttattaaatc agcttgaaat gattgaagag ccaaggtttt atgaaaagaa      360
caaaccattt tataaacttc aagaagtcaa gattcttgct caattttata atgactttgt      420
aaatatttca agcattgggt tgacatatct ccagagctca aatctgcagt gttccacatg      480
cacatacaag atccagagtc tcatgttaaa atcacttaca taccagaaaa gaccaccact      540
ttgcagggtat aatattgtac ttaaagaaag agaggaagtg ttctttaatc caaacacatg      600

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-13-

```

tacaccaaag aacacataag atgccttctt ccatcaaatg cacttgcttg tgaattaatg   660
gacttgtaaa tgaacaatg caatcagctt ttataatac actgttcaat ttgagattca   720
agtatttcta ttcttggaa aaaattttaa gaatcaaaaa taaagaaaat aaaaagtcca   780
tacagttaaa cattccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaattggcg gccgcaagct   840
tattcccttt agtgagggtt aattttagct tggcact                               877

```

<210> 23

<211> 205

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 23

```

Ala Arg Gly Leu Phe Met Ala Ser Leu Glu Thr Asn Cys Asn Phe Ile
1      5      10      15
Ser Phe Pro Cys Arg Ser Tyr Lys Asp Tyr Lys Thr Ser Leu Cys Val
20     25     30
Asp Cys Asp Cys Phe Lys Glu Lys Ser Cys Pro Arg Leu Gly Tyr Gln
35     40     45
Ala Lys Leu Phe Lys Gly Val Leu Lys Glu Arg Met Glu Gly Arg Pro
50     55     60
Leu Arg Thr Thr Val Phe Leu Asp Thr Ser Gly Thr Tyr Pro Phe Cys
65     70     75     80
Thr Tyr Tyr Phe Val Leu Ser Ile Ile Val Pro Asp Lys Thr Met Met
85     90     95
Asp Gly Ser Phe Ser Phe Lys Leu Leu Asn Gln Leu Glu Met Ile Glu
100    105    110
Glu Pro Arg Leu Tyr Glu Lys Asn Lys Pro Phe Tyr Lys Leu Gln Glu
115    120    125
Val Lys Ile Leu Ala Gln Phe Tyr Asn Asp Phe Val Asn Ile Ser Ser
130    135    140
Ile Gly Leu Thr Tyr Phe Gln Ser Ser Asn Leu Gln Cys Ser Thr Cys
145    150    155    160
Thr Tyr Lys Ile Gln Ser Leu Met Leu Lys Ser Leu Thr Tyr Pro Glu
165    170    175
Arg Pro Pro Leu Cys Arg Tyr Asn Ile Val Leu Lys Glu Arg Glu Glu
180    185    190

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-14-

Val Phe Leu Asn Pro Asn Thr Cys Thr Pro Lys Asn Thr
 195 200 205

<210> 24

<211> 2270

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 24
 gggcacattg cagattgttc gggtaaattt aaaatgctag agcatgccct acgtgatgcc 60
 aagatggcgg agacttgat tgtgaaagaa aagcaagatt ataagcagaa attgaaggca 120
 cttaagattg aagtaacaa actaaaagag gacctcaatg aaaagacgac agaaaataat 180
 gagcaacgag aagagatcat tcgcctcaag caagagaaaa gttgcctgca cgatgaattg 240
 ctttttactg tagagagaga aaagaggaaa gatgaattgc ttaattattgc gaagtcaag 300
 caagaacgca caaattcaga actgcacaat ctgagacaga ttatgtataa acaacagagt 360
 gatctgcagt ttcttaattt caatgtggaa aattctcagg aattaatata gatgtatgac 420
 tcaaagatgg aggaatcaaa ggctctggac tccagcagag acatgtgttt atcagacctt 480
 gaaaataacc acccaaaagt cgatattaag agggaaaaaa atcagaagtc actgtttaag 540
 gaccagaaat ttgaagccat gttggttcag caaatagggt cagacaagag ctcttgccat 600
 gaatgcaaat agaagaaca acagatcgat actgtgtttg gggagaaaaa tgtaattacg 660
 ctgtcatcca tattcaccaa agacttagta gagaacaca acctcccttg gtctctggga 720
 ggaaaaaccc agattgaacc cgaaaacaaa attacattgt gcaagatcca cacaaaatca 780
 ccaaaatgtc atggcactgg ggttcagaac gaaggaaaac aacctcaga aacacccact 840
 ttatctgatg agaagcagtg gcatgatgac agtgtttacc tgggcctgac caactgtcca 900
 agttcaaaac atccagaaaa gctggatgta gaatgtcaag atcagatgga aaggtccgaa 960
 atctcatgct gccagaaaaa tgaagcctgt ctgggcgaaa gtggcatgtg tgactccaag 1020
 tgctgccacc cgagtaactt cataattgaa gccccaggcc acatgtctga cgtggagtgg 1080
 atgagtattt tcaagccttc caaaatgcag agaattgtcc gcccaaatc tgggtgcacc 1140
 tgttcagaaa gcatctgtgg cacacaacat gactccccgg caagtgaact aattgccatc 1200
 caagattccc actcttllgg ttcttcaaaa tctgccttga gagaagatga gacggagtcc 1260
 tcttccaata aaaagaactc acctacgagt ttgttaatct acaaagatgc accagcattc 1320

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-15-

```

aatgaaagg cttcaattgt gttaccctcc caggatgatt tctgcccac gagcaagctc 1380
cagcgtttgc tggcgggaatc tegtccagatg gtgacggacc tggagctgaa cacactgctg 1440
cccatcagcc atgagaatct cactggcagt gccacaaata ttctctatct atgtggaagg 1500
cagaagcag acaccaatac tgaatgaata cttaccgta aaactgaaag aggattctag 1560
ttcttcataa acggcactta attccagctg ggagcagaac tagaaagtta atttttaaac 1620
atctacactt cattttcaag ttaaccattt ttgtgctgaa gaaatatatt catgtgtaag 1680
aaagtagacc ttattgtaca tatagaaagt tgggaattatg ctaagaatga aaaagacttc 1740
tctgtaaaga tacagactac agttaaatgc tagagaagct ctttaaaaat gtgaatgtca 1800
aatagagaaa gaacccctgc atagaaagtg ctgttttaac tatctgattt ttaaaaaatc 1860
tgtgcataca tttaaattct aaacaatagc ttatcagagt cagctcaaaa tatatgagaa 1920
acagtattct ctcattggtt tagcttttga ctttgcgtg taaatagaca taagggtgctt 1980
tgatataaaa tataaagtgt aactggaaaa tagctcgagg tccttctgtc ccaagctgag 2040
cagagcccca tctttctggg tctatattag tcccacctac tgacacaaac aaaagcttgc 2100
tgggaagatcg agtttttagac gcatttttaa aaatcttaa gactaaaaa cttccatttt 2160
aacttgtaaa gtaatttaat tttttaaaga ttatactata tgcctctgtg tcttctctaa 2220
aagaatagat caacttcagt ccataaaaga tatttttaat attaaagaaa 2270

```

<210> 25

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 25

```

Met Leu Glu His Ala Leu Arg Asp Ala Lys Met Ala Glu Thr Cys Ile
1           5           10           15
Val Lys Glu Lys Gln Asp Tyr Lys Gln Lys Leu Lys Ala Leu Lys Ile
20           25           30
Glu Val Asn Lys Leu Lys Glu Asp Leu Asn Glu Lys Thr Thr Glu Asn
35           40           45
Asn Glu Gln Arg Glu Glu Ile Ile Arg Leu Lys Gln Glu Lys Ser Cys
50           55           60
Leu His Asp Glu Leu Leu Phe Thr Val Glu Arg Glu Lys Arg Lys Asp
65           70           75           80

```

PCT/US02/09808

Glu	Leu	Leu	Asn	Ile	Ala	Lys	Ser	Lys	Gln	Glu	Arg	Thr	Asn	Ser	Glu
85				90				95							
Leu	His	Asn	Leu	Arg	Gln	Ile	Tyr	Val	Lys	Gln	Gln	Ser	Asp	Leu	Gln
100				105				110							
Phe	Leu	Asn	Phe	Asn	Val	Glu	Asn	Ser	Gln	Glu	Leu	Ile	Gln	Met	Tyr
115				120				125							
Asp	Ser	Lys	Met	Glu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Asp	Ser	Ser	Arg	Asp	Met
130				135				140							
Cys	Leu	Ser	Asp	Leu	Glu	Asn	Asn	His	Pro	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg
145				150				155							
Glu	Lys	Asn	Gln	Lys	Ser	Leu	Phe	Lys	Asp	Gln	Lys	Phe	Glu	Ala	Met
165				170				175							
Leu	Val	Gln	Gln	Asn	Arg	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Cys	Asp	Glu	Cys	Lys
180				185				190							
Glu	Lys	Lys	Gln	Gln	Ile	Asp	Thr	Val	Phe	Gly	Glu	Lys	Ser	Val	Ile
195				200				205							
Thr	Leu	Ser	Ser	Ile	Phe	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Glu	Lys	His	Asn	Leu
210				215				220							
Pro	Trp	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Thr	Gln	Ile	Glu	Pro	Glu	Asn	Lys	Ile
225				230				235							
Thr	Leu	Cys	Lys	Ile	His	Thr	Lys	Ser	Pro	Lys	Cys	His	Gly	Thr	Gly
245				250				255							
Val	Gln	Asn	Glu	Gly	Lys	Gln	Pro	Ser	Glu	Thr	Pro	Thr	Leu	Ser	Asp
260				265				270							
Glu	Lys	Gln	Trp	His	Asp	Val	Ser	Val	Tyr	Leu	Gly	Leu	Thr	Asn	Cys
275				280				285							
Pro	Ser	Ser	Lys	His	Pro	Glu	Lys	Leu	Asp	Val	Glu	Cys	Gln	Asp	Gln
290				295				300							
Met	Glu	Arg	Ser	Glu	Ile	Ser	Cys	Cys	Gln	Lys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu
305				310				315							
Gly	Glu	Ser	Gly	Met	Cys	Asp	Ser	Lys	Cys	Cys	His	Pro	Ser	Asn	Phe
325				330				335							
Ile	Ile	Glu	Ala	Pro	Gly	His	Met	Ser	Asp	Val	Glu	Trp	Met	Ser	Ile
340				345				350							
Phe	Lys	Pro	Ser	Lys	Met	Gln	Arg	Ile	Val	Arg	Leu	Lys	Ser	Gly	Cys
355				360				365							
Thr	Cys	Ser	Glu	Ser	Ile	Cys	Gly	Thr	Gln	His	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser
370				375				380							
Glu	Leu	Ile	Ala	Ile	Gln	Asp	Ser	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Lys	Ser

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-17-

385 390 395 400

Ala Leu Arg Glu Asp Glu Thr Glu Ser Ser Ser Asn Lys Lys Asn Ser
 405 410 415

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Tyr Lys Asp Ala Pro Ala Phe Asn Glu Lys
 420 425 430

Ala Ser Ile Val Leu Pro Ser Gln Asp Asp Phe Ser Pro Thr Ser Lys
 435 440 445

Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu Ser Arg Gln Met Val Thr Asp Leu Glu
 450 455 460

Leu Asn Thr Leu Leu Pro Ile Ser His Glu Asn Leu Thr Gly Ser Ala
 465 470 475 480

Thr Asn Ile Ser His Leu Cys Gly Arg Gln Lys Ala Asp Thr Asn Thr
 485 490 495

Glu

<210> 26

<211> 996

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 26
 gtatgttcct ggcagaaaag ttgcataact tgggggttaa agacaggaat atggcacaat 60
 gccattgttg ggcagtgtcc agacagaaga agagactcat atcacctaaa tgacaaaccc 120
 agaatatgtc acaatgtatc ctggtgaaag gaccagaaac gaggatgaat tgccacatca 180
 tctggttctg agttctgaga tattcacaag tccccttaga aaacaactca ggcaagagag 240
 ttacatcacc taggagcccg ttccaccctt atgtcacagt gcttcattgtg tacaggacta 300
 agaagaaaag cacatcacct agatgataga cccagagaca cgtcacaag ccttctgaa 360
 agcatggccc tggcaaaata gtacaatcac ctttgtacct ggtctagcaa tatgtcatta 420
 ttcaagtgtg caggtaccaa ggagaggagc cactactcct atgttatatg cctgtgcta 480
 tgtcaaaatg ccttcttttc agcatggccc tgggaagaatg tatcatctca catgtgactg 540
 gcttaggaag atgtcactat cctgccatgt gtgcagggcc cattttagag attagagtta 600
 tgtcttcttc taagtcatgg acccagtgat atatcactat gatgtctgtg agaatgggca 660
 ggcaggaatg taatgtcact tgcattctag atccagtgat gtcacaattc ttactgaggg 720
 cagagccag tcagaagagt catatctttt acagggttggc ccaagtagat gtcaaaaacc 780

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-18-

```

cctatggatt agatttacaa taccacacat ctcttgtttt catgtaggag agttgectgc      840
attcatctgt gatgatgaaa gtccctactg tcagccaagt gtgcataatg gactcacaat      900
ttcctctgtt tgctaaccac tattatgaca ctctctatct aaccaacggt ttttataaaa      960
catttgcatt tgttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaa                                996

```

<210> 27

<211> 90

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 27

```

Met Ile Asp Pro Glu Thr Arg His Lys Ala Phe Leu Lys Ala Trp Pro
1           5           10           15
Trp Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Val Pro Gly Leu Ala Ile Cys His
20          25          30
Tyr Ser Ser Val Gln Val Pro Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Met Leu
35          40          45
Tyr Ala Leu Cys Tyr Val Lys Met Pro Ser Phe Gln His Gly Pro Gly
50          55          60
Arg Met Tyr His Leu Thr Cys Asp Trp Pro Arg Lys Met Ser Leu Ser
65          70          75          80
Cys His Val Cys Arg Ala His Phe Arg Asp
85          90

```

<210> 28

<211> 2347

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

```

<400> 28
gggagggttg gagccctgca taaagagaag gacgggacca cagctgactg ctgtgtcccc      60
acagatcttg gccctctgct gccaccatgg ccaaaggtgg agaagccctg ccacagggca      120
gcccagcacc agtcaggat cccacacctc tcaaggtgac agtgaagacg cccaaagaca      180
aggaggattt ctacgttaca gacacatgca ctatccagca gctgaaggaa gagatatctc      240

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-19-

```

agcgctttaa ggccccccc gatcagcttg ttctaatttt tgcaggcaaa atcctcaagg 300
atcctgactc actggcacag tgtggagtgc gagatggcct cactgtccac ctgggtcatca 360
agaggcagca cegtgccatg ggcaatgagt gccagctgc ctctgtccct acccagggcc 420
caagtctctg atcactccct cagccaagct ccatttacc agcagatggg cccctgcct 480
ttagcttagg tctctcaca ggctcagta ggctgggctt ggctatcgt ggcttccctg 540
accagccaag ctccctgatg cggcagcatg tgtctgtgct tgagtttgtg actcagctca 600
ttgatgacct ctctatcccg ggtctgtctg ccaacacagg cctagtacgc cagctgggtc 660
ttgacaacct ccatatgcag cagctgatcc agcacaacct tgagattggg catattctta 720
acaaccggga aattatgcgg cagacactgg agtttttacg taacctgcc atgatgcagg 780
agatgatacg tagccaggac cgggtgtctc gtaacttggg gagcattcct ggtgggtaca 840
atgtgtcttg cactatgtac acagatatta tggaccaat gcttaacgca gtccaggagc 900
agtttggcgg caatcccttt gccactgcca ctactgataa tgcaccacc accaccagcc 960
aaccttcaag gatggagaat tgtgacctc tccccaccc ctggacttcc acatattggg 1020
gctcaggtag caggcaagga aggcaggatg gggatcagga tgcacctgac attagaaata 1080
ggtttccaaa cttctgtggt attataaggc tctatgacta tctccagcaa ttacacgaga 1140
acccccagtc cctaggaact tatctacagg ggactgcacg tgcctcagc caaagccaag 1200
aacccaccac atcagtaaac agagttcccc catcgtcac ctcactcag gagcctgggt 1260
caggccagcc tctccccag gagtcagtag caatcaaggg aaggctctcc tccccagctt 1320
tctgagata cccacacag aacagtagtg gacaagggtg agaccaagat ggtgcaggga 1380
aaagctctac tggacatagc acaaactgc ctgatcttgt ctgggggctg ggagattctg 1440
ccaacagggt tccatttgtt ccttatctt tttccccac ggcagccatt cctggaatcc 1500
ctgagccctc ctggctgcca tccccggctt atccaagac tctgaggcca gatggcatga 1560
atccagctcc acagttacag gatgagatac aaccacagct gccactgctg atgcaccttc 1620
aggcagccat ggcaaacccc cgtgcctgc aagccctgcg gcagattgag cagggtctac 1680
aggctctagc tactgaagca cctcgctcc tactctgggt catgccttgc ctagcagggg 1740
cgggtagtgt ggcaggaggt atagagtcta gagaagatcc cttatgtct gaggatctc 1800
tcccaaatcc acctcctgag gtgttccag cactggactc tgcagagctg ggcttccttt 1860
ccctccctt tctccatag ctgcaagatt tagttagtag aaatcccag cagctgcagc 1920
ctgaggctca ctttcagggt cagctggagc aactgcggtc catgggcttt ctgaatcgtg 1980
aagccaatct tcaggccctc attgctacgg ggggagcagt gsatgctgct gtggagaagc 2040

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-20-

```

tgagacagtc gtaggagcct tattcattca aaccatacgt ttccctctgt gcctttttcc 2100
catatccttag ttcccttagct ctcccatitt tgaatacagc tgcattataa accaaattta 2160
ctatgaagtc ctttgctgtg gaggcaatgt tgttccagag tcaacgagga agactaatgg 2220
ccaaaacata gtggagggtgc tgtgtgtgag tcaaccactt gtaccactat accactgggg 2280
ggccccagtc taagctctgc ttatgcctat cttgagatgc aattacaccc aatttccaat 2340
gtgaaaa 2347

```

<210> 29

<211> 655

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 29

```

Met Ala Lys Gly Gly Glu Ala Leu Pro Gln Gly Ser Pro Ala Pro Val
1      5      10      15
Gln Asp Pro His Leu Ile Lys Val Thr Val Lys Thr Pro Lys Asp Lys
20     25     30
Glu Asp Phe Ser Val Thr Asp Thr Cys Thr Ile Gln Gln Leu Lys Glu
35     40     45
Glu Ile Ser Gln Arg Phe Lys Ala His Pro Asp Gln Leu Val Leu Ile
50     55     60
Phe Ala Gly Lys Ile Leu Lys Asp Pro Asp Ser Leu Ala Gln Cys Gly
65     70     75     80
Val Arg Asp Gly Leu Thr Val His Leu Val Ile Lys Arg Gln His Arg
85     90     95
Ala Met Gly Asn Glu Cys Pro Ala Ala Ser Val Pro Thr Gln Gly Pro
100    105    110
Ser Pro Gly Ser Leu Pro Gln Pro Ser Ser Ile Tyr Pro Ala Asp Gly
115    120    125
Pro Pro Ala Phe Ser Leu Gly Leu Leu Thr Gly Leu Ser Arg Leu Gly
130    135    140
Leu Ala Tyr Arg Gly Phe Pro Asp Gln Pro Ser Ser Leu Met Arg Gln
145    150    155    160
His Val Ser Val Pro Glu Phe Val Thr Gln Leu Ile Asp Asp Pro Phe
165    170    175

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-21-

```

Ile Pro Gly Leu Leu Ser Asn Thr Gly Leu Val Arg Gln Leu Val Leu
    180                      185                      190
Asp Asn Pro His Met Gln Gln Leu Ile Gln His Asn Pro Glu Ile Gly
    195                      200                      205
His Ile Leu Asn Asn Pro Glu Ile Met Arg Gln Thr Leu Glu Phe Leu
    210                      215                      220
Arg Asn Pro Ala Met Met Gln Glu Met Ile Arg Ser Gln Asp Arg Val
    225                      230                      235                      240
Leu Ser Asn Leu Glu Ser Ile Pro Gly Gly Tyr Asn Val Leu Cys Thr
    245                      250                      255
Met Tyr Thr Asp Ile Met Asp Pro Met Leu Asn Ala Val Gln Glu Gln
    260                      265                      270
Phe Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ala Thr Thr Asp Asn Ala Thr Thr
    275                      280                      285
Thr Thr Ser Gln Pro Ser Arg Met Glu Asn Cys Asp Pro Leu Pro Asn
    290                      295                      300
Pro Trp Thr Ser Thr His Gly Gly Ser Gly Ser Arg Gln Gly Arg Gln
    305                      310                      315                      320
Asp Gly Asp Gln Asp Ala Pro Asp Ile Arg Asn Arg Phe Pro Asn Phe
    325                      330                      335
Leu Gly Ile Ile Arg Leu Tyr Asp Tyr Leu Gln Gln Leu His Glu Asn
    340                      345                      350
Pro Gln Ser Leu Gly Thr Tyr Leu Gln Gly Thr Ala Ser Ala Leu Ser
    355                      360                      365
Gln Ser Gln Glu Pro Pro Pro Ser Val Asn Arg Val Pro Pro Ser Ser
    370                      375                      380
Pro Ser Ser Gln Glu Pro Gly Ser Gly Gln Pro Leu Pro Glu Glu Ser
    385                      390                      395                      400
Val Ala Ile Lys Gly Arg Ser Ser Cys Pro Ala Phe Leu Arg Tyr Pro
    405                      410                      415
Thr Glu Asn Ser Thr Gly Gln Gly Gly Asp Gln Asp Gly Ala Gly Lys
    420                      425                      430
Ser Ser Thr Gly His Ser Thr Asn Leu Pro Asp Leu Val Ser Gly Leu
    435                      440                      445
Gly Asp Ser Ala Asn Arg Val Pro Phe Ala Pro Leu Ser Phe Ser Pro
    450                      455                      460
Thr Ala Ala Ile Pro Gly Ile Pro Glu Pro Pro Trp Leu Pro Ser Pro
    465                      470                      475                      480
Ala Tyr Pro Arg Ser Leu Arg Pro Asp Gly Met Asn Pro Ala Pro Gln
    485                      490                      495

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-22-

Leu Gln Asp Glu Ile Gln Pro Gln Leu Pro Leu Leu Met His Leu Gln
 500 505 510
 Ala Ala Met Ala Asn Pro Arg Ala Leu Gln Ala Leu Arg Gln Ile Glu
 515 520 525
 Gln Gly Leu Gln Val Leu Ala Thr Glu Ala Pro Arg Leu Leu Leu Trp
 530 535 540
 Phe Met Pro Cys Leu Ala Gly Thr Gly Ser Val Ala Gly Gly Ile Glu
 545 550 555 560
 Ser Arg Glu Asp Pro Leu Met Ser Glu Asp Pro Leu Pro Asn Pro Pro
 565 570 575
 Pro Glu Val Phe Pro Ala Leu Asp Ser Ala Glu Leu Gly Phe Leu Ser
 580 585 590
 Pro Pro Phe Leu His Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Thr Asn Pro Gln
 595 600 605
 Gln Leu Gln Pro Glu Ala His Phe Gln Val Gln Leu Glu Gln Leu Arg
 610 615 620
 Ser Met Gly Phe Leu Asn Arg Glu Ala Asn Leu Gln Ala Leu Ile Ala
 625 630 635 640
 Thr Gly Gly Asp Val Asp Ala Ala Val Glu Lys Leu Arg Gln Ser
 645 650 655
 <210> 30
 <211> 899
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 30
 ctagagagta tagggcagaa ggatggcaga tgagtgactc cacatccaga gctgcctccc 60
 ttttaatecag gatcctgtcc ttccctgtcct gtaggagtgc ctgttgccag tgtggggtga 120
 gacaagtttg tcccacaggg ctgtctgagc agataagatt aagggtggg tctgtgctca 180
 attaaactcct gtgggcacgg gggctgggaa gagcaaagtc agcgggtgcct acagtcagca 240
 ccatgctggg cctgccgtgg aaggaggtc tgtcctgggc gctgctgctg cttctcttag 300
 gctcccagat cctgctgac tatgcctggc attccacga gcaaaggac tgtgatgaac 360
 acaatgtcat ggctcgttac ctccctgcc aagtgagggtt tgctgtccac acattcaacc 420
 aacagagcaa ggactactat gcctacagac tggggcacat cttgaattcc tgggaaggagc 480
 aggtggagtc caagactgta ttctcaatgg agctactgct ggggagaact aggtgtggga 540

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-23-

```

aatttgaaga cgacattgac aactgccatt tccaagaaag cacagagctg aacaatactt    600
tcacctgctt cttcaccatc agcaccaggc cctggatgac tcagttcagc ctcctgaaca    660
agacctgctt ggagggattc cactgagtga aaccocactca caggcttgtc catgtgctgc    720
tcccacatc cgtggacatc agcactactc tcctgaggac tcttcagtgg ctgagcagct    780
ttggacttgt ttgttatcct attttgcctg tgtttgagat ctcagatcag tgttttagaa    840
aatccacaca tcttgagcct aatcatgtag tgtagatcat taaacatcag cattttaag    899

```

<210> 31

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 31

```

Met Leu Gly Leu Pro Trp Lys Gly Gly Leu Ser Trp Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15
Leu Leu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Leu Ile Tyr Ala Trp His Phe His
20          25          30
Glu Gln Arg Asp Cys Asp Glu His Asn Val Met Ala Arg Tyr Leu Pro
35          40          45
Ala Thr Val Glu Phe Ala Val His Thr Phe Asn Gln Gln Ser Lys Asp
50          55          60
Tyr Tyr Ala Tyr Arg Leu Gly His Ile Leu Asn Ser Trp Lys Glu Gln
65          70          75          80
Val Glu Ser Lys Thr Val Phe Ser Met Glu Leu Leu Leu Gly Arg Thr
85          90          95
Arg Cys Gly Lys Phe Glu Asp Asp Ile Asp Asn Cys His Phe Gln Glu
100         105         110
Ser Thr Glu Leu Asn Asn Thr Phe Thr Cys Phe Phe Thr Ile Ser Thr
115         120         125
Arg Pro Trp Met Thr Gln Phe Ser Leu Leu Asn Lys Thr Cys Leu Glu
130         135         140
Gly Phe His
145

```

<210> 32

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-24-

<211> 2186

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 32
tggagaggcc acagctgctg gcttcctggg cttctccaaa ctctgtgtg tcgccactgc 60
caccggcagg gagccaggag agagacagaa aggggctgag acagaatgat caaaaggaga 120
gccaccctg gtgcgggagg cgacaggacc aggcctcgac ggcgcggttc cactgagagc 180
tggattgaaa gatgtctcaa cgaaagtga aacaaacgtt attccagcca cacatctctg 240
gggaatgttt ctaatgatga aaatgaggaa aaagaaaata atagagcacc caagcccac 300
tccactcctg ctactctgca atggctggag gagaactatg agattgcaga gggggtctgc 360
atccctcgca gtgccctcta tatgcattac ctggatttct gcgagaagaa tgatacccaa 420
cctgtcaatg ctgcacgctt tggaaagatc ataaggcagc agtttctca gtaaccacc 480
agaagactcg ggaccgagg acagtc aaag taccattact atggcattgc agtgaaagaa 540
agctcccaat attatgatgt gatgtattcc aagaaaggag ctgcctgggt gagtgcagacg 600
ggcaagaaag aagtgcagaa acagacagtg gcatattcac ccggtccaa actcggaaca 660
ctgtgccag aatttcccaa tgtcaagat ctaaactctgc cagccagcct gctgaggag 720
aaggtttcta cttttattat gatgtacaga acacactgtc agagaatact ggacactgta 780
ataagagcca actttgatga ggttcaaagt ttcttctgc acttttggca aggaatgccg 840
ccccacatgc tgcctgtgct gggctcctcc acggtgtgta acattgtcgg cgtgtgtgac 900
tccatcctct acaaagctat ctccggggtg ctgatgccca ctgtgtgcga ggcattacct 960
gacagcttaa ctacggtgat tcgaagttt gccaaagcaac tggatgagtg gctaaaagtg 1020
gctctccacg acctccacga aaacttgcga aacatcaagt tcgaattgtc gagaagggtc 1080
tcccaaatc tgagacggca aacatcacta aatcatctct gccaggcacc tcgaacagtg 1140
atccacagtg cagacatcac gttccaaatg ctggaagact ggagggaact ggacctgaac 1200
agcatcacca agcaaacctt ttacaccatg gaagactctc gcgatgagca ccggaaactc 1260
atcacccaat tatatcagga gtttgacct ctcttgagg agcagctctcc catcgagtcc 1320
tacattgagt ggcgtgatac catggttgac cgctgtgttg tgaagggtgg tgccaagaga 1380
caagggtcct tgaagaaagt ggcccagcag ttctctctga tgtggtcctg ttccggcaca 1440
aggggtgatcc gggacatgac cttgcacag cccccagct tcgggtcttt tcacctaat 1500

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-25-

```

cacttaatgt ttgatgacta cgtgctctac ctgttagaat ctctgcactg tcaggagcgg 1560
gccaatgagc tcatgcgagc catgaaggga gaaggagca ctgcagaagt ccgagaagag 1620
atcatcttga cagaggctgc cgcaccaacc ccttcaccag tgccatcggt ttctccagca 1680
aaatctgcca catctgigga agtgccacct ccctctctcc ctgttagcaa tcttccct 1740
gagtacactg gcttcagcac tacaggtaat ggaaagtcct tcaaaaactt tgggtagtta 1800
atgtttgaag aaagggcttt ctgccagcct gggcaacata gtgagacttc atttcacac 1860
acacaaaaag ccagacatct tggctcacac ctgtagtccc agctacttgg gaggtgagg 1920
tggtgagaatt gcttgagccc aggagctacg atgcaccac tgcattctag ccttagtgat 1980
acagtgagac cttgtctcaa aaaaggaaaa acagggcttt ctggaaaaac attctctcc 2040
cacaatctcc aaaagataat gccaaaacct gggatatctc ctggatttgt gaatgacgta 2100
caggtattca ttattcatt ggtacacatt ctgtatgctg ctgttttcaa gttggcaaat 2160
taagcatatg ataaaatccc aaaact 2186

```

<210> 33

<211> 563

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 33

```

Met Ile Lys Arg Arg Ala His Pro Gly Ala Gly Gly Asp Arg Thr Arg
1           5           10          15
Pro Arg Arg Arg Arg Ser Thr Glu Ser Trp Ile Glu Arg Cys Leu Asn
20          25          30
Glu Ser Glu Asn Lys Arg Tyr Ser Ser His Thr Ser Leu Gly Asn Val
35          40          45
Ser Asn Asp Glu Asn Glu Glu Lys Glu Asn Asn Arg Ala Ser Lys Pro
50          55          60
His Ser Thr Pro Ala Thr Leu Gln Trp Leu Glu Glu Asn Tyr Glu Ile
65          70          75          80
Ala Glu Gly Val Cys Ile Pro Arg Ser Ala Leu Tyr Met His Tyr Leu
85          90          95
Asp Phe Cys Glu Lys Asn Asp Thr Gln Pro Val Asn Ala Ala Ser Phe
100         105         110
Gly Lys Ile Ile Arg Gln Gln Phe Pro Gln Leu Thr Thr Arg Arg Leu

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-26-

115	120	125
Gly Thr Arg Gly Gln Ser Lys Tyr His Tyr Tyr Gly Ile Ala Val Lys 130	135	140
Glu Ser Ser Gln Tyr Tyr Asp Val Met Tyr Ser Lys Lys Gly Ala Ala 145	150	155
Trp Val Ser Glu Thr Gly Lys Lys Glu Val Ser Lys Gln Thr Val Ala 165	170	175
Tyr Ser Pro Arg Ser Lys Leu Gly Thr Leu Leu Pro Glu Phe Pro Asn 180	185	190
Val Lys Asp Leu Asn Leu Pro Ala Ser Leu Pro Glu Glu Lys Val Ser 195	200	205
Thr Phe Ile Met Met Tyr Arg Thr His Cys Gln Arg Ile Leu Asp Thr 210	215	220
Val Ile Arg Ala Asn Phe Asp Glu Val Gln Ser Phe Leu Leu His Phe 225	230	235
Trp Gln Gly Met Pro Pro His Met Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Thr 245	250	255
Val Val Asn Ile Val Gly Val Cys Asp Ser Ile Leu Tyr Lys Ala Ile 260	265	270
Ser Gly Val Leu Met Pro Thr Val Leu Gln Ala Leu Pro Asp Ser Leu 275	280	285
Thr Gln Val Ile Arg Lys Phe Ala Lys Gln Leu Asp Glu Trp Leu Lys 290	295	300
Val Ala Leu His Asp Leu Pro Glu Asn Leu Arg Asn Ile Lys Phe Glu 305	310	315
Leu Ser Arg Arg Phe Ser Gln Ile Leu Arg Arg Gln Thr Ser Leu Asn 325	330	335
His Leu Cys Gln Ala Ser Arg Thr Val Ile His Ser Ala Asp Ile Thr 340	345	350
Phe Gln Met Leu Glu Asp Trp Arg Asn Val Asp Leu Asn Ser Ile Thr 355	360	365
Lys Gln Thr Leu Tyr Thr Met Glu Asp Ser Arg Asp Glu His Arg Lys 370	375	380
Leu Ile Thr Gln Leu Tyr Gln Glu Phe Asp His Leu Leu Glu Glu Gln 385	390	395
Ser Pro Ile Glu Ser Tyr Ile Glu Trp Leu Asp Thr Met Val Asp Arg 405	410	415
Cys Val Val Lys Val Ala Ala Lys Arg Gln Gly Ser Leu Lys Lys Val 420	425	430

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-27-

Ala Gln Gln Phe Leu Leu Met Trp Ser Cys Phe Gly Thr Arg Val Ile
435 440 445

Arg Asp Met Thr Leu His Ser Ala Pro Ser Phe Gly Ser Phe His Leu
450 455 460

Ile His Leu Met Phe Asp Asp Tyr Val Leu Tyr Leu Leu Glu Ser Leu
465 470 475 480

His Cys Gln Glu Arg Ala Asn Glu Leu Met Arg Ala Met Lys Gly Glu
485 490 495

Gly Ser Thr Ala Glu Val Arg Glu Glu Ile Ile Leu Thr Glu Ala Ala
500 505 510

Ala Pro Thr Pro Ser Pro Val Pro Ser Phe Ser Pro Ala Lys Ser Ala
515 520 525

Thr Ser Val Glu Val Pro Pro Pro Ser Ser Pro Val Ser Asn Pro Ser
530 535 540

Pro Glu Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Thr Gly Asn Gly Lys Ser Phe Lys
545 550 555 560

Asn Phe Gly

<210> 34

<211> 558

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 34

acagacaaat gggttatcta ctattggagc catgggtcct gggaatatg gaccacocca 60

aatagaagag ctcaaagtca tccctgaaac cagcgaggaa aataatgagg acatctggaa 120

ttcagaagag attccagaag gacgagaata tgatgatatg tgggatgta gagaatccc 180

agagtatgag attatatcca gacagcaggt gggaactgaa gatatatatt taggggtgtc 240

aaaaaaggac tctcaacag gttgttgacg tgaactagt gctaaaatta aattgccaaa 300

tacaaaccct tctgatattc aaattgatat ccaggaaaca atccttgacc ttcgtactcc 360

tcagaagaag ctgttgataa ctcttctga gctgggtggaa tgtaccagt ccaagcatt 420

ctatatccca gagactgaaa ctcttgaaat ccctatgact atgaaaagag agttagatat 480

tgctaatttc ttctgaaact gcatgaaaaa gataaaaagt agtaaaatgg cattggtaac 540

aataaaaaaa ctttgaaa 558

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-28-

<210> 35

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 35

Gln Thr Asn Gly Leu Ser Thr Ile Gly Ala Met Gly Pro Gly Asn Ile
 1 5 10 15

Gly Pro Pro Gln Ile Glu Glu Leu Lys Val Ile Pro Glu Thr Ser Glu
 20 25 30

Glu Asn Asn Glu Asp Ile Trp Asn Ser Glu Glu Ile Pro Glu Gly Ala
 35 40 45

Glu Tyr Asp Asp Met Trp Asp Val Arg Glu Ile Pro Glu Tyr Glu Ile
 50 55 60

Ile Phe Arg Gln Gln Val Gly Thr Glu Asp Ile Phe Leu Gly Leu Ser
 65 70 75 80

Lys Lys Asp Ser Ser Thr Gly Cys Cys Ser Glu Leu Val Ala Lys Ile
 85 90 95

Lys Leu Pro Asn Thr Asn Pro Ser Asp Ile Gln Ile Asp Ile Gln Glu
 100 105 110

Thr Ile Leu Asp Leu Arg Thr Pro Gln Lys Lys Leu Leu Ile Thr Leu
 115 120 125

Pro Glu Leu Val Glu Cys Thr Ser Ala Lys Ala Phe Tyr Ile Pro Glu
 130 135 140

Thr Glu Thr Leu Glu Ile Pro Met Thr Met Lys Arg Glu Leu Asp Ile
 145 150 155 160

Ala Asn Phe Phe

<210> 36

<211> 538

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 36

ggcaccgaggt cgaaaactcc tggaaccctc tgagagagga cagtttccag actcctcggt 60

agggacgcgg gaagagacca tgtgtgggaa atatgagtga gcatgtgaga acaagatccc 120

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-29-

```

aatcctcaga aagaggaaat gaccaagagt cttcccagcc agtgggatct gtgattgtcc 180
aggagcccac tgaggaaaaa cgtcaagaag aggaaccacc aactgataat caggggtattg 240
cacctagtgg ggagatcgaa aatgaaggag cacctgccgt tcaagggcct gacatggaag 300
cttttaaca ggaactggct ctgcttaaga tagaggatga gcctggagat ggtcctgatg 360
tcaggaggagg gattatgccc acttttgatc tcactaaagt gctggaagca ggtgatgcgc 420
aaccataggt ttcaagcaag acaaatgaag actgaaacca agaacttat tcttaactcg 480
gaaatttgac tgataatatt ctcttaataa agttttaagt tttctgcaaa gaaaaaaa 538

```

<210> 37

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 37

```

Met Ser Glu His Val Arg Thr Arg Ser Gln Ser Ser Glu Arg Gly Asn
1          5          10          15
Asp Gln Glu Ser Ser Gln Pro Val Gly Ser Val Ile Val Gln Glu Pro
20          25          30
Thr Glu Glu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Pro Pro Thr Asp Asn Gln Gly
35          40          45
Ile Ala Pro Ser Gly Glu Ile Glu Asn Glu Gly Ala Pro Ala Val Gln
50          55          60
Gly Pro Asp Met Glu Ala Phe Gln Gln Glu Leu Ala Leu Leu Lys Ile
65          70          75          80
Glu Asp Glu Pro Gly Asp Gly Pro Asp Val Arg Glu Gly Ile Met Pro
85          90          95
Thr Phe Asp Leu Thr Lys Val Leu Glu Ala Gly Asp Ala Gln Pro
100          105          110

```

<210> 38

<211> 520

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-30-

```

<400> 38
gagttgtgag ggtgtgaggg tcgcgttcct gctgtctgga ctttttctgt cccactgaga    60
cgcagctgtg tgaatatga ttggcgaggy aagatcaaca tataggccta ggccgaggag    120
aagtgtacca cctcctgagc tgattgggcc tatgctggag cccggtgatg aggagcctca    180
gcaagaggaa ccaccaactg aaagtcggga tcctgcacct ggtcaggaga gagaagaaga    240
tcagggtgca gctgagactc aagtgcctga cctggaagct gatctccagg agctgtctca    300
gtcaaagact ggggggtgaat gtggaaatgg tcctgatgac caggggaaga ttctgccaaa    360
atcagaacaa tttaaaatgc cagaaggaggy tgacaggcaa ccacaggttt aaatgaagac    420
aagctgaaac aacccaaaac tgtttttatt taagatatatt gacttaaaaa tatcgaata    480
aacttttgca gctttctcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa    520

```

<210> 39

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

```

Met Ile Trp Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Ser
1           5           10           15
Val Pro Pro Pro Glu Leu Ile Gly Pro Met Leu Glu Pro Gly Asp Glu
20           25           30
Glu Pro Gln Gln Glu Glu Pro Pro Thr Glu Ser Arg Asp Pro Ala Pro
35           40           45
Gly Gln Glu Arg Glu Glu Asp Gln Gly Ala Ala Glu Thr Gln Val Pro
50           55           60
Asp Leu Glu Ala Asp Leu Gln Glu Leu Ser Gln Ser Lys Thr Gly Gly
65           70           75           80
Glu Cys Gly Asn Gly Pro Asp Asp Gln Gly Lys Ile Leu Pro Lys Ser
85           90           95
Glu Gln Phe Lys Met Pro Glu Gly Gly Asp Arg Gln Pro Gln Val
100          105          110

```

<210> 40

<211> 756

<212> DNA

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-31-

<213> Homo sapiens

```

<400> 40
aggctagtag aggcctggggg tgtgaatcgg cagagggttc tggacacctg cctcagtggtg    60
catgttcaact gggcatcttc ccttcgacct ctttgcccac gtggtgacct ctggggagct    120
gtgagagtgt gaggggcacg ttccagccgt ctggactctt tctctcctac tgagacgcag    180
cctataggtc cgcaggccag tcctcccagg aactgaaata gtgaaatatg agttggcgag    240
gaagatcaac atataggcct aggccaaaga gaagtttaca gctcctgag ctgattgggg    300
ctatgcttga acccactgat gaagagccta aagaagagaa accaccact aaaagtgcga    360
atcctacacc tgatcagaag agagaagatg atcagggtgc agctgagatt caagtgcctg    420
acctggaagc cgatctccag gagctatgac agacaagac tggggatgga tgtgaaggtg    480
gtactgatgt caaggggaag attctaccaa aagcagagca ttttaaatg ccagaagcag    540
gtgaaggga atcacaggtt taaaggaaga taagctgaaa caacacaaac tgttttata    600
ttagatattt tactttaaaa tatcttaata aagttttaag cttttctcca aaaaaaaaaa    660
aaaaaaaaa aacttggggg ctctatgggg ggggggaaaa gggggttga aggggccggg    720
gccatggggg ttcccgacc cagttttttg gtccag    756

```

<210> 41

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

Met Ser Trp Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Ser
1          5          10          15
Leu Gln Pro Pro Glu Leu Ile Gly Ala Met Leu Glu Pro Thr Asp Glu
20          25          30
Glu Pro Lys Glu Glu Lys Pro Pro Thr Lys Ser Arg Asn Pro Thr Pro
35          40          45
Asp Gln Lys Arg Glu Asp Asp Gln Gly Ala Ala Glu Ile Gln Val Pro
50          55          60
Asp Leu Glu Ala Asp Leu Gln Glu Leu Cys Gln Thr Lys Thr Gly Asp
65          70          75          80

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-32-

Gly Cys Glu Gly Gly Thr Asp Val Lys Gly Lys Ile Leu Pro Lys Ala
85 90 95
Glu His Phe Lys Met Pro Glu Ala Gly Glu Gly Lys Ser Gln Val
100 105 110

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 42
aggccgagga gaagtgtacc 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 43
aacctgtggt tgcctgtcac 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 44
agccgtctgg actctttctc 20

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-33-

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 45

tgatttcctt tcacctgctt c

21

<210> 46

<211> 334

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

tgaggatcgc gttcctgctg tcgggacttt ttctgtcctg ctgagacgca gcgtgtgaaa 60

tatgatttgg agagtaagat caacatatag gcctagacca aggagaagcg taccacctcc 120

tgagctgatt gggcctatgc tggagcccag tgatgaggaa cctcagcaag aggaaccacc 180

aactgaaaagt cgggaccta cacctgtacc tgacctggaa actgatctcc aggagctgtc 240

tcagtcacaag actgggggatg aatgcagaga tgggtccgat gacaagggga agattctgcc 300

aaaatcagag caatttaaaa tgccagaagg aggt 334

<210> 47

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Ile Trp Arg Val Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Ser
1 5 10 15Val Pro Pro Pro Glu Leu Ile Gly Pro Met Leu Glu Pro Ser Asp Glu
20 25 30

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-34-

Glu Pro Gln Gln Glu Glu Pro Pro Thr Glu Ser Arg Asp Pro Thr Pro
 35 40 45
 Val Pro Asp Leu Glu Thr Asp Leu Gln Glu Leu Ser Gln Ser Lys Thr
 50 55 60
 Gly Asp Glu Cys Arg Asp Gly Pro Asp Asp Lys Gly Lys Ile Leu Pro
 65 70 75 80
 Lys Ser Glu Gln Phe Lys Met Pro Glu Gly Gly
 85 90

<210> 48
 <211> 1878
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 acagagctgg tgggagctgg gaataggtga aaacctgccc tcctgtgtgag ttggcaggac 60
 gggagcctcc tgttcctctg ctgctgttgt ggcacccgag ccgcagccct ggagccaggc 120
 atccctgtgc ttggggatca ggcgagcag ggcagatcc tctccctctt ggtgcagct 180
 gcagctgccc agccatgctt gtggtcccg aagtctctgt gctcttggga gctgggaggg 240
 cctctgctct cctgcccctt acgcactcca gactctctct tctgttgaga gctaagcaga 300
 catcaggact accagctgca gagaggagct acccactgtg ggcttctctt ctgctgagag 360
 ctgaacactc actgggacgc cctgcctatg gaaaccagct gttaactctg ggtctctctt 420
 gagctgttct gtgcctcagt aaaggtcttc ttctgcttac tcgcctctca ttgtcttccc 480
 ttacctcatt catctggac acaggacaag aacttgggac ttgcgggtat ggtggagcta 540
 aaatagctgt aacacaaaca ggattgaaac atgccccttg ctgcgccat tgtggatgac 600
 aagaggaggg gaagaaagga gagaagatct gcgacccttc ggcaaaccca gacttaggag 660
 atcggagagc caagactgtg acacccttct tggggctctg tggttcctgg cgtctccaag 720
 ctctctggga cctcggtctt ccccggtgcc agtcgtggaa gctgcttctg gctctcattt 780
 gctgtttggg aaactctcta cgctatgaat gttagctggc agcaaacact gcctccact 840
 acaggggcac acagtgttgg tgctgtcttt tccaccctcc acttccaaca ggaagcaagc 900
 acaggaccga agcattgcag acagtgttat cagccaatg tgcattogga gccactgaca 960
 gagtcttctt ttgtcaccca ggctggagta cagtggcgtg atcacagctt actgaaacgt 1020
 ctgcgtctca ggttcaagcg attttctctc ctacgcctct ggtgtagctg gaattacagt 1080

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-35-

gttagcagtc actgatgctc aaacatgaga agactggggac atccatcaga taagaaacgc 1140
tgcccaaaagt gttagactaa taagtgcagc gggtggacaa tgaacccaac cactcaacct 1200
tcgggaaaag tgctggagag gatgtggaga aataggaaac cttttacact gttggtggga 1260
ctgtaaacta gttcaacatc tgtggaagtc agtgtggcga ttcttcagag atgtagaact 1320
agaaatacca tttgaccagc ccattccatt actgggtatg tacccaagg attataaatc 1380
atgctgctat aaagacacat acacacgtat gtttattgtg gcactattca caacagcaaa 1440
gacatggaat caacccaaat gtccaacaac gatagactgg attaagaaaa tgtggcacat 1500
atacaccatg gaatactatg cagccataaa aaatgatgag ttcatgtcct ttgtaggagc 1560
atggatgagg ctagggtgaag caattccttt cctgaggaaa atagaactca ctctgcctg 1620
gcttgtatga ggaggaaatg gatataagca gttgaggaag aacgggtccat gagttgccat 1680
ccttcctctc tctgcctgc cagaagaggt agagccact gaagaaggag cagaataagg 1740
aatggaacc ttagttacaa gtccaagaaa ttctaccac tctactattt tttatgtgt 1800
aacttgattt atagttttta ctttgaaga atgtaactat tgtacatgtt tcataaagta 1860
tcaatagctg aatagacc 1878

<210> 49

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Thr Arg Gly Arg Glu Glu Arg Arg Glu Asp Leu Arg Pro Phe Gly
1 5 10 15
Lys Pro Arg Leu Arg Arg Ser Glu Ser Gln Asp Cys Asp Thr Leu Ser
20 25 30
Gly Ala Leu Trp Phe Leu Ala Ser Pro Ser Phe Trp Ala Pro Arg Leu
35 40 45
Ser Pro Val Pro Val Val Glu Ala Ala Cys Gly Leu His Leu Leu Phe
50 55 60
Gly Lys Leu Ser Thr Leu
65 70

<210> 50

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-36-

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Thr Arg Gly Arg Glu Glu Arg Arg Glu Asp Leu Arg Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Lys Pro Arg Leu Arg Arg Ser Glu Ser Gln Asp Cys Asp Thr Leu Ser
 20 25 30

Gly Ala Leu Trp Phe Leu Ala Ser Pro Ser Phe Trp Ala Pro Arg Leu
 35 40 45

Ser Pro Val Pro Val Val Glu Ala Ala Cys Ala Glu Ser Cys Phe Val
 50 55 60

Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asp His Ser Leu Leu Lys Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Leu Arg Phe Lys Arg Phe Phe Cys Leu Ser Leu Trp Cys Ser Trp
 85 90 95

Asn Tyr Ser Val Ser Ser His
 100

<210> 51

<211> 778

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

caggagtgagg gtcagcagga ggaactctac agctatggga gaacctgcgt tcacctcttt 60

tccaagcctg cctgtttctgg ggaagctcaa aaggaacatg atgccctggg ctttacagaa 120

gaaacgagaa atccacatgg ccaaggccca tcggagacga gctgcgaggt ctgctctccc 180

catgagactc accagctgca tcttcggag gccggtgaca aggatcaggt ctcctcctga 240

caaccaggte agacgcagaa aaggggacga gcacctggag aagccgcagc aactctgcgc 300

ctaccggaga ctgcaggccc tgcagccctg cagcagccaa ggagaagggt caagtccact 360

gcattgggag agcgtcttaa gtatccttgc accggggaag gccagtgaat ctctggacag 420

ggctgggtgt gagcgtgtgc gcagcccgtc tgagcccacc cctgggagggt ttccagctgt 480

ggcagggggg ccaaccccag gaatgggttg tcagctccca ccgccctctc ctggccaatt 540

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-37-

```

ggtgactcct gcagatatcc ggagacaggc caggagggtg aagaaagcca gggagagact    600
ggccaaggcc ttgcaggcag acaggctggc caggcaggca gaaatgctga catgtagatg    660
aagcgcagtc ctgggcttcc ggtcccttcc ttttaatgcc catcctcatt cctactctga    720
attgtcacac ttttccttcc cccaccagtt ctttaataaa agtatattgaa aggcaaaa    778

```

<210> 52

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

```

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

```

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-38-

195 200 205

Leu Ala Arg Gln Ala Glu Met Leu Thr Cys Arg
210 215

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 53
tgggacatcc atcagataag 20

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 54
tttatggctg catagtattc 20

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-39-

<400> 55
gctatgggag aacctgcgtt c

21

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 56
tccttggctt tcttcacct c

21

<210> 57

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Met Ser Trp Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Val Glu Pro Pro Glu Met Ile Gly Pro Met Arg Pro Glu Gln Phe Ser
20 25 30

Asp Glu Val Glu Pro Ala Thr Pro Glu Glu Gly Glu Pro Ala Thr Gln
35 40 45

Arg Gln Asp Pro Ala Ala Ala Gln Glu Gly Glu Asp Glu Gly Ala Ser
50 55 60

Ala Gly Gln Gly Pro Lys Pro Glu Ala His Ser Gln Glu Gln Gly His
65 70 75 80

Pro Gln Thr Gly Cys Glu Cys Glu Asp Gly Pro Asp Gly Gln Glu Met
85 90 95

Asp Pro Pro Asn Pro Glu Glu Val Lys Thr Pro Glu Glu Gly Glu Lys
100 105 110

Gln Ser Gln Cys
115

WO 02/078526

PCT/US02/09808

-40-

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 58

accaaggaga agcgtaccac

20

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 59

gggaccatct ctgcattcat c

21

【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
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2002/078526 A3(51) International Patent Classification: A61K 35/00,
38/00, 39/00, 39/395, 48/00, C07K 5/00, 14/00, 16/00,
C12Q 1/68, C01N 33/53[US/US]; 33rd Floor, 605 Third Avenue, New York, NY
10158 (US). SCANLAN, Matthew, J. [US/US]; 33rd
Floor, 605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US).
CHEN, Yao-Tseng [—/US]; The New York Hospital-Cor-
nell Med. Center, Dept. of Pathology, 525 East 68th Street,
New York, NY 10021 (US).(21) International Application Number:
PCT/US2002/009808

(22) International Filing Date: 29 March 2002 (29.03.2002)

(74) Agent: VAN AMSTERDAM, John, R.; Wolf, Greenfield
& Sacks, P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210
(US).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(81) Designated States (national): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(30) Priority Data:
60/280,718 30 March 2001 (30.03.2001) US
60/285,154 20 April 2001 (20.04.2001) US
60/327,432 5 October 2001 (05.10.2001) US
10/054,683 22 January 2002 (22.01.2002) US(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).(71) Applicants (for all designated States except US): LUD-
WIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
[CH/US]; 605 Third Avenue, New York, NY 10158
(US). CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC
[US/US]; Cornell Business & Technology Park, 20 Thorn-
wood Drive, Suite 105, Ithaca, NY 14850 (US).

Published:

— with international search report

(68) Date of publication of the international search report:
15 January 2004(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): OLD, Lloyd, J.For 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.

(54) Title: CANCER-TESTIS ANTIGENS

(57) Abstract: Cancer-testis (CT) antigens have been identified by screening public databases for transcripts that are expressed in tumor tissues and a limited set of normal tissues, or by screening for genes that are expressed in cancer and testis tissues (but not other normal tissues). The invention relates to nucleic acids and encoded polypeptides which are CT antigens expressed in patients afflicted with cancer. The invention provides, *inter alia* isolated nucleic acid molecules, expression vectors containing those molecules and host cells transfected with those molecules. The invention also provides isolated proteins and peptides, antibodies to those proteins and peptides and cytotoxic T lymphocytes which recognize the proteins and peptides. Fragments of the foregoing including functional fragments and variants also are provided. Kits containing the foregoing molecules additionally are provided. The molecules provided by the invention can be used in the diagnosis, monitoring, research, or treatment of conditions characterized by the expression of one or more CT antigens.

WO 2002/078526 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/09808
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 35/00, 38/00, 39/00, 39/393, 48/00; C07K 5/00, 14/00, 16/00; C12Q 1/68; G01N 33/53 US CL : 536/23.1, 24.31, 24.33; 514/2, 44; 530/300, 350, 387.1; 424/93.1, 138.1, 277.1; 435/6, 7.1, 7.23 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) U.S. : 536/23.1, 24.31, 24.33; 514/2, 44; 530/300, 350, 387.1; 424/93.1, 138.1, 277.1; 435/6, 7.1, 7.23 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,T	DATABASE GENEMBL Accession No. AK057471. Isogai T, et al. 01 August 2002.	1-3, 10-17, 19-22, 28-36, 41, 42, 47, 50-69, and 72-85
Y,P	DATABASE SPTREMBL 21 Accession No. Q96GT9. Zondman AJW, et al. 01 December 2001. (See search report pct-us02-09808-41.rpt, result 1.)	8, 23-27, 39, 40, 45, 46, and 49
Y,P	WO 200157190 A2 (HYSEQ INC.) 09 August 2001 (09.08.2001), see SEQ ID NO: 1447.	8, 23-27, 39, 40, 45, 46, and 49
Y,P	WO 200153312 A1 (HYSEQ INC.) 26 July 2001 (26.07.2001), see SEQ ID NO: 2733.	7, 23-27, 39, 40, 45, 46, and 49
Y,P	WO 200161009 A2 (CURAGEN CORP.) 23 August 2001 (23.08.2001), see human NOV2 protein.	6, 23-27, 39, 40, 45, 46, and 49
Y,P	DATABASE SPTREMBL 21 Accession No. Q96S80. Yano K, et al. 01 December 2001. (See search report pct-us02-09808-33.rpt, result 1.)	4, 23-27, 39, 40, 45, 46, and 49
Y,T	DATABASE SWISSPROT 40 Accession No. Q9H4G1. Deloukas P, et al. 15 June 2002. (See search report pct-us02-09808-31.rpt, result 1.)	23-27, 37, 38, 43, 44, and 48
Y	WO 200006598 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 10 February 2000 (10.02.2000), see SEQ ID NO: 325.	23-27, 37, 38, 43, 44, and 48
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"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 18 March 2003 (18.03.2003)		Date of mailing of the international search report 2 APR 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Stephen L. Rawlings, Ph.D. <i>SLR</i> Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/09808

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE SPTRMBL 21 Accession No. Q9NRE0. CONKLIN et al. 01 October 2000. (See pct-us02-09808-29.rspt, result 1.)	23-27, 37, 38, 43, 44, and 48
Y,P	DATABASE SPTRMBL 21 Accession No. Q9BZ98. KURODA-KAWAGUCHI et al. 01 June 2001. (See pct-us02-09808-27.rspt, result 1.)	23-27, 37, 38, 43, 44, and 48
Y,P	DATABASE SPTRMBL 21 Accession No. Q9BYZ5. LI et al. 01 June 2001. (See pct-us02-09808-25.rspt, result 1.)	23-27, 37, 38, 43, 44, and 48
Y,P	DATABASE SPTRMBL 21 Accession No. Q8WWL9. ZENDMAN et al. 01 March 2002. (See pct-us02-09808-21.rspt, result 2.)	1-3, 10-17, 19-22, 28-36, 41, 42, 47, 50-69, and 72-85
Y	DATABASE PIR 73 Accession No. JC4861. GUPTA et al. 18 October 1996. (See pct-us02-09808-19.rpr, result 1.)	1-3, 10-17, 19-22, 28-36, 41, 42, 47, 50-69, and 72-85
Y	WO 95/35118 A1 (MERK & CO., INC.) 28 December 1995 (28.12.1995), see human PH30 beta chain sperm protein.	1-3, 10-17, 19-22, 28-36, 41, 42, 47, 50-69, and 72-85

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/U802/09808

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim 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:
3. ☒ Claim Nos.: 18 and 70-71
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ 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.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/09808

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
GENBANK, GENESQ, PIR, SWISS, MEDLINE, WEST, SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41,
46, 47, 48, 49, 50, and 52, ferritin-beta, ADAM2, PAGE-2, TSP-NY, Zolpha16, ubiquitin-3, cystatin 9-like protein, RFX4, NOV-2,
XAGE-3, XAGE-2, C/T antigen, cancer, diagnosis, prognosis, treatment, antibody-mediated therapy, vaccine

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 39/395	E 4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	T 4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 K 14/82	C 0 7 K 14/82	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 P 21/08	

(31)優先権主張番号 10/054,683

(32)優先日 平成14年1月22日(2002.1.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),AU,CA,CN,JP,KR,US

(72)発明者 オールド, ロイド, ジェイ.

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 5 8、ニューヨーク、サード アヴェニュー 6 0 5、
3 3 アールディー フロア

(72)発明者 スキャンラン, マシュー, ジェイ.

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 5 8、ニューヨーク、サード アヴェニュー 6 0 5、
3 3 アールディー フロア

(72)発明者 チェン, ヤオツェン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 1、ニューヨーク、5 2 5 イースト 6 8 ス スト
リート、ザ ニューヨーク ホスピタルーコーネル メッド. センター、デパートメント オブ
パソロジー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA36 BA45 CA01 CA09 DA02 DA05 DA11 EA04
FA02 GA01 GA11 HA12
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62
QR82 QS25 QS34 QS36 QX02
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 DA01 DA13
4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA07 CA18 CA25 MA13 MA52 MA56
MA57 MA63 MA65 MA66 NA14 ZB262 ZB272
4C085 AA02 AA13 AA14 AA16 AA19 AA38 BB01 BB11 CC22 CC23
FF00 GG01 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB27
4C087 AA01 AA02 BB65 NA14 ZB26 ZB27
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 DA86 EA28 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	癌症·睾丸抗原		
公开(公告)号	JP2004532629A	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2002576801	申请日	2002-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所 康奈尔大学研究基金会有限公司		
申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所 康奈尔研究基金会インコーポレーテッド		
[标]发明人	オールドロイドジェイ スキャンランマシージェイ チェンヤオツェン		
发明人	オールド,ロイド,ジェイ. スキャンラン,マシユー,ジェイ. チェン,ヤオ-ツェン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K35/12 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/46 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/574 G01N37/00		
CPC分类号	C07K14/4748 A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/5156 A61K2039/53 C07K16/30 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Q2600/16 G01N33/57407		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/12 A61K39/00.H A61K39/39 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/82 C07K16/28 C07K16/46 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 A61K37/02 C12N15/00.F C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA07 4C084/CA18 4C084/CA25 4C084/MA13 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA63 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C085/AA02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/AA38 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/FF00 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/280718 2001-03-30 US 60/285154 2001-04-20 US 60/327432 2001-10-05 US 10/054683 2002-01-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在肿瘤组织中表达的转录物的公共数据库等一系列正常组织或癌症 - 睾丸的筛选 (CT) 抗原通过在癌和睾丸组织中表达的基因的筛选 (没有其他正常组织) 来识别是的。本发明包括核酸和编码的多肽, 它们是在患有癌症的患者中表达的CT抗原。本发明尤其提供了分离的核酸分子, 含有这些分子的表达载体和用这些分子转染的宿主细胞。本发明还提供了分离的蛋白质和肽, 针对这些蛋白质和肽的抗体, 以及识别蛋白质和肽的细胞毒性T淋巴细胞。还提供了上述片段, 包括功能片段和变体。另外提供含有上述分子的

试剂盒。本发明提供的分子可用于诊断，监测，研究或治疗以一种或多种CT抗原表达为特征的症状。

				(P2004-532629A)	
				(43) 公表日 平成16年10月28日 (2004. 10. 28)	
(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	
A 6 1 K 31/7088		A 6 1 K 31/7088			
A 6 1 K 35/12		A 6 1 K 35/12			
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/00		H	
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/39			
		審査請求 未請求		予備審査請求 有 (全 284 頁)	
				最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2002-576801 (P2002-576801)		(71) 出願人 500025570			
(86) (22) 出願日 平成14年3月29日 (2002. 3. 29)		ルードヴィッヒ インスティテュート フ			
(85) 翻訳文提出日 平成15年9月30日 (2003. 9. 30)		ォー キャンサー リサーチ			
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/009808		アメリカ合衆国 ニューヨーク州1015			
(87) 国際公開番号 W02002/078526		8、ニューヨーク、サード アベニュー			
(87) 国際公開日 平成14年10月10日 (2002. 10. 10)		605			
(31) 優先権主張番号 60/280, 718		(71) 出願人 597119426			
(32) 優先日 平成13年3月30日 (2001. 3. 30)		コーネル リサーチ ファウンデーション			
(33) 優先権主張国 米国 (US)		インコーポレーテッド			
(31) 優先権主張番号 60/285, 154		アメリカ合衆国 14850 ニューヨー			
(32) 優先日 平成13年4月20日 (2001. 4. 20)		ク州 イサカ スイート 105 ソーン			
(33) 優先権主張国 米国 (US)		ウッド ドライブ 20 コーネル ビジ			
(31) 優先権主張番号 60/327, 432		ネス アンド テクノロジー パーク			
(32) 優先日 平成13年10月5日 (2001. 10. 5)		(74) 代理人 100102842			
(33) 優先権主張国 米国 (US)		弁理士 葛和 清司			
				最終頁に続く	