

(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2004-500024
(P2004-500024A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(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	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 201 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2000-615751 (P2000-615751)
 (86) (22) 出願日 平成12年4月19日 (2000. 4. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年10月29日 (2001. 10. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2000/003552
 (87) 国際公開番号 W02000/066727
 (87) 国際公開日 平成12年11月9日 (2000. 11. 9)
 (31) 優先権主張番号 199 19 225.1
 (32) 優先日 平成11年4月28日 (1999. 4. 28)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
 (81) 指定国 EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AE, AU, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, YU, ZA

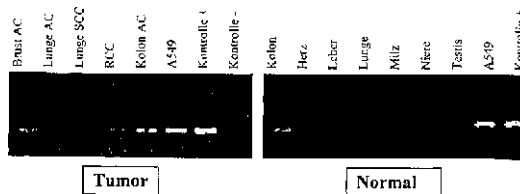
(71) 出願人 500022029
 ベーリンガー インゲルハイム インター
 ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ
 シュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 デー 5 5 2 1 6 イン
 ゲルハイム アム ライン ポストファッ
 ハ 2 0 0
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100065189
 弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍関連抗原

(57) 【要約】

本発明は主要関連抗原、それらに由来する免疫原性ペプチド、前記ペプチドをコードするDNA分子およびそれらの癌免疫療法における使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる群より選ばれる、腫瘍関連抗原 B 9 9。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の腫瘍関連抗原に由来する、免疫原性タンパク質断片またはペプチド。

【請求項 3】

液性免疫応答を引き起こす、請求項 1 または 2 に記載の免疫原性（ポリ）ペプチド。

【請求項 4】

MHC 分子によって提示され細胞性免疫応答を引き起こす、請求項 1 または 2 に記載の免疫原性（ポリ）ペプチドまたはその分解産物。 10

【請求項 5】

配列番号 22 ~ 55 に記載のペプチドからなる群より選ばれる請求項 4 に記載の免疫原性ペプチド。

【請求項 6】

配列番号 31、配列番号 57 および配列番号 59 に記載のペプチドからなる群より選ばれる請求項 5 に記載の免疫原性ペプチド。

【請求項 7】

in vivo または *ex vivo* における癌疾病の免疫療法用の、B 9 9 を発現する患者の腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導する請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性（ポリ）ペプチド。 20

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性（ポリ）ペプチドの 1 以上を活性成分として含むことを特徴とする、非経口投与、局所投与、経口投与または部分的投与用医薬組成物。

【請求項 9】

B 9 9 由来の種々の免疫原性ペプチドを含む請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

他の腫瘍関連抗原に由来するペプチドと混合された B 9 9 由来の 1 以上のペプチドを含むことを特徴とする請求項 9 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 11】

少なくとも 2 種の異なる HLA 型に結合することを特徴とする請求項 9 または 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の腫瘍関連抗原の免疫原性特性を有するタンパク質またはその断片をコードする単離 DNA 分子。

【請求項 13】

配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する免疫原性ポリペプチド B 9 9 または前記 B 9 9 に由来するタンパク質断片若しくはペプチドをコードする請求項 12 に記載の DNA 分子。 40

【請求項 14】

配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 5 に記載の配列を有するポリヌクレオチドであること、または、ストリンジェントな条件下で配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 5 に記載の配列を有するポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドであることを特徴とする、請求項 13 に記載の DNA 分子。

【請求項 15】

請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の DNA 分子を含む、組換え DNA 分子。

【請求項 16】

癌疾病の免疫療法用の請求項 12 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の DNA 分子であって、前記 DNA 分子によって発現される B 9 9（ポリ）ペプチドが B 9 9 を発現する患者腫瘍細 50

胞に対する免疫応答を引き起こす、前記DNA分子。

【請求項17】

請求項12～16のいずれか1項に記載のDNA分子の1以上を活性成分として含む医薬組成物。

【請求項18】

請求項1に記載の腫瘍関連抗原を発現する細胞の癌ワクチン製造のための使用。

【請求項19】

請求項1～6のいずれか1項に記載の(ポリ)ペプチドに対する抗体。

【請求項20】

モノクローナルであることを特徴とする請求項19に記載の抗体。

10

【請求項21】

B99の発現と関連した癌疾病の治療および診断用の請求項19または20に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は腫瘍疾病の免疫療法に関する。

免疫系は身体を種々の微生物から守り、積極的にこれらの微生物と戦う働きをする。無傷の免疫系の重要性は先天性または後天性免疫不全の場合に特に顕著である。予防ワクチンプログラムの使用は、ウイルスまたはバクテリア感染疾病に対する戦いにおいて多くの場合に極めて効果的で好結果の免疫学的干渉であることが証明されている。また免疫系は腫瘍細胞の除去にも大きく関与していることも見いだされている。免疫系の構成成分による腫瘍関連抗原(TAA)の認識は重要な役割を果たす。最も広義には、免疫系の要素によって認識される、および、免疫応答の刺激につながる腫瘍細胞のいかなる(ペプチド性または非ペプチド性)構成成分も免疫原性腫瘍抗原として働き得る。免疫学的反応を引き起こすだけでなく腫瘍の拒絶を引き起こす腫瘍抗原は特に重要である。この種の免疫学的反応を刺激することのできる特異的な抗原を同定することは分子的に明らかにされた腫瘍ワクチンの開発における主要な工程を構成する。

20

【0002】

腫瘍の拒絶に免疫系のどの要素が関与しているかはいまだ明確ではないが、CD8-発現細胞障害性T-リンパ細胞(CTL)が主要な役割を果たす(Coulie、1997)というのが大多数の意見である。特に、(メラノーマや腎臓癌のような)自発的緩解率の比較的高い型の腫瘍において臨床学的進行度とCD8⁺-およびCD4⁺-T-細胞の出現の増加とに相関が見いだされている(Schendelら、1993; Mackensenら、1993; Hallidayら、1995; Kawakamiら、1995; Kawakamiら、1996; Wang、1997; CelluzziとFalo、1998)。特異的CTLクローンは腫瘍浸潤性リンパ細胞(TIL)または末梢単球血液細胞(PBMC)から、一般に*in vitro*における自家腫瘍細胞との共培養およびサイトカイン刺激の後に得られている。動物モデルおよび*in vitro*で培養されたヒト細胞培養系のいずれにおいても腫瘍細胞に対するT-細胞応答は腫瘍細胞をサイトカインでトランスフェクションすることによって増加した(van Elsasら、1997; Gansbacherら、1990; Tepperら、1989; Fearonら、1990; Dranoffら、1993)。

30

40

緩解性とCD8⁺-T細胞の関与との相関という観点から、CD8陽性CTLによって認識される腫瘍関連抗原(TAA)の同定は腫瘍ワクチンの開発へ向けての具体的な第1の目標である(Pardoll、1998; RobbinsとKawakami、1996)。免疫系の他の型の細胞、例えばCD4⁺-Tヘルパー細胞のような細胞型が重要な役割を果たすかどうかは未だ明確でない;メラノーマ患者におけるMAGE-3/HLA-A1ペプチドによる多数の研究がこのことを示した(Marchandら、1995; Boonら、1998)。近年、CTLによって認識される多数のTAAが同定されている(Boonら、1994; van den Eyndeとvan der Brugg

50

en, 1997)。

【0003】

T細胞は、細胞表面のMHC分子(「主要組織適合性複合体」、ヒトではHLA=ヒト白血球抗原(human leukocyte antigen))上に提示されるペプチド断片として抗原を認識する。2つの型のMHC分子がある:MHC-I分子は有核の大部分の細胞に存在し、内在性タンパク質のタンパク質分解性分解(いわゆる「抗原プロセッシング」)によって生成されるペプチド(通常8~10mer)を提示する。ペプチド:MHC-I複合体はCD8-陽性CTLによって認識される。MHC-II分子はいわゆる「専門的抗原-提示細胞」(APC)上のみ現れ、APCによるエンドサイトーシスの過程で吸収され、プロセッシングされる外来性タンパク質のペプチドを提示する。ペプチド:MHC-II複合体はCD4-ヘルパーT細胞によって認識される。T細胞レセプターとペプチド:MHC複合体との相互作用により、種々のエフェクター機構が引き起こされることがあり、CTLの場合は標的細胞のアポトーシスを引き起こすことがある。MHC(例えば、移植拒絶の場合)またはペプチド(例えば、細胞内病原体の場合)が外来性であるとして認識される場合にこれが起こる。いずれにしろ、提示されたペプチドの全てがT細胞との効果的相互作用のための構造的および機能的な要求を満たすわけではない(Rammenseeら、1995に記載および後述するように)。

10

【0004】

原理的には、腫瘍ワクチンにおいてTAAを使用するために多数の投与方法が可能である: 抗原は適切なアジュバント若しくは担体系と共に組換えタンパク質として投与することもでき、抗原をコードするプラスミド(DNAワクチン; Tigheら、1998)若しくはウイルスベクター中(Restifo、1997)のcDNAとして与えることもできる。他の可能性はヒト抗原を組換え的に発現し、それらの追加的成分の結果としてアジュバント効果を有する組換えバクテリア(例えば、リステリア、サルモネラ)を使用することである(Paterson、1996; Pardoll、1998)。これらの全ての場合において、抗原はいわゆる「専門的抗原提示細胞(APC)」によってプロセッシングされて提示されなければならない。他の可能性は、抗原のT細胞エピトープ等価物に対応し、外部からAPCに装荷され(Buschleら、1997; Schmidtら、1997)、またはAPCによって吸収されMHC-I分子に細胞内移送される、合成ペプチド(Meliefら、1996)を使用することである。特定の抗原を投与する最も治療的に効果的な方法は一般には臨床試験によって決定される。

20

30

【0005】

腫瘍特異的CTLによって認識される抗原またはそのエピトープには、いかなるタンパク質クラス(例えば、転写因子、レセプター、酵素; 総説についてはRammenseeら、1995; RobbinsとKawakami、1996を参照せよ)に由来し得る分子も含まれる。抗体による認識の場合に必要なようにこれらのタンパク質は必ずしも細胞表面上に位置する必要はない。CTLによる認識のための腫瘍特異的抗原として働くためには、あるいは、治療に使用するためには、そのタンパク質はある条件を満たさなければならない: まず第一に、その抗原は腫瘍細胞によって排他的に発現されなければならない、または、いわゆる「決定的」正常組織においては腫瘍におけるよりも低い濃度でのみ生じなければならない。決定的正常組織とは必須の組織である; それらに向けられた免疫反応は重大な結果、ある場合には致命的な結果を引き起こすであろう。

40

【0006】

第2に、この抗原は一次腫瘍においてのみならず転移においても発現されなければならない。更に、抗原の広範な臨床的利用という観点から、その抗原は幾つかのタイプの腫瘍において高濃度で存在することが望ましい。ワクチンの効果的な成分としてのTAAの適切性に関する更なる前提条件はその抗原のアミノ酸配列中のT細胞エピトープの存在である; TAA由来のペプチドは*in vitro*/*in vivo*でT細胞応答を生じさせなければならない(「免疫原性」ペプチド)。臨床的に広範に適用できる免疫原性ペプチドを選択するための別の基準は、その抗原が任意の患者集団において出現する頻度である。

50

免疫原性腫瘍関連抗原 (TAA) は、既にT細胞エピトープを有することが広く示されているが、多数のカテゴリーに分けることができ、それらには、ウイルスタンパク質、変異タンパク質、過剰発現タンパク質、染色体転座によって形成される融合タンパク質、分化抗原、癌胎児性抗原が含まれる (Van den EyndeとBrichard、1995; van den Eyndeとvan der Bruggen, 1997)。

【0007】

腫瘍ワクチンの開発のための出発点となる、TAAを同定し解析する方法は、ひとつには患者において既に誘導されている(細胞性免疫応答)CTLの使用または抗体(液性免疫応答)に基づくか、または腫瘍と正常組織の間の示差的転写プロファイルを描き出すことに基づいている。前者の例、免疫学的アプローチでは、MHC-I分子によってCTLエピトープを提示する真核性腫瘍cDNA発現ライブラリー(Boonら、1994)のスクリーニングに患者のCTLが使用され、一方、高アフィニティー患者抗血清真核性cDNA発現ライブラリーを使用することによって、TAAの存在は個々のプラークのイムノプロット解析によって直接に探索することができる(Sahinら、1995)。CTL反応性とタンパク質-化学的工場の組合せは、患者CTLとの反応性によって予備選択した腫瘍細胞のMHC-Iから分離されるペプチドの単離を生じさせる。このペプチドはMHC-I複合体から洗い出され、質量分光器によって同定される(Falkら、1991; Woelfelら、1994; Coxら、1994)。抗原の特性解析のためにCTLを使用するアプローチは、CTLの培養と活性化を必要とするために、かなりの費用がかかり、または、必ずしも成功するものではない。

10

20

【0008】

正常組織と腫瘍組織の転写プロファイルの比較に基づくTAAの同定方法は多数あり多様である;それらには、ディファレンシャルハイブリダイゼーション、サブトラクシオンcDNAバンクの確立(「提示的差異解析」("representational difference analysis")); HubankとSchatz、1994; Diatchenkoら、1996)およびDNAチップ技術の使用またはSAGE法(Velculescuら1995)が含まれる。患者CTLを使用する上述した免疫学的方法と対照的に、分子生物学的方法を使用する場合は、この方法によって発見される潜在的抗原候補が腫瘍特異的(腫瘍関連)であって細胞障害性T細胞応答を引き起こすことができるT細胞エピトープを確かに有することを示す必要がある。少なくとも一つの例では(NY-ESO/LAGE-1)、抗原は患者血清およびRDAの両方によって同定され(Chenら、1997; Lethersら、1998)、さらに、この抗原のCTLエピトープおよび同時自発性液性およびT細胞応答が一人の患者について述べられている(Jagerら、1998)。

30

【0009】

本発明の目的は、新規な腫瘍-関連抗原(TAA)を提供することである。この目的は、最初に、肺腺癌細胞株(A549)と正常肺組織間のRDA(提示的差異解析)によるcDNAサブトラクシオンライブラリーを樹立することによって達成した。腫瘍中で過剰発現されている抗原を選択するため、得られたcDNAクローンをシーケンシングしデータバンクで入手可能な配列と比較した。同定された遺伝子のうちデータバンク中に321個の未知の遺伝子があり、データバンク中にその大部分がEST(発現配列タグ)であるエントリが存在した。更に決定的正常組織および免疫特権的組織のcDNAライブラリーにおける定性的PCR解析、および詳細なデータバンク検索の後、候補クローンの数は56に限定され、それらのESTは決定的正常組織には由来しないものであった。RT-PCRによって、調べた56個のクローンのうち3つが主として種々の腫瘍組織における発現を示し、正常組織では殆どまたは全く発現を示さないことが明らかにされた。クローンの一つ(B99)の腫瘍組織と正常組織との発現の(PCRを用いた)定量的比較は、種々の腫瘍におけるB99の過剰発現を明らかにした。ノーザンプロットによって解析した発現プロファイルは、調べた正常組織ではB99は全くまたはわずかな転写しかないことを明らかにした。

40

50

【0010】

ヒトB99 cDNAはクローン化された；得られた配列は配列番号1に示されている。クローン化されたヒトB99 cDNAの配列解析により、位置427から位置1743には、-1, 3-ガラクトシル-O-グリコシル-グリコプロテイン-1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼのオープンリーディングフレームとヌクレオチドレベルおよびタンパク質レベルで非常に類似した連続オープンリーディングフレームが存在することが示された。ノーザンブロット実験から得られたデータにより、B99転写物は約3.0 kbの長さを有していると結論付けられた。B99 cDNAのクローン化された領域は2216 bpであるが、配列の3'末端にポリA尾部が存在することはこの領域のcDNAが完全であることの証拠である。ノーザンブロット解析から導き出された大きさとクローン化されたB99-cDNAの大きさの相違は、未知の長さのポリA尾部の存在およびB99の5'-非翻訳領域中の追加的配列によって説明することができる。このクローン化cDNAの5'領域中の位置0から427には連続したリーディングフレームがないという事実から、位置427のATGがB99の開始コドンであると結論づけることができる。

10

【0011】

更に上流に位置するB99の配列に関する情報は分子生物学の標準的な方法、例えば、5'-RACE(DNA末端迅速増幅)によって得ることができる。この方法では、RNA、好ましくはmRNAが、B99が転写されている細胞または組織(例えば大腸癌組織またはA549のような肺腺癌に由来する細胞株)から逆転写され、次に、既知の配列のアダプターとライゲーションされる。アダプタープライマー(cDNAの5'末端にあるアダプターに特異的に結合する)およびB99特異的プライマー(例えば配列番号8、10、11)を用いたPCRにより対応するB99断片の増幅が可能となる。これらのPCR産物は実施例1に記載したような標準的な方法によりクローン化することができ、特にDNAシーケンシングにより特徴付けができる。

20

【0012】

5'末端解析の他の方法はB99に特異的なDNAプローブによるハイブリダイゼーションまたは抗血清によるcDNAライブラリーのスクリーニングによるものである。cDNAライブラリーのスクリーニングが、例えばRNAの顕著な2次構造のための効率の良くない逆転写のようなその手順の限界のために所望の結果を達成しない場合は、例えば、cDNAライブラリーのスクリーニングにおけるように、B99に特異的なDNAプローブとハイブリダイズさせることによりゲノムライブラリーを調べ、得られたcDNAの5'末端の上流に位置する配列(例えばB99のプロモーター領域)情報を含むクローンを単離することもできる。

30

【0013】

この単離cDNAは、B99と名付けた配列番号2に記載のアミノ酸配列(B99-1)を有する腫瘍関連抗原(TAA)をコードする。この配列は単離B99-cDNAの位置427の開始コドンによって規定されている。

肺腺癌細胞株A549からのcDNAを使用したB99のコード領域をクローニングする別の試みにおいて、配列番号1に示す配列に比較してヌクレオチドの位置923における挿入を有する配列が決定された(配列番号3または配列番号5)。この挿入はB99のオープンリーディングフレームに変化を生じさせ、B99タンパク質のC-末端領域に改変されたアミノ酸配列を生じさせる；このリーディングフレームに由来するB99抗原(B99-2)の配列は配列番号4に示してある。この挿入とは別に、A549細胞から単離したcDNAは配列番号1の配列と比較して位置622にヌクレオチド置換を有している。このヌクレオチド置換は位置66におけるアルギニン(配列番号2、B99-1)のトリプトファン(配列番号4、B99-2)による置換を生じさせる。このアミノ酸置換を別にすれば、B99-2のアミノ酸配列の位置166(これを含む)までの配列はB99-1と同一である。

40

位置923のヌクレオチド挿入は配列番号3(または配列番号5)に示した配列の位置8

50

45 から 1744 の第 2 の潜在的リーディングフレームを作り出す。このリーディングフレームを有する cDNA によって発現されるタンパク質は配列番号 6 に示されたアミノ酸配列を有する (B99-3)。B99-3 の配列は B99-1 と位置 1 から 27 が異なり、位置 28 以降は B99-1 と同一である。

【0014】

従って、第 1 の側面によれば、本発明は配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 に記載したアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる群から選ばれる、B99 と命名された腫瘍関連抗原に関する。

配列番号 2 (B99-1)、配列番号 4 (B99-2) および配列番号 6 (B99-3) に示したアミノ酸配列は、B99 誘導体が腫瘍ワクチンとしての使用のために望まれる免疫原性特性を有する場合には、ある程度の相違、例えば、アミノ酸置換による相違を有してもよい (この種の B99 多型性の例は、点変異によって生じた B99-1 と B99-2 の位置 66 における相違である)。

特に断らない限り、用語「B99」は本明細書では B99-1、B99-2 および B99-3 を意味するために使用される。

【0015】

B99 の天然のアミノ酸配列 (従って、対応する B99-cDNA の配列) は場合により、B99 CTL-エピトープ中の個々のアミノ酸を置換することにより改変され、天然の B99 CTL エピトープと比較して MHC-I 分子に対する B99 ペプチドの親和性の増加を達成し、それにより、増加した免疫原性を生じさせ、最終的に腫瘍に対するより大きな反応性を生じさせてもよい。B99 エピトープ領域における改変は B99 タンパク質全体において行なってもよく (これは APC によりプロセッシングされて対応するペプチドを形成する)、あるいは、大きな B99 タンパク質断片または B99 ペプチドに対して行なってもよい (以下を参照せよ)。

他の側面によれば、本発明は B99 に由来する免疫原性断片およびペプチドに関する。後者は以下では B99 ペプチドと称する。最初のグループは液性免疫応答を起動する (抗体の誘導) B99 ペプチドである。そのようなペプチドは、例えば表面可能性プロット (Emmini ら、1985)、疎水性プロット (Kyte と Doolittle、1982) および抗原性インデックス (Jameson と Wolf、1988) のようないわゆる予測アルゴリズムによって決定できる B99 の選択した部分 (少なくとも 12 ~ 15 アミノ酸) である。

【0016】

腫瘍関連抗原は腫瘍特異的変異を有することがあり、それが腫瘍組織と正常組織との免疫学的識別に寄与することが知られている (Mandruzzato ら、1997、Hogan ら、1998、Gaudi ら、1999、Wolfel ら、1995)。腫瘍特異的 B99 変異の存在を決定するために、B99 cDNA を 1 以上の異なる腫瘍から、好ましくは本発明の単離 B99 cDNA からのプローブでクローン化し、得られた配列を正常組織の B99 cDNA と比較してもよい。正常組織に対して変異した配列部分からの腫瘍 B99 ペプチドは正常組織からの対応する配列部分の B99 ペプチドと比較して増加した免疫原性を有していることが期待されるであろう。

従って、本発明は、更なる側面において、腫瘍特異的変異を有する、腫瘍-発現 B99 由来の B99 ペプチドに関する。

B99 ペプチド候補を選ぶとき、B99-1 と異なる B99-2 および B99-3 の領域は特に関心に値する。アミノ酸配列に相違をもたらす B99 DNA の挿入が腫瘍特異的変異であると理解すると、この領域からのペプチドは B99-1 のペプチドよりも大きな抗原性を示すと期待することができる。この挿入が腫瘍特異的であることを確認するために、この領域に対する抗体を作製し、腫瘍細胞を B99-2 および B99-3 の発現について調べてもよい。

【0017】

B99 ペプチドは直接投与、または、改変された形態 (例えば、KLH = キーホールリン

10

20

30

40

50

ペプトヘモシアニンに結合して)で投与され、抗体の形成は通常の免疫学的アッセイ、例えばE L I S Aによって決定される。

本発明の範囲内で好ましい他のB 9 9ペプチドは、M H C分子によって提示され、細胞性免疫応答を生み出すものである。2つの型のM H C分子、すなわちC D 8陽性C T Lによって認識されるM H C - I分子およびC D 4陽性Tヘルパー細胞によって認識されるM H C - I I分子がある。

ペプチドが細胞性免疫応答を起動するためには、そのペプチドはM H C分子に結合しなければならない。一方治療される患者はその分子を彼または彼女のレパトワール中に有していなければならない。従って、患者のM H C - サブタイプを決定することは、細胞性免疫応答の起動という観点から、その患者におけるペプチドの効果的な使用のために最も重要な

10

欠くことのできないことを構成する。治療的に使用すべきB 9 9ペプチドの配列は、アンカーアミノ酸および長さの観点から問題としているM H C - 分子によって決定される。明らかにしたアンカー位置と長さは、そのペプチドが問題にしている患者のM H C - 分子のペプチド結合溝に適合することを保証する。この結果は、免疫系が刺激され、腫瘍抗原に由来するペプチドが使用された場合は、患者の腫瘍細胞に対して向けられた細胞性免疫反応が生成されるというものである。

【0018】

免疫原性B 9 9ペプチドは既知の方法によって同定することができる；基本的条件の一つはM H C - 結合性とC T L - 誘導性の間の相関である。

従って、免疫原性ペプチドの配列はそのペプチド結合モチーフに基づいて予測することができるため、B 9 9タンパク質配列に基づいてC T Lエピトープを構成するB 9 9ペプチドを同定すること、および合成することができる。これを行なうため、既知のタンパク質抗原のC T Lエピトープを同定するために使用される種々の方法が利用できる；例えば、ヒトパピローウイルスにおけるT細胞エピトープを同定するためにS t a u s sら、1 9 9 2によって記載された方法。

20

【0019】

M H C分子に結合し、それによって提示されるペプチドに関する各M H C - Iアレル産物のアレル特異的要求はモチーフとして集められている(例えば、F a l kら、1 9 9 1)。これまでに、多数のM H C - ペプチドモチーフおよびM H C - リガンドが両方とも知られるようになった。本発明の範囲内にある、特定のM H C - I分子に適合する既知のタン

30

【0020】

このようにして、多数のペプチド候補が得られる。これらは既知のリガンドと共通する可能な限り多数のアンカーグループの存在に関して検索され、および/または、それらが種々のM H C分子に対して「好ましい」残基を有しているか否かが(R a m m e n s e eら、1 9 9 5の表に従って)検索される。弱く結合するペプチドを排除するために、好ましくは結合アッセイが行なわれる。特定のM H C分子に対するペプチド結合に対する要求が既知であれば、ペプチド候補は結合に負の影響または正の影響を有する非アンカー残基について検索され、または、そもそも確かに結合を可能にする非アンカー残基について検索される(R u p p e r tら、1 9 9 3)。しかしながら、この方法では、ペプチド結合モチーフは天然のリガンドを捜す場合の唯一の決定因子ではないことを心に止めておかなければならない；他の側面、例えば抗原プロセッシングの過程での酵素特異性もM H C結合の特異性に加えてリガンドの正体に寄与する。これらの側面を考慮し、本発明の範囲内の免疫原性B 9 9ペプチドを同定するために適した一つの方法は、特にK a w a k a m iら

40

50

(1995)において既知のHLA-A*0201モチーフに基づいてgp100エピトープを同定するために使用された。

【0021】

ペプチドはまたMHC-II分子への結合能について選択してもよい。9アミノ酸を超えるMHC-II結合モチーフはMHC-I結合モチーフよりもアンカー位置についてより高度の縮退を有する。MHC-II分子のX-線構造解析、および、ペプチド配列における変異に基づいてMHC-II結合モチーフの正確な解析を可能とする方法が開発されている(Rammenseeら(1995)、およびそれに引用された原論文)。MHC-II分子に結合するペプチドは典型的には樹状細胞、マクロファージまたはB細胞によってCD4-T細胞に提示される。CD4-T細胞は、次に例えばサイトカインの放出によって次々とCTLを直接的に活性化し、APC(樹状細胞、マクロファージおよびB細胞)による抗原提示の効率を増大させる。

10

【0022】

最近、データバンクおよび特定のMHC分子に結合するペプチドエピトープのより信頼性のある予測を可能とする予測アルゴリズムが利用できるようになった。

本発明の範囲内において、Parkerら(1994)によって記載されたアルゴリズムを用いて、最も重要なHLA-型、特にHLA-A1、-A*0201、-A3、-B7、-B14および-B*4403に対する候補ペプチドが同定され、これら是对応するHLA分子に結合することが期待され、従って、免疫原性CTL-エピトープを構成することが期待される；発見されたペプチドは表2に列挙されている。同様に、ペプチドの他の種々の特徴(疎水性、電荷、大きさ)、または、HLA分子の3D構造のようなペプチドによる要求を考慮した他のアルゴリズムを用いることによって潜在的ペプチドエピトープを発見することが可能である；これは他のHLA型のペプチドエピトープにも適用できる。

20

【0023】

記載した方法によってB99ペプチド候補を選択した後は、そのMHC結合性がペプチド結合アッセイによってテストされる。第1に、良好な結合特性を有するペプチドの免疫原性が決定される(ペプチド-MHC相互作用の安定性は多くの場合免疫原性と相関する；van der Burgら、1996)。選択したペプチドまたはペプチド等価物の免疫原性を決定するために、例えば、Setteら(1994)によって記載された方法を定量的MHC結合アッセイと組み合わせて使用することができる。あるいは、選択したペプチドの免疫原性は既知の方法を用いたin vitro CTL誘導によってテストしてよい(ex vivo CTL誘導について以下に記載したように)。細胞性免疫応答を起動することのできるペプチドを選択するための、いくつかの工程で行なわれる方法の原理は、WO 97/30721に記載されている。この文献の内容は引用により本明細書に含まれるものとする。本発明の範囲内にある効率的な免疫原性ペプチドを得るための一般的な戦略はSchweighofer, 1997によっても記載されている。

30

【0024】

MHC-IまたはMHC-II分子の結合溝に適合する元々のペプチド、すなわち、未改変B99に由来するペプチドを使用する代わりに、元のペプチド配列に基づいて特定されるアンカー位置および長さに関する最小限の要求に従って、変異を行なってもよい。ただし、それらの変異が、MHC分子への結合アフィニティーによって形成されるペプチドの効果的な免疫原性およびT細胞レセプター活性化能力を損なわないだけでなく、それを増強することが好ましい。この場合、MHC分子への結合能に関する要求に合致するように設計された人工的ペプチドまたはペプチド等価物が使用される。

40

【0025】

このようにして改変したペプチドは「ヘテロクリティックペプチド」と称される。それらは以下の方法によって得ることができる：

まず最初に、例えば、Rammenseeら(1995)によって記載された原理を用いてMHC-IまたはMHC-IIリガンドのエピトープまたはそれらの変異体を得る。こ

50

のペプチドの長さは、それがMHC-I分子に適合すべきであるならば、必要なアンカーアミノ酸を有する8~10個のアミノ酸という最小配列に対応するものが好ましい。所望であれば、ペプチドはC末端および/またはN末端において伸長させてもよいが、但しその伸長がMHC分子への結合能に影響せず、伸長させたペプチドが最小配列へ細胞性プロセッシングを受け得ることを条件とする。

次に改変ペプチドは、Parkhurstら(1996)およびBeckerら(1997)に記載されたように、TIL(腫瘍浸潤性リンパ細胞)による認識、CTL誘導および増加したMHC結合性および免疫原性について調べられる。

【0026】

天然のB99ペプチドの免疫原性よりも大きな免疫原性を有する、本発明の目的に適したペプチドを見出す他の方法は、Blakeら(1996)に記載されているように、天然に腫瘍上に見出されるB99ペプチドを認識するCTLでペプチドライブラリーをスクリーニングすることを基礎とする;これとの関係で、MHC-I拘束CTLによって認識される腫瘍エピトープを模倣する分子を設計するためにコンビナトリアルペプチドライブラリーを使用することが提案される。

本発明のB99ポリペプチドまたはそれらに由来する免疫原性断片若しくはペプチドはWO 96/10413に記載されたように組換え的に作製してもよく、ペプチド合成によって産生してもよい。この文献の開示は引用により本明細書に含まれるものとする。組換え産生のために、対応するDNA分子が標準的な方法で発現ベクターに挿入され、適切な宿主細胞にトランスフェクションされ、この宿主が適切な発現条件下で培養され、タンパク質が精製される。慣習的な方法をB99ペプチドの化学合成に使用してよく、例えば商業的に入手可能な自動ペプチド合成機を使用することができる。

【0027】

天然のB99ペプチドまたはヘテロクリティックペプチドの代わりにその様なペプチドを模倣する物質、例えば、「ペプチド擬似物」または「レトロインバースペプチド」を使用することもできる。腫瘍ワクチンにおける治療的用途という観点からこれらの分子をテストするために、天然のB99ペプチドまたはB99ペプチド等価物について上述したのと同じ方法を使用することができる。

本発明のB99と命名されたTAAおよび、それに由来するタンパク質断片、ペプチドまたはペプチド等価物は癌治療のために、例えば、対応する抗原決定基を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するために使用することができる。それらはB99陽性の腫瘍、特に腎臓細胞癌、肺癌、大腸癌、膵臓癌、乳癌および胃癌における腫瘍の治療に使用されることが好ましい。

CTL誘導という形の免疫応答は*in vivo*または*ex vivo*で達成することができる。

【0028】

*in vivo*でCTLを誘導するために、TAA B99またはそれに由来する断片若しくはペプチドを活性成分として含む医薬組成物はそのTAAと関連した癌性疾患に苦しむ患者に投与されるが、TAA(ペプチド)の量は抗原保持腫瘍に対する効果的なCTL応答を得るために充分でなければならない。

従って、別の側面によれば、本発明は非経口投与、局所的投与、経口投与または部分投与のための医薬組成物に関する。好ましくは、本組成物は非経口的に使用され、例えば皮下、皮内または筋肉内適用のために使用される。B99-TAA/ペプチドは医薬的に許容できる担体、好ましくは水性担体に溶解又は懸濁される。この組成物はバッファー等の慣用されるアジュバントを含んでいてもよい。TAA/ペプチドはそれ単独でまたはアジュバント、例えば、フロイントの不完全アジュバント、サポニン、アルミニウム塩、あるいは、好ましい実施態様ではポリアルギニンまたはポリリジンのようなポリカチオンと組み合わせて使用することができる。このペプチドはCTL誘導またはCTL活性化を助ける成分、例えばTヘルパーペプチド、脂質若しくはリポソームに結合させてもよく、これらの物質および/または免疫刺激物質、例えばサイトカイン(IL-2、IFN-)とともに

に投与してもよい。本発明の医薬組成物の調製および投与のための適切な方法はWO 95/04542およびWO 97/30721に記載されており、これらの開示は本明細書に含まれるものとする。

【0029】

B99（断片）またはB99ペプチドは*ex vivo*でCTL応答を起動するために使用することができる。B99を発現する腫瘍に対する*ex vivo* CTL応答はCTL前駆細胞をAPCおよびB99ペプチドまたはB99タンパク質と共にインキュベーションすることによって誘導される。活性化されたCTLは次に増殖させられ、その後患者に再投与される。あるいは、APCにB99ペプチドを装荷してもよい。それにより、B99陽性腫瘍に対する細胞性免疫応答の効率的な活性化が起こり得る（Mayordomoら、1995；Zitvogelら、1996）。細胞、例えば樹状細胞上へのペプチド装荷の適切な方法の一つはWO 97/19169に開示されている。

10

本発明の一つの実施態様においては、異なるいくつかのB99ペプチドまたはB99ペプチド等価物の組み合わせが使用される。他の実施態様では、B99ペプチドは他のTAAに由来するペプチドと合わされる。その様な組み合わせのためのペプチドの選択は、種々の異なる腫瘍抗原由来のペプチドを合わせることににより、最も広範囲の患者集団をカバーするために種々のMHC型を検出するという観点から行われ、および/または可能な最も広範な症例スペクトルを目的として行われる。医薬組成物中のペプチドの数は広範囲に変動し得るものであるが、典型的には臨床的に有用なワクチンは1～15好ましくは3～10の異なるペプチドを含む。

20

【0030】

本発明のペプチドはまた診断試薬として使用することもできる。例えば、本ペプチドは、免疫原性ペプチドによって引き起こされる液性または細胞性免疫応答に対する患者の応答性をテストするために使用することができる。これは治療手順を改善する可能性を提供するものである。例えば、TAAの投与形態（ペプチド、総タンパク質またはDNAワクチン）に依存して、同定したペプチドエピトープに対する反応性を示すPBL中のT細胞前駆体の増加を調べることができる（RobbinsとKawakami、1996および、これに引用される文献）。更に、ペプチドまたは総タンパク質またはTAAに向けられた抗体はB99陽性腫瘍の進行を特性付けるために使用できる（例えば1次腫瘍および転移の免疫組織化学的解析による）。この種のストラテジーは多くの場合に成功することが証明されている；例えば乳癌における内分泌療法を行う判断の基礎としてのエストロゲンレセプターの検出；乳癌における予後および治療過程における関連マーカーとしてのc-erbB-2（Ravaioliら、1998；Revillionら、1998）；前立腺癌の上皮細胞に対する血清中マーカーとしてのPSMA（前立腺特異的膜抗原）、または前立腺癌に対する免疫シンチグラフィにおけるPSMAに対する¹¹¹In標識モノクローナル抗体の使用によるもの（Murphyら、1998およびそれに含まれる文献）；大腸癌にかかった患者における予後および進行に関する血清学的マーカーとしてのCEA（癌胎児性抗原）（JessupとLoda、1998）。

30

【0031】

他の側面により、本発明はB99の免疫原性特性を有するタンパク質またはその断片をコードする単離DNA分子に関する。

40

一つの側面において、本発明は配列番号1に示した配列を有するポリヌクレオチドを含む、または、ストリンジェントな条件下で配列番号1に示した配列のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む単離DNA分子である。

本発明において「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、50%ホルムアミド、5x SSC（1x SSC = 150 mM NaCl、15 mM クエン酸三ナトリウム）、50 mM リン酸ナトリウム（pH 7.6）、5x デンハルト溶液、10% 硫酸デキストラン、および20 μg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中で42℃にて一晚インキュベーションし、続いてフィルターを0.1x SSCで約65℃にて洗浄する条件、またはこれと等価な条件を言う。

50

他の側面において、本発明は配列番号3（または配列番号5）に示した配列を有するポリヌクレオチドを含む、または、ストリンジェントな条件下で配列番号3（または配列番号5）に示した配列のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む単離DNA分子である。

【0032】

本発明のDNA分子またはその断片は、配列番号2、配列番号4または配列番号6に示したアミノ酸配列を有するB99と命名された（ポリ）ペプチド（B99-1、B99-2またはB99-3）またはそれに由来するタンパク質断片若しくはペプチドをコードする；これには、遺伝子コードの縮退の結果として配列番号1、配列番号3または配列番号5に示した配列からの変異を示すDNA分子が含まれる。

10

本発明はまた、腫瘍ワクチンとしての使用に関して望ましい免疫原性特性を有するB99誘導体または断片又はペプチドをコードするならば、アミノ酸の保存的置換によって生じる配列番号1または配列番号3（または配列番号5）に示した配列からの逸脱を有するDNA分子に関する。

上で定義した、B99-1、B99-2またはB99-3またはそれらの断片をコードする、場合により改変されていてもよいDNA分子は、以下では特に断らない限り「B99-DNA分子」という。

本発明のB99-DNA分子または、これも本発明の主題である対応するRNAは、それらによってコードされる（ポリ）ペプチドと同様に、癌疾病の免疫療法のために使用される。

20

【0033】

本発明の一つの実施態様では天然のB99ポリペプチドをコードするDNA分子が使用される。天然のB99 cDNAまたはその断片の代わりに、改変した誘導体を使用することもできる。これらには、より大きな免疫原性を有するタンパク質（断片）またはペプチドをコードする改変を有する配列が含まれ、一方、上述したペプチドに適用されるのと同じ考察がDNAレベルの改変に適用される。他の型の改変は、数珠のように免疫的に関連のあるペプチドをコードする多数の配列を並べることである（Toesら、1997）。配列はまた、免疫原のより効率的な放出とプロセッシングを保証する補助的要素を追加することによって改変してもよい（Wuら、1995）。例えば、抗原のプロセッシングおよび、従って抗原の提示および最終的な免疫原性はエンドプラズミックレティキュラムへの局在配列（「ER標的化配列」）を追加することにより増大させることができる。

30

【0034】

他の側面では、本発明はB99-DNAを含む組換えDNA分子に関する。

本発明のB99-DNA分子は、好ましくはプラスミドとして組換え形態で直接、または組換えウイルス若しくはバクテリアの一部として投与してよい。理論的には、*in vivo*および*ex vivo*のどちらのいでも、どんな遺伝子治療方法もDNA（DNAワクチン）、B99-DNAに基づく癌免疫療法のためにも使用し得る。

*In vivo*投与の例は、筋肉内経路による、あるいは遺伝子銃を用いた「裸の」DNAの直接注入であり、これは腫瘍抗原に対するCTLの形成をもたらすことが示されている。組換え体生物の例はワクシニアウイルス、アデノウイルス又はリステリア単球遺伝子（*monocytogene*）である（概説がCoullie（1997）によって与えられている）。さらに、カチオン性脂質、微小球体、微小ペレットまたはリポソームのような核酸用の合成担体をB99ペプチドをコードする核酸分子の*in vivo*投与のために使用してもよい。ペプチドの場合のように、免疫応答を増強する、サイトカインのような種々のアジュバントを投与してもよく、アジュバントはタンパク質の形であってもそれをコードするプラスミドの形であってもよい。この適用は場合により物理的な方法、例えばエレクトロポレーションと組み合わせてもよい。

40

【0035】

*ex vivo*投与の例は、Tutting（1997）によって記載されたような樹状細胞のトランスフェクション、または細胞性癌ワクチンとして使用される他のAPCのトラ

50

ンスフェクションである。

従って、他の側面によれば、本発明は癌ワクチン製造のための、対応するコード配列でトランスフェクション後、B99自体または場合によりその改変された形態を発現する細胞の使用に関する。

他の側面では、本発明はB99又はその断片に対する抗体に関する。ポリクローナル抗体は動物、特にウサギを免疫することによって、抗原又はその断片を注射し、続いて免疫グロブリンを精製することによって慣用的に得られる。

モノクローナル抗B99抗体はK o l e rとM i l s t e i n (1 9 7 5) によって記載された原理に従った標準的な方法により、動物特にマウスを免疫し、免疫動物の抗体産生細胞を、例えばミエローマ細胞と融合させることにより不死化し、得られたハイブリドーマの上清を免疫学的に標準的なアッセイにより抗B99抗体についてスクリーニングすることによって得ることができる。ヒトにおける治療的又は診断適使用のために、これらの動物抗体は場合により通常のやり方でキメラ化(N e u b e r g e r ら、1 9 8 4、B o u l i a n n e ら、1 9 8 4) しても、ヒト化(R i e c h m a n n ら、1 9 8 8、G r a z i a n o ら、1 9 9 5) してもよい。

【0036】

ヒトモノクローナル抗B99抗体(またはその断片)はいわゆるファージディスプレイライブラリー(W i n t e r ら、1 9 9 4、G r i f f i t h s ら、1 9 9 4、K r u i f ら、1 9 9 5、M c G u i n e s s ら、1 9 9 6) から、およびトランスジェニック動物(B r u g g e m a n n ら、1 9 9 6、J a k o b o v i t s ら、1 9 9 5) によっても得ることができる。

本発明の抗B99抗体は診断目的の免疫組織学的分析に使用することができる。

他の側面において、本発明は、B99を発現する腫瘍に対してまたはその中へ所望の物質を選択的に与えるためのB99特異的抗体の使用に関する。そのような物質の例は、細胞障害性試薬または放射活性原子核であり、その活性が*i n s i t u*で腫瘍を損傷することにある物質である。B99の腫瘍特異的発現のために、副作用は全くまたはほとんど予想しえない。他の側面によれば、B99を発現する細胞を顕在化させるための物質をB99抗体の助けと共に使用してもよい。これは診断および治療の評価のために有用である。抗B99抗体に応用できる治療的および診断的な抗体の使用はW O 9 5 / 3 3 7 7 に記載されている。

【0037】

B99と命名された本発明のTAAおよびそれに由来するタンパク質断片、ペプチドまたはペプチド等価物またはペプチド擬似物は癌治療、例えば、対応する抗原決定基を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するために使用することができる。これらは、好ましくは、B99-陽性腫瘍、特に、腎臓細胞、肺、大腸、膵臓、乳および胃の癌の治療のために使用される。

腫瘍細胞におけるB99の優先的発現のために、このタンパク質は腫瘍にとって重要な機能、例えば、腫瘍形成、浸潤及び増殖などの機能を有することが仮定される。従って、B99(DNA)はこのタンパク質の活性を調節、特に阻害する物質を同定するためのスクリーニングアッセイに使用することができる。ある実施態様では、そのようなアッセイは、B99タンパク質またはその活性化断片を細胞に導入すること、または、B99-DNAを細胞中で発現させること、およびテスト物質の存在下または非存在下における細胞の増殖を測定することを含む。増殖阻害性効果を有する物質はB99の強い発現を有する腫瘍、特に、肺癌、大腸癌、乳癌、腎臓細胞癌およびホジキンリンパ腫の治療に使用することができる。

【0038】

(実施例)

実施例1. ヒト肺腺癌細胞株(A549)と正常肺組織のRDA(提示的差異解析(*r e p r e s e n t a t i o n a l d i f f e r e n c e a n a l y s i s*))

A T C C より入手したヒト肺腺癌細胞株A549(C C L 1 8 5) を T 1 5 0 細胞培養フ

10

20

30

40

50

ラスコで培養した。使用した培地は、10%熱不活性化ウシ胎仔血清および2 mM L-グルタミンを添加したMEMである。細胞を増殖させるため、3~4日ごとに細胞をトリプシン処理によって1:5~1:10に分けた。約80%コンフルエントになった後、4 mlのトリプシン溶液(1 Lあたり、8 gのNaCl、0.2 gのKCl、1.13 gの無水Na₂HPO₄、0.2 gのKH₂PO₄、100 mlの2.5%トリプシン溶液および1 gのEDTA-Na塩; pH 7.2~7.4)を各T150細胞培養フラスコに加えて、細胞を収集した。4 mlを15 ml Falcon試験管に移し、8 mlのPBSを添加し、この混合物をHaereus卓上遠心機(Megaforce 2.0R)にて1200 rpmで4分間遠心し、細胞ペレットを1 mlの溶解バッファー(10 mM TrisHCl pH 8、140 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.5% NP40)と混合し、激しく攪拌し、2 ml エッペンドルフ容器内で1200 rpmで4分間Sigma卓上遠心機(Sigma、202 MK)で遠心した。

【0039】

上清を別のエッペンドルフ容器に移し55 μlの20% SDS溶液を加えた後、2倍体積のCHCl₃/フェノール(1:1 v/v)混合物で抽出し、同じ体積のCHCl₃で抽出した。RNAを含む水性相を1/10体積の3 M NaAc(pH 5)および2倍体積の96%エタノールと混合し、RNAを-20℃にて一晩沈殿させた。1 mgの全RNAから出発して、業者の指示に従い、PolyAtractキット(Promega)を用いてポリA(+) RNAを単離した。A549ポリA(+) RNAの保存は、DEPC-処理水中1 mg/mlの濃度で、小分けして-80℃で行った。

提示的差異解析(RDA; HubankとSchatz、1994; Diatchenkoら、1996)を行うため、肺腺癌細胞株A549のポリA(+) RNAをテスターとして用い、一方、正常肺組織のポリA(+) RNA(1 mg/ml; Clontech、Palo Alto; #6524-1)をドライバーとして使用した。RDAはPCR-selectTMキット(Clontech、Palo Alto)を用いて、以下の配列を有する改変プライマー/アダプター-2-オリゴヌクレオチド系を使用したことを除いて業者の指示に従って行った:

5' - TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTACCGAGCTCGAG - 3' (アダプター-2-alt-1; 配列番号19)、5' - AGGGCGTGGTACCGAGCTCGAG - 3' (入れ子PCRプライマー-2-alt; 配列番号20)、および、5' - GGCTCGAGCTC - 3' (アダプター-2-alt-2; 配列番号21)。新たに作製したプライマー/アダプター配列は、入れ子PCRプライマー-2-altの配列中の3つの制限酵素切断部位(KpnI、SacIおよびXhoI)の存在により、サブトラクションしたcDNA断片をPCR IIベクターにクローニングした後に関連するcDNA断片を切り出すことを可能にする。従って、多数の利用可能な制限酵素切断部位を有するプライマー/アダプター配列を設計することが必要である。なぜなら、PCR-増幅工程によって点変異がしばしば観察され、特にプライマー配列中に観察されるからである。

【0040】

オリゴdTを用いて二本鎖cDNAを合成した後、テスターおよびドライバーから得られたcDNAをRsaIで消化した(RsaIは4塩基認識制限酵素であり、統計学的平均として256 bp長の断片を生じさせる)。テスターcDNAの等価部分をアダプター1または2とライゲーションし、別個に過剰量のドライバーcDNAと65℃でハイブリダイズさせた。次にこの2つの混合物を合わせ、新たに変性させたドライバーDNAと第2のハイブリダイゼーションにかけた。濃縮されたテスター特異的cDNAを次にアダプター1または2に特異的なプライマーを用いてPCRによって指数関数的に増幅した。更なる濃縮のため、この反応からのアリコートの特異的な内部シフト(入れ子)プライマーで第2のPCRにかけた。この反応によって指数関数的に増幅されたcDNA断片をPCR IIベクター(Invitrogen; 「TAKクローニングベクター」)に直接ライゲーションし、次に、ライゲーション混合物の1/3をコンピテント大腸菌(One Shot

^{T M}, Invitrogen) にトランスフェクションした。

【0041】

712個の陽性形質転換体(青-白選抜)が得られ、96ウェルブロック中、LB-Amp培地(ウェルあたり1.3ml)で37にて48時間培養した。プラスミドDNA調製のため(業者の指示に従った、QIAGENの96-ウェル微量調製法)ウェルあたり750μlの大腸菌懸濁液を使用した。残りのバクテリア培養物はグリセリン保存培養物として-80に保存した。

712の個々のクローンからなるcDNAサブトラクションライブラリーが得られ、それぞれ大腸菌グリセリン保存培養物および精製プラスミドの両方の形態で存在させた。

【0042】

実施例2. TAA候補のDNA配列およびアノテーション

712個の全てのクローン(実施例1参照)から単離したプラスミドDNAをサンガー法により、ABI Prism装置を用いてシーケンシングした。得られた配列をBioScoutソフトウェア(LION, Heidelberg)を用いてアノテーションし、データバンク(Genbank)比較にかけた。712個のクローンのうち、678個をシーケンシングし注釈をつけることができた。残り(34)はポリAのみを挿入として含むか、再結合したベクターに対応するものか、またはシーケンシングできなかった。アノテーションできた678個の配列のうち、357は既知の機能を有する遺伝子であることが分かった。残りの321個は未知の機能の遺伝子をコードするクローンを表していた; これらのうちの59個はヒトESTデータバンクにエントリーすら無かった。既知の遺伝子はそれ以上処理しなかった。

【0043】

ESTエントリーが入手可能な未知の遺伝子については、発現プロファイルを評価した: 実験的に決定された対応するサブトラクションライブラリーの配列に属する、95%より大きな同一性を有するEST(BLAST)を調べた。アノテーションにおいて、i) 決定的正常組織、ii) 胎児性、「使い捨て可能」な、および、免疫特権的組織およびiii) 腫瘍および腫瘍細胞株、に細分化した。この「仮想的mRNAプロフィール」に基づいて、ESTがグループi)に見出されなかった200個のクローンを更なる実験的解析のための選抜した(ESTエントリーがなかった59クローンを含む)。更に候補クローンを絞り込むために、200個の選抜クローンから決定された配列からオリゴヌクレオチドプライマー対を設計して合成した。まず初めに、pCMVSPORT中に方向付けてクローニングされている、ヒト組織から由来する8種の異なるcDNAライブラリー(Gibco BRL, SUPERSCRIPT^{T M})を、問題にしている候補クローンの存在について定性的PCRによってテストした。用いたcDNAライブラリーは、心臓組織(#10419-018)、肝臓(#10422-012)、白血球(#10421-022)、腎臓(#10420-016)、肺(#10424-018)、精巣(#10426-013)、脳(#10418-010)および胎児脳(#10662-013)に由来するものであった。

【0044】

PCR条件は以下の通りである: 総量20μlの各PCR混合物中、1xTaqPolバッファー(50mM KCl、10mM TrisHCl pH9、0.1% Triton X-100)、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs(Promega)、0.025U/μl Taq-DNA-ポリメラーゼ(Promega)、5pMの特異的オリゴヌクレオチドプライマー(配列番号7および配列番号8)および調べるべき100ngのプラスミドDNAを含む。対照として、GAPDHに特異的なプライマー(配列番号14および15)を使用した。選択性の証拠を検査するため、このプライマー対は単離プラスミドについても並行してテストした。これらのPCR条件(1サイクル: 3'94; 35サイクル: 1'94 - 1'55 - 1'22; 1サイクル: 7'72)において、正常な決定的組織(心臓、肝臓、肺、腎臓および白血球)のひとつにおいて予想された長さの断片が検出されるが、免疫特権的組織(脳、胎児脳および精巣)に

10

20

30

40

50

において検出されないことを選抜基準として定義した。この定性的PCR解析を用いて、多数の候補を56にまで絞ることができた。

【0045】

実施例3．種々の腫瘍および正常組織における候補クローンの転写解析

RT-PCR解析のために、同型の3種の異なる組織からの3 μ gの全RNAから調製したcDNAプールを使用した。腫瘍または正常組織プールあたり9 μ gの全RNAをAMV-RT(Promega)によって業者の推奨に従って逆転写した。ゲノムDNAの混入を防ぐため、RNAは前もってDNase I(Boehringer Mannheim)とインキュベーションした。cDNAの質および量はGAPDH特異的プライマー(配列番号14および15)を用いたPCRによる20サイクル後(30"、95"、90"、60")にテストした。B99-cDNAは配列番号7および8に記載のB99-特異的プライマーで、1'95"、1'55"、1'72"のプログラムの25、30および35サイクルによって増幅した。他の55の候補クローンを特異的プライマーを用いて同様に調べた。

10

【0046】

PCR産物をアガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出した。調べた56個のクローンの3つについて、RT-PCRは正常組織に比較して種々の腫瘍組織において発現が増大していることを明らかにした。候補の例、B99を図1に示した：種々のヒト腫瘍および正常組織のcDNAプールのB99特異的プライマーによる解析は、大腸癌および肺腺癌細胞株A549において強いシグナルを生成し、乳癌および腎臓細胞癌において弱いシグナルを生成した。調べた全ての正常組織について、弱いシグナルが大腸組織に見られただけであった。候補B99を以後更に詳細に評価した。

20

【0047】

実施例4．腫瘍及び正常組織におけるB99の発現プロファイル

56個の候補の一つ(B99と命名)はRT-PCR転写により、調べた5つの腫瘍組織プールの3つにおいてシグナルを示した。一方、調べた正常組織の大部分では、転写を検出することはできなかった。B99発現のより詳細な研究のため、個々の腫瘍および正常組織サンプルのcDNAを以下のようにPCRによって解析した。調べた全ての大腸癌の大部分(17/23)、全ての膵臓癌(3/3)および全ての胃癌(4/4)がB99を発現していることが見いだされた。対応する正常組織では、それぞれ事例の1/4、0/3および2/4で発現が検出された。全ての結果は表1に示してあり、一方図2には膵臓および大腸癌における結果例を示した：種々のヒト腫瘍および正常組織の個々のcDNAのB99特異的プライマーによるRT-PCR解析によって、B99-cDNAを7つの腫瘍サンプルのうち6つで検出することができたが、調べた正常組織のうち1つだけ(1/6)がB99の弱いシグナルを示した。

30

【0048】

【表1】

表1．

腫瘍組織		正常組織	
型	陽性例/検査例	型	陽性例/検査例
大腸癌	17/23	大腸	1/4
肝臓癌	0/3	肝臓	0/4
肺癌	2/9	肺	0/4
乳癌	0/10	n.d.	
膵臓癌	3/3	膵臓	0/4
腎臓細胞癌	1/10	腎臓	0/4
胃癌	4/4	胃	2/4
		白血球	0/1
		小腸	1/1
		卵巣	0/1
		精巣	0/4
		前立腺	0/1
		胸腺	0/1
		脾臓	0/4
		筋肉	0/1
		脳	0/1
		心臓	0/4

10

20

【0049】

ノーザンブロット解析のため、ヒト複数組織ノーザンブロット (Clontech、Palo Alto) を 65 にて 16 時間、 $[^{-32}P]$ dCTP (NEN、Boston) で標識した 271bp B99 PCR 産物とハイブリダイズさせた。視覚化は標準的なオートラジオグラフィ (Xmot AR フィルム、Kodak) およびホスフォ画像解析装置 (Molecular Dynamics) への曝露によって行った。図 3 は、16 の正常組織の解析結果を示す。~ 3.0 kb の大きさの転写物が大腸、および、ずっと弱い十二指腸においてのみ見られた。シグナルの強度が弱いことは、免疫学的に関連する発現はありそうにないという結論を導く。

30

B99 の mRNA プロファイルに関する全てのテスト (RT-PCR およびノーザンブロット解析を合わせたもの) を表 1 にまとめた。実施例 4 は、種々の指標の腫瘍の高いパーセンテージにおいて B99 は明瞭に発現されているが、調べた全ての正常組織において転写は全くまたは限られた事例にしか見られないことを示すものである。

40

【0050】

実施例 5 . ヒト腫瘍における B99 タンパク質発現の検出

B99 タンパク質発現を検出するため、B99 特異的抗体をウサギで作製した。免疫のため、バクテリア融合タンパク質 pGEX-ORF-1/1 (グルタチオン-S-トランスフェラーゼが B99 ORF の一部 (配列番号 1 の位置 1278 ~ 1740) に融合している) を使用した。得られた血清をペプチド B99-KML (配列番号 61) でアフィニティー精製した。この血清の特異的反応性を調べるために、完全な B99 オープンリーディングフレームを COS 細胞中で GFP 融合タンパク質として一過性に発現させ、トランスフェクションした細胞をウエスタンブロットでこの血清を用いてテストした。この血清

50

は発現された B 9 9 融合タンパク質と明瞭に反応することが示された。続いて、種々の腫瘍型からの 5 6 個のサンプルを B 9 9 発現について B 9 9 血清を用いた免疫組織化学により調べた (表 2)。

【 0 0 5 1 】

5 3 例で B 9 9 の発現が腫瘍細胞中において示された。その例は図 4 に見ることができる。図 4 は、腺癌の 4 つの異なる症例 (a . 大腸、 b . 乳、 c . 膵臓、 d . 胃) の免疫組織化学解析を示している。全ての症例において腫瘍細胞の明瞭な染色を見ることができ、一方、腫瘍ストロマおよび血管は染色されなかった。図 4 a からは、残存する正常大腸粘膜はこの抗体と反応性を示さないことも見ることができる。切片をヘマトキシリンで対比染色した。選択した症例において、免疫組織化学における陽性反応性は R T - P C R によって R N A レベルで確認した。この実験では、乳癌も陽性 P C R シグナルを発生させた。実施例 4 とこの結果との相違は、実施例 4 におけるのと異なる P C R プライマ - の使用によって説明することができる。

10

【 0 0 5 2 】

【 表 2 】

表 2 .

腫瘍型	陽性症/検査例
乳腺癌	8/8
大腸腺癌	10/11
肺腺癌	7/8
肺扁平上皮細胞癌	8/8
膵臓腺癌	11/12
胃腺癌	9/9

20

30

【 0 0 5 3 】

実施例 6 . B 9 9 のクローニング

クローン B 9 9 は R D A によって導入されたアダプター間に 2 7 1 b p 長の未知のヒト遺伝子の挿入を有している。ヒト配列を完全にクローニングするために、以下の手順を用いた : U n i G e n e A n a l y s i s (国立バイオテクノロジー情報センター (N a t i o n a l C e n t r e f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n)) は B 9 9 に相同な以下の E S T を生成した : A A 3 1 5 4 6 9 、 A A 3 4 5 7 8 0 、 A A 2 9 5 5 2 0 。これらの E S T を用いて、B 9 9 の配列を 4 3 9 ヌクレオチドまで拡張することができた。この配列内の新たなプライマーを合成した (配列番号 9 から 1 2) 。これらのプライマーの種々の組み合わせを用いた P C R により、A 5 4 9 c D N A から理論的断片長を増幅することができた。

40

【 0 0 5 4 】

3 ' 末端のクローニング : 腎臓細胞癌細胞株 7 8 6 - 0 からの 1 0 μ g の全 R N A をオリゴ d T プライマーを用いて逆転写し、この c D N A のアリコートを用いて P C R にかけた。P C R のプログラムは、遺伝子特異的プライマーのみが c D N A に結合するように (プライマー、配列番号 7 または 9) 高いアニーリング温度で開始し、一方第 2 のプライマー (T m ~ 5 3 、配列番号 1 3) が低い温度で新たに合成された D N A 基質にのみ結合するようなものである。このいわゆる「タッチダウン P C R」(M a s t e r c y c l e r G r a d i e n t , E p p e n d o r f) を以下の条件で行った : 2 0 サイクルの { 1 5

50

" 9 5 、 3 0 " 7 5 (サイクルごとに 0 . 7 低下) }、 1 サイクルの 7 ' 7 2
 および 2 0 サイクルの (1 5 " 9 5 、 3 0 " 5 0)、 1 サイクルの 7 ' 7 2

【 0 0 5 5 】

上記混合物のアリコートを手 2 のプライマーの組み合わせ (配列番号 7 および 1 3、 または配列番号 1 2 および 1 3) を用いて前と同じ条件でもう一度 P C R 増幅した。 P C R 混合物のアリコートを p G E M - T e a s y - v e c t o r (P r o m e g a) に直接ライゲーションし、続いてこれでコンピテント大腸菌 J 1 0 9 (P r o m e g a) を形質転換した。 P C R 選抜後、陽性クローンをシーケンシングした。シーケンシングは P C R 増幅に用いたプライマーから得られる前の配列と矛盾せず、加えてこの配列の 3 ' - 領域のポリ A の開始部位に至る 1 7 7 7 の追加のヌクレオチド配列をもたらした。腫瘍細胞株 (7 8 6 - 0、 A 5 4 9) および大腸癌からの組織サンプルの c D N A の、配列番号 1 6 ~ 1 8 記載のプライマーを用いた P C R は、最初のプライマーと共に、クローニング後に予想される断片を作り出した。ここで 2 2 1 6 b p となった c D N A 断片中、位置 4 2 7 から 1 7 4 3 に連続したリーディングフレームを同定することができた。この配列の 5 ' - 領域中に更なるリーディングフレームを同定することができなかつたので、 0 ~ 4 2 7 の領域が B 9 9 m R N A の 5 ' - 非翻訳領域に属すると結論される。

【 0 0 5 6 】

配列番号 1 2 および配列番号 1 7 のプライマーを用いて、 A 5 4 9 - c D N A から B 9 9 の全コード領域を増幅し、クローニングし、およびシーケンシングした。シーケンシングにおいて、配列番号 1 (B 9 9 - 1 をコードする) と比較して位置 9 2 3 にヌクレオチドの挿入を有する多数のクローンが得られた (配列番号 3 または配列番号 5)。この挿入は B 9 9 のオープンリーディングフレームに変化を生じさせ、その結果として B 9 9 タンパク質の C - 末端領域中のアミノ酸配列変化を生じさせる ; このリーディングフレームに由来する B 9 9 抗原 (B 9 9 - 2) の配列を配列番号 4 に示した。 A 5 4 9 細胞から単離したクローンの一つは、上述した挿入に加えて、配列番号 1 に比較して位置 6 2 2 にヌクレオチド置換を示した。このヌクレオチド置換は、アミノ酸配列の位置 6 6 番において、アルギニン (配列番号 2、 B 9 9 - 1) のトリプトファン (配列番号 4、 B 9 9 - 2) による置換を生じさせる。このアミノ酸置換を別にすれば、 B 9 9 - 2 のアミノ酸配列は B 9 9 - 1 と位置 1 6 6 まで同一である。更に、上述した挿入は配列番号 3 (または配列番号 5) に示した配列において位置 8 4 5 ~ 1 7 4 4 の第 2 の潜在的リーディングフレームを生じさせる。このリーディングフレームを有する c D N A によって発現されるタンパク質は配列番号 6 に示したアミノ酸配列を有する (B 9 9 - 3)。 B 9 9 - 3 の配列は、 B 9 9 - 1 と位置 1 ~ 2 7 が異なっており、位置 2 8 以降は B 9 9 - 1 と同一である。

【 0 0 5 7 】

実施例 7 . B 9 9 のコード領域中の潜在的 M H C - 結合ペプチド
 配列番号 2 に記載の B 9 9 - 1 のコード領域 (アミノ酸位置 : 1 - 4 3 8 ; 表 3 A)、配列番号 4 に記載の B 9 9 - 2 のコード領域 (アミノ酸位置 : 1 5 0 - 1 9 0 ; 表 3 B) および、配列番号 6 に記載の B 9 9 - 3 のコード領域 (アミノ酸位置 : 1 - 4 0、表 3 C) 内の可能性のあるペプチドエピトープを、 P a r k e r ら、 1 9 9 4 によって記載されたアルゴリズムを用いて既知のモチーフ (R a m m e n s e e ら、 1 9 9 5) に基づいて処理した。最も重要な H L A 型、特に H L A - A 1、 - A * 0 2 0 1、 - A 3、 - B 7、 - B 1 4 および - B * 4 4 0 3 について、 9 m e r 候補ペプチドを同定した。これら是对応する H L A 分子に結合することが期待され、従って、免疫原性 C T L - エピトープを構成することが期待される ; 発見されたペプチドは表 3 に列挙した。他の H L A 型に関する他の可能性のあるペプチドエピトープまたは、 8 m e r および 1 0 m e r ペプチドを同様な手順で決定することができる。

【 0 0 5 8 】

【 表 3 】

10

20

30

40

50

表 3 A . 免疫原性 B 9 9 ペプチド候補 (B 9 9 - 1)

配列番号 2 における開始位置	配列	HLA
5	Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu	B14
12	Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met	A*0201
19	Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu	A*0201
21	Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu	A*0201
85	Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys	A3
90	Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe	A3
95	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr	B*4403
96	Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu	B7
123	Pro Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Phe	A3
127	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr	B*4403
147	Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala	B14
187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	A*0201

10

20

【 0 0 5 9 】

【 表 4 】

表 3 A 続き

206	Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu	A*0201
209	Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	A*0201
251	Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys	A1, A3
275	Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys	A3
305	Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys	A3
318	Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr	A1
400	Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu	A*0201
407	Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys	A3
413	Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu	B7
422	Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr	A1
423	Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys	A1, A3

30

【 0 0 6 0 】

【 表 5 】

表 3 B . 免疫原性 B 9 9 ペプチド候補 (B 9 9 - 2)

40

配列番号4における開始位置		
152	Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr	A1,A3
154	Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr Cys Val	A*0201
160	Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val	A*0201
163	His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn	A1
164	Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe	A1,B*4403
172	Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr	A1
177	Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys	A1
182	Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln	A*0201

10

【0061】

【表6】

表3C. 免疫原性B99ペプチド候補(B99-3)

配列番号6における開始位置		
2	Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr	A1,B14
5	Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu	A*0201
10	Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg	A1
12	Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr	A1,A3
14	Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val	A*0201
16	Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met	A*0201

20

30

【0062】

実施例8. 可能性のあるB99特異的MHC結合ペプチドによるMHC安定化アッセイT2ペプチド装荷アッセイにおいて、HLA-A2分子を安定化させる能力について潜在的B99MHC結合ペプチドをテストした。これはペプチドのMHC結合能のヒントとなる。このアッセイは、Bohmら(1998)によって記載されたように行った。HLA-A2特異的抗体(BB7.2)を用いてFACS解析によって安定化を測定した。5つのペプチドが、ペプチドを含まないかまたは結合しないMAGE-3A1対照ペプチドを含む対照と比較して平均蛍光強度が増加したことによって示される、安定化効果を示した。

40

【0063】

【表7】

表4.

ペプチド	配列	平均蛍光強度
ペプチドなし		2,27
MAGE-3 A1 陰性対照	Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr	2,25
B99-12	Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met Leu	7,46
B99-19	Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu	7,43
B99-21	Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu	3,32
B99-187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	3,57
B99-209	Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	4,72

10

【0064】

更なる解析のため、これらの結合が濃度依存性であるかどうかを調べるためペプチドを系列希釈し、同じ試験系でテストした。図5は、種々のB99ペプチド濃度におけるT2細胞上のMHC安定化を示す。チロシナーゼを陽性対照として使用し、HLA-A1-特異的MAGE-3ペプチドを陰性対照として使用した。特に、ペプチドB99-19、B99-187およびB99-209はMHC安定化について明瞭な濃度依存性を示した。このことは、それらのペプチドを免疫ストラテジーのための好ましい候補とするものである。

20

【0065】

文献

- Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga, J., and Knop, J. (1997), *J. Immunol. Methods* 203, 171-180.
- Blake, J., Johnston, J.V., Hellstrom, K.E., Marquardt, H., and, Chen, L. (1996), *J. Exp. Med.* 184, 121-130.
- Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, and A. Van Pel (1994), *Annu. Rev. Immunol.* 12: 337-365
- Boon T, (1998). Tumor antigens recognized by cytolytic T cells. *Cancer Vaccine Week - International Symposium*, New York, Oct 1998; abstract S01
- C. M. Bohm, M. L. Hanski, S. Stefanovic, H. G. Rammensee, H. Stein, J. Taylor-Papadimitriou, E. O. Riecken, and C. Hanski. *Int. J. Cancer* 1998. Mar. 2. 75: 688-693
- Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312: 643-646
- Bruggemann, M. and Neuberger, M.S., (1996), *Immunol. Today* 17: 391-397
- Buschle M, Schmidt W, Zauner W, Mechtler K,

30

40

50

- Trska B, Kirlappos H, Birnstiel M (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3256 - 3261
- Celluzzi, CM and Faló, LD, Jr. (1998), *J. Immunol.* 160: 3081 - 3085
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1914 - 1918.
- Coulie, P.G. (1997), *Mol. Med. Today* 3: 261 - 268 10
- Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow, TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, and Slingluff, CL, Jr. (1994), *Science* 264: 716 - 719
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6025 - 6030. 20
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539 - 3543.
- Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J (1985), *J. Virol.* 55: 836 - 839
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanović, S., Jung, G., and Rammensee, H-G (1991), *Nature* 351: 290 - 296. 30
- Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H.I., Simons, J.W., Kasuyama, H., Vogelstein, B., and Frost, P. (1990), *Cell* 60: 397 - 403.
- Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K., Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), *J. Exp. Med.* 172: 1217 - 1224.
- Gaudi C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F (1999), *J Immunol* 162: 1730 - 1738
- Graziano, R.F., et al., (1995), *J. Immunol.* 155: 4996 - 5002 40
- Griffiths, A.D., et al., (1994), *EMBO J.* 13: 3245 - 3260
- Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, and Barnetson RS (1995), *World J. Surg.* 19: 352 - 358
- Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SBC, Lekstrom KJ, Deacon DD, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CL, Ross MM (1998), *Cancer Res* 58: 5144 - 5150 50

- Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), *Nucleic Acids Res.* 22, 5640-5648.
- Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J., and Knuth, A. (1998), *J. Exp. Med.* 187, 265-270.
- Jakobovits, A., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 561-566
- Jameson, BA and Wolf, H (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4: 181-186
- Jessup, JM and Loda, M (1998) Prognostic markers in rectal carcinoma. *Semin. Surg. Oncol.* 15: 131-140.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., King, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1995), *J. Immunol.* 154: 3961-3968.
- Kawakami, Y, Robbins, PF, and Rosenberg, SA (1996), *Keio J. Med.* 45: 100-108
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975), *Nature* 265, 495-497
- Kruif, J., et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3938-3942
- Kyte, J and Doolittle, RF (1982), *J. Mol. Biol.* 157: 105-132
- Lethe, B, Lucas, S, Michaux, L, De Smet, C, Godelaine, D, Serrano, A, De Plaen, E, and Boon, T (1998), *Int. J. Cancer* 76: 903-908
- Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F, Viel S, and Hercend T (1993), *Cancer Res.* 53: 3569-3573
- Mandruzzato S, Basseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P (1997), *J Exp Med* 186: 785-793
- Marchand M, Weynants P, Rankin E et al (1995), *Int. J. Cancer* 63: 883-885
- Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falco, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., and Lotze, M.T. (1995), *Nature Medicine* 1, 1297-1302.
- McGuinness, B.T., et al., (1996), *Nature Biotechnol.* 14, 1149
- Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 8: 651-657
- Murphy, G.P., Elgamal, A.A., Su, S.L., Bost 50

- wick, D.G., and Holmes, E.H. (1998), *Cancer* 83, 2259-2269
- Neuberger, M.S., et al., (1984), *Nature* 312 : 604-608
- Pardoll, D.M. (1998) *Nature Medicine* 4: 525-531
- Parker, K.C., M.A. Bednarek, and J.E. Coligan. (1994), *J. Immunol.* 152:163.
- Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Kawakami, Y. (1996), *J. Immunol.* 157, 2539-2548. 10
- Pateron Y, Ikonomidis G (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5: 664-9
- Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995), *Immunogenetics* 41:178-228
- Rapellino, M, Pecchio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, and Cavallo, A (1995), *Anticancer Res.* 15: 1065-1070
- Ravaioli, A., Bagli, L., Zucchini, A., and Monti, F. (1998), *Cell. Prolif.* 31, 113-126 20
- Revillion, F, Bonnetterre, J, and Peyrat, JP (1998), *Eur. J. Cancer* 34: 791-808
- Restifo NP (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5: 658-63
- Riechmann, L., et al., (1988), *Nature* 332: 323-327
- Robbins, PF and Kawakami, Y (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 8: 628-636
- Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., and Sette, A. (1993), *Cell* 74, 929-937. 30
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11810-11813
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989 40
- Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, and Segurado OG (1993), *J. Immunol.* 151: 4209-4220
- Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kirlappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel M (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94:3262-3267
- Schweighoffer, T. (1997), *Onc. Res.* 3, 164-176
- Sette, A., Vitiello, A., Reherman, B., Fowl 50

- er, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-F., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., and Chisari, F.V. (1994), *J. Immunol.* 153, 5586 - 5592.
- Stauss, H.J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., and Sinclair, C. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7871 - 7875. 10
- Tepper, R.I., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1989), *Cell* 57: 503 - 512.
- Tighe H, Corr, M, Roman M, and Raz E (1998), *Immunol. Today* 19: 89 - 97
- Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Rensing, M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (26): 14660 - 14665
- Tuting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., and Storkus, W.J., (1997), *Eur. J. Immunol.* 27, 2702 - 2707, . 20
- Van den Eynde, B. and Brichard, V.G. (1995), *Curr. Opin. Immunol.* 7, 674 - 681.
- Van den Eynde, BJ, and van der Bruggen, P (1997), *Curr. Opin. Immunol.* 9: 684 - 693
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. (1991), *Science* 254: 1643 - 1647
- van der Burg, S.H., et al., (1996), *J. Immunol.* 156, 3308 - 3314 30
- van Elsas, A., van der Minne, C.E., Borghi, M., van der Spek, C.W., Braakman, E., Osanto, S., and Schrier, P.I. (1996), *CTL Recognition of an IL-2 Producing Melanoma Vaccine*. In: *Immunology of human melanoma. Tumor-host interaction and immunotherapy*, edited by M. Maio, Amsterdam: IOS, 1996, p. 165 - 173
- van Elsas, A., Aarnoudse, C., van der Minne, C.E., van der Spek, C.W., Brouwenstijn, N., Osanto, S., and Schrier, P.I. (1997), *J. Immunother.* 20: 343 - 353. 40
- Vaughan, T.J., et al., (1998), *Nature Biotechnol.* 16, 535 - 539
- Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, KW (1995), *Science* 270: 484 - 487
- Wang, L., et al., (1997), *Mol. Immunol.* 34: 609 - 618
- Wang, RF (1997), *Mol. Med.* 3: 716 - 731 50

- Wax, S.D., Rosenfield, C.L., and Taubman, M.B., (1994), J. Biol. Chem. 269, 13041 - 13047.
- Wax, S.D., Tsao, L., Lieb, M.E., Fallon, J.T., and Taubman, M.B. (1996), Lab. Invest. 74, 797 - 808.
- Winter, G., et al., (1994), Annu. Rev. Immunol. 12, 433 - 455
- Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), Int. J. Cancer 57: 413 - 418 10
- Woelfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D (1995), Science 269: 1281 - 1284
- Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(25): 11671 - 11675. 20
- Zitvogel, L., Mayordomo, J.I., Tjandrawan, T., DeLeo, A.B., Clarke, M.R., Lotze, M.T., and Storkus, W.J. (1996), J. Exp. Med. 183, 87 - 97.

【図面の簡単な説明】

【図 1】

B 9 9 特異的プライマーを用いた種々のヒト腫瘍組織および正常組織 cDNA プールの RT-PCR 解析。 30

【図 2】

B 9 9 特異的プライマーを用いた種々のヒト腫瘍組織および正常組織の個々の cDNA の RT-PCR 解析。

【図 3】

正常組織における B 9 9 の転写：16 の正常組織からの mRNA のノーザンプロット解析。


【図 4】

B 9 9 血清による、4 つの異なる腺癌症例の免疫組織化学解析。

【図 5】

種々の濃度の B 9 9 ペプチドによる T 2 細胞上の MHC 安定化。 40

【国際公開パンフレット】

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)																																																							
(51) Internationale Patentklassifikation 7: C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 9/10, A61K 38/08, 38/04, 31/70, 39/00, C07K 16/18		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/6727 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. November 2000 (09.11.00)																																																					
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/E00/03552 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. April 2000 (19.04.00)		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, HU, IL, IN, JP, KR, LI, LV, MK, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.																																																					
(30) Prioritätsdaten: 199 19 225.1 28. April 1999 (28.04.99) DE																																																							
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser USA): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). (72) Erfinder; und (73) Erfinder/Anmelder (nur für USA): ADOLF, Günther [AT/AT]; Sifrigasse 15-17/10, A-1070 Wien (AT); HEDER, Karl-Heinz [DE/AT]; Johann-Struss-Promenade 4/1, A-2000 Stockerau (AT); SOMMERGRUBER, Wolfgang [AT/AT]; Lutzerstrasse 19, Haus 4, A-3002 Purkersdorf (AT). (74) Anwälte: LAUDEN, Dieter; Boehringer Ingelheim GmbH, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE) usw.																																																							
(54) Title: TUMOUR-ASSOCIATED ANTIGEN (54) Bezeichnung: TUMORASSOZIIERTES ANTIGEN																																																							
(57) Abstract The invention relates to a tumour-associated antigen, to immunogenic peptides derived therefrom, to DNA molecules that code for said peptides and to the use thereof in the immunotherapy of cancer.																																																							
(57) Zusammenfassung Tumorssoziiertes Antigen, davon abgeleitete immunogene Peptide und dafür kodierende DNA-Moleküle sowie deren Verwendung in der Immuntherapie von Krebserkrankungen.																																																							
<table border="0"> <tr> <td rowspan="10" style="vertical-align: middle; text-align: center;">Tumor</td> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Brust AC</td> <td>BREAST AC</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Lunge AC</td> <td>LUNG AC</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Lunge SCC</td> <td>LUNG SCC</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>RCU</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Colon AC</td> <td>COLON AC</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>A549</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Kontrolle +</td> <td>CONTROL +</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Kontrolle -</td> <td>CONTROL -</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Kolon</td> <td>KOLON AC</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Herz</td> <td>HEART</td> </tr> <tr> <td rowspan="6" style="vertical-align: middle; text-align: center;">Normal</td> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Leber</td> <td>LIVER</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Lunge</td> <td>LUNG</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Milz</td> <td>SPLEEN</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Niere</td> <td>KIDNEYS</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>Testis</td> <td>TESTIS</td> </tr> <tr> <td style="background-color: black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td>A549</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Kontrolle +</td> <td>CONTROL +</td> </tr> </table>			Tumor		Brust AC	BREAST AC		Lunge AC	LUNG AC		Lunge SCC	LUNG SCC		RCU			Colon AC	COLON AC		A549			Kontrolle +	CONTROL +		Kontrolle -	CONTROL -		Kolon	KOLON AC		Herz	HEART	Normal		Leber	LIVER		Lunge	LUNG		Milz	SPLEEN		Niere	KIDNEYS		Testis	TESTIS		A549			Kontrolle +	CONTROL +
Tumor		Brust AC		BREAST AC																																																			
		Lunge AC		LUNG AC																																																			
		Lunge SCC		LUNG SCC																																																			
		RCU																																																					
		Colon AC		COLON AC																																																			
		A549																																																					
		Kontrolle +		CONTROL +																																																			
		Kontrolle -		CONTROL -																																																			
		Kolon		KOLON AC																																																			
		Herz	HEART																																																				
Normal		Leber	LIVER																																																				
		Lunge	LUNG																																																				
		Milz	SPLEEN																																																				
		Niere	KIDNEYS																																																				
		Testis	TESTIS																																																				
		A549																																																					
	Kontrolle +	CONTROL +																																																					

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabon	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Türkei
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brazilien	IL	Israel	MR	Mauritien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Canada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	WU	Westsahara
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NI	Nicaragua	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Litauen	SG	Singapur		

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Titel: Tumorassoziertes Antigen

Die Erfindung bezieht sich auf die Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

5 Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen zu schützen bzw. diese aktiv zu bekämpfen. Die Bedeutung eines intakten Immunsystems zeigt sich vor allem bei vererbten oder erworbenen Immundefizienzen. Der Einsatz von prophylaktischen Vakzinprogrammen erwies sich in
10 vielen Fällen als äußerst zielführende und erfolgreiche immunologische Intervention im Kampf gegen virale oder bakterielle Infektionserkrankungen. Weiters hat sich gezeigt, daß das Immunsystem auch an der Eliminierung von Tumorzellen maßgeblich beteiligt ist. Dabei spielt die Erkennung der tumorassozierten Antigene (TAAs) durch Komponenten des Immunsystems eine wesentliche Rolle. Im weitesten Sinn kann jede (peptidische oder nicht peptidische) Komponente einer Tumorzelle, die von
20 einem Element des Immunsystems erkannt und zur Stimulation einer immunologischen Antwort führt, als immunogenes Tumorantigen fungieren. Besondere Bedeutung kommt dabei jenen Tumorantigenen zu, die nicht nur eine immunologische Reaktion hervorrufen, sondern auch eine Abstoßung des Tumors bewirken. Die Identifizierung definierter Antigene, die solch eine immunologische Reaktion bewirken können, stellt einen wichtigen Schritt für die Entwicklung einer molekular definierten Tumorstoffdarstellung dar. Obwohl noch nicht ganz geklärt ist,
25 welche Elemente des Immunsystems für eine Abstoßung des

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Tumors verantwortlich sind, besteht doch ein Konsens darüber, daß dabei CD8-exprimierende zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) eine Hauptrolle spielen (Coullie, 1997). Besonders bei jenen Tumorarten (z.B. Melanom und Nierenkarzinom), die eine relativ hohe Spontanremissionsrate aufweisen, konnte eine Korrelation zwischen klinischem Verlauf und dem vermehrten Auftreten von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen festgestellt werden (Schendel et al., 1993; Mackensen et al., 1993; Halliday et al., 1995; Kawakami et al., 1995; Kawakami et al., 1996; Wang, 1997; Celluzzi und Falco, 1998). Dabei wurden spezifische CTL-Klone entweder aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) oder peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) nach Kultivierung mit meist autologen Tumorzellen und Zytokinstimulierung *in vitro* erhalten. Sowohl in Tiermodellen als auch in *in vitro* kultivierten humanen Zellkultursystemen konnte die T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen durch Transfektion der Tumorzellen mit Zytokinen verstärkt werden (van Elsas et al., 1997; Gansbacher et al., 1990; Topper et al., 1989; Fearon et al., 1990; Dranoff et al., 1993).

Aufgrund der Korrelation zwischen Remission und Beteiligung von CD8⁺-T-Zellen ist die Identifizierung tumorassoziierter Antigene (TAA), die durch CD8-positive CTLs erkannt werden, ein erklärtes Hauptziel auf dem Weg zur Entwicklung einer Tumorstoffimpfung (Pardoll, 1998; Robbins und Kawakami, 1996). Ob auch andere Zelltypen des Immunsystems wie z.B. CD4⁺-T-Helferzellen eine wesentliche Rolle spielen ist noch unklar; einige Studien mit MAGE-3/HLA-A1 Peptiden in Melanompatienten deuten darauf hin

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

(Marchard et al., 1995; Boon et al., 1995). In den vergangenen Jahren ist eine Reihe von TAAs, die durch CTLs erkannt werden, identifiziert worden (Boon et al., 1994; van den Eynde und van der Bruggen, 1997).

5 T-Zellen erkennen Antigene als Peptidfragmente, die an
Zelloberflächen von MHC-Molekülen („major
histocompatibility complex“, im Menschen „HLA“ = „human
leukocyte antigen“) präsentiert werden. Es gibt zwei
Klassen von MHC-Molekülen: MHC-I Moleküle kommen auf
10 den meisten Zellen mit Kern vor und präsentieren
Peptide (üblicherweise 8-10-mer), die durch
proteolytischen Abbau endogener Proteine entstehen
(sog. Antigen-Verarbeitung, „antigen processing“).
Peptid:MHC-I Komplexe werden von CD8-positiven CTLs
15 erkannt. MHC-II Moleküle kommen nur auf sog.
„professionellen antigen-präsentierenden Zellen“ (APC)
vor, und präsentieren Peptide exogener Proteine, die im
Zuge der Endocytose von APC aufgenommen und verarbeitet
werden. Peptid:MHC-II Komplexe werden von CD4-Helfer-T-
20 Zellen erkannt. Durch eine Interaktion zwischen
T-Zellrezeptor und Peptid:MHC Komplex können
verschiedene Effektormechanismen ausgelöst werden, die
im Fall von CTLs zur Apoptose der Zielzelle führen. Das
geschieht, wenn entweder der MHC (z.B. im Fall der
25 Transplantatabstoßung), oder das Peptid (z.B. im Fall
intrazellulärer Pathogene) als fremd erkannt wird.
Allerdings erfüllen nicht alle präsentierten Peptide
die strukturellen und funktionellen Anforderungen für
eine effektive Interaktion mit T-Zellen (wie von
30 Rammensee et al., 1995 und weiter unten beschrieben).

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Für den Einsatz von TAA's in einer Tumorkvakzine sind grundsätzlich mehrere Applikationsformen möglich: Das Antigen kann entweder als rekombinantes Protein mit geeigneten Adjuvantien bzw. Trägersystemen, oder als

5 für das Antigen kodierende cDNA in Plasmid- (DNA-Vakzine; Tighe et al., 1998), bzw. viralen Vektoren (Restifo, 1997) appliziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von rekombinanten

10 Bakterien (z.B. *Listeria*, *Salmonella*), die das humane Antigen rekombinant exprimieren und durch ihre zusätzlichen Komponenten eine adjuvative Wirkung haben (Paterson, 1996; Pardoll, 1998). In allen diesen Fällen ist eine Verarbeitung und Präsentation des Antigens durch sog. „professionelle antigen-präsentierende

15 Zellen“ (APC) notwendig. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz synthetischer Peptide (Melief et al., 1996), die den korrespondierenden T-Zell-Epitopen des Antigens entsprechen und die entweder von außen auf die APC geladen (Buschle et al., 1997; Schmidt et al.,

20 1997) oder von den APC aufgenommen und intrazellulär auf die MHC I Moleküle transferiert werden. Die therapeutisch effizienteste Applikationsform für ein definiertes Antigen wird im allgemeinen in klinischen Studien bestimmt.

25 Zu den von den tumorspezifischen CTLs erkannten Antigenen bzw. deren Epitopen zählen Moleküle, die aus sämtlichen Proteinklassen stammen können (z.B. Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Enzyme; zur Übersicht siehe Rammensee et al., 1995; Robbins und

30 Kawakami, 1996). Diese Proteine müssen nicht notwendigerweise an der Zelloberfläche lokalisiert sein, wie dies bei der Erkennung durch Antikörper

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- erforderlich ist. Um für die Erkennung durch CTLs als tumorspezifisches Antigen zu fungieren bzw. um für die Therapie eingesetzt zu werden, müssen die Proteine bestimmte Bedingungen erfüllen: erstens soll das
- 5 Antigen hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert werden und in sog. "kritischen" Normalgeweben nicht oder nur in geringerer Konzentration als in Tumoren vorkommen. Kritische Normalgewebe sind essentielle Gewebe; eine gegen sie gerichtete Immunreaktion könnte unter
- 10 Umständen schwerwiegende, zum Teil lethale Folgen haben. Zweitens soll das Antigen nicht nur im Primärtumor, sondern auch in den Metastasen vorhanden sein. Des Weiteren ist es im Hinblick auf eine breite klinische Anwendung des Antigens erstrebenswert, wenn
- 15 es in mehreren Tumorarten in hoher Konzentration vorhanden ist. Eine weitere Vorbedingung für die Eignung eines TAA als wirksamer Bestandteil einer Vakzine ist das Vorhandensein von T-Zell-Epitopen in der Aminosäuresequenz des Antigens; vom TAA abgeleitete
- 20 Peptide sollen zu einer *in vitro/in vivo* T-Zell Antwort führen ("immunogenes" Peptid). Ein weiteres Selektionskriterium für ein klinisch breit anwendbares immunogenes Peptid ist die Häufigkeit, mit der das Antigen in einer gegebenen Patientenpopulation
- 25 anzutreffen ist.

- Die immunogenen tumorassoziierten Antigene (TAAs), von denen größtenteils bereits gezeigt wurde, daß sie T-Zell Epitope besitzen, lassen sich in mehrere Kategorien einteilen, u.a. virale Proteine, mutierte
- 30 Proteine, überexprimierte Proteine, durch chromosomale Translokation gebildete Fusionsproteine, Differenzierungsantigene, onkofetale Antigene (Van den

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Eynde und Brichard, 1995; van den Eynde und van der Bruggen, 1997).

Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von TAAs, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Tumorstoffe darstellen, beruhen einerseits auf dem Einsatz von in Patienten bereits induzierten CTLs (zelluläre Immunantwort) oder Antikörpern (humorale Immunantwort), oder basieren auf der Erstellung differenzieller Transkriptionsprofile zwischen Tumoren und Normalgeweben. Im ersten Fall, dem immunologischen Ansatz, werden Patienten-CTLs für ein Screening eukaryotischer Tumor-cDNA-Expressionsbibliotheken, die über MHC-I Moleküle die CTL-Epitope präsentieren, eingesetzt (Boon et al., 1994), während mittels hochaffiner Patienten-Antisera prokaryotische-cDNA-Expressionsbibliotheken, direkt über eine Immunoblot-Analyse der einzelnen Plaques auf das Vorhandensein von TAAs untersucht werden (Sahin et al., 1995). Eine Kombination von CTL-Reaktivität und proteinchemischen Verfahren stellt die Isolierung von aus MHC-I isolierten Peptiden von Tumorzellen dar, die über Reaktivität mit Patienten-CTLs vorselektioniert wurden. Die Peptide werden aus dem MHC-I Komplex ausgewaschen und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert (Falk et al., 1991; Woelfel et al., 1994; Cox et al., 1994). Die Ansätze, welche CTLs zum Charakterisieren von Antigenen verwenden, sind aufgrund der erforderlichen Kultivierung und Aktivierung von CTLs mit einem erheblichen Aufwand verbunden bzw. nicht immer erfolgreich.

WO 00/66727

PCT/EP00/03852

Methoden zur Identifizierung von TAAs, welche auf dem Vergleich des Transkriptionsprofils von Normal- mit Tumorgewebe beruhen, sind vielfältig; dazu zählen die differenzielle Hybridisierung, die Erstellung von

5 Subtraktions-cDNA-Banken ("representational difference analysis"; Rubank und Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) und der Einsatz der DNA-Chip Technologie oder der SAGE-Methode (Veiculescu et al., 1995). Im Gegensatz zur oben erwähnten immunologischen Methode mit Hilfe

10 von Patienten-CTLs muß beim Einsatz von molekularbiologischen Methoden gezeigt werden, daß die damit gefundenen potentiellen Antigenkandidaten tumorspezifisch (tumorassoziiert) sind und tatsächlich T-Zell Epitope besitzen, die eine zytotoxische T-Zell

15 Antwort auslösen können. In zumindest einem Fall (NY-ESO/LAGE-1) wurde ein Antigen sowohl durch die Verwendung von Patientenserum als auch durch RDA identifiziert (Chen et al., 1997; Lethe et al. 1998), außerdem wurden CTL-Epitope dieses Antigens und eine

20 gleichzeitige spontane humorale und T-Zell Antwort in einem Patienten beschrieben (Jäger et al., 1998).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein neues tumorassoziiertes Antigen (TAA) bereitzustellen.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA

25 („representational difference analysis“) zwischen einer Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie (A549) und Normallungengewebe eine cDNA-Subtraktionsbibliothek hergestellt wurde. Zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene wurden anschließend die

30 erhaltenen cDNA-Klone sequenziert und mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen verglichen. Unter den

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

dabei annotierten Genen befanden sich 321 unbekannte, zu denen größtenteils ESTs („expressed sequence tags“)-Einträge in der Datenbank existierten. Nach einer weiteren qualitativen PCR-Analyse in cDNA-Bibliotheken von kritischen Normalgeweben und immunprivilegierten Geweben sowie detaillierteren Datenbankrecherchen wurden die Anzahl der Kandidatenklone auf 56 eingeschränkt, deren ESTs nicht aus kritischen Normalgeweben stammen. Mittels RT-PCR wurde festgestellt, daß drei der 56 untersuchten Klone eine Expression hauptsächlich in verschiedenen Tumorgeweben und keine oder geringe Expression in Normalgeweben aufweisen. Der qualitative Vergleich (mittels PCR) der Expression eines der Klone (B99) zwischen Tumor- und Normalgewebe zeigte eine Überexpression der B99-cDNA in verschiedenen Tumoren. Das mittels Northern Blot analysierte Expressionsprofil zeigte ergänzend, daß B99 in den untersuchten Normalgeweben keine oder nur eine schwache Transkription aufwies.

Die humane B99-cDNA wurde kloniert, die erhaltene Sequenz ist in SEQ ID NO:1 dargestellt. Die Sequenzanalyse der klonierten humanen B99-cDNA ergab, daß von Position 427 bis Position 1743 ein durchgehender offener Leserahmen vorliegt, der, auf Nukleotid- und Proteinebene, eine hohe Identität mit dem offenen Leserahmen von beta-1,3-Galaktosyl-o-Glykosyl-Glykoprotein beta-1,6-n-Azetylgucosaminyltransferase besitzt. Aus den aus Northern Blot Experimenten gewonnenen Daten ist zu schließen, daß das B99-Transkript eine Länge von ca. 3,0 kb hat. Der klonierte Bereich der B99-cDNA beträgt 2216 bp, wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA
in diesem Bereich spricht. Der Unterschied in der Größe
der klonierten B99-cDNA im Vergleich zu der aus der
Northern Blot Analyse ableitbaren Größe läßt sich durch
5 das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes unbekannter
Länge sowie eine zusätzliche Sequenz im 5'-nicht
translatierten Bereich von B99 erklären. Aufgrund der
Tatsache, daß im 5'-Bereich der klonierten cDNA von
Position 0 bis 427 kein durchgehender Leserahmen
10 vorhanden ist, kann gefolgert werden, daß es sich bei
dem ATG an Position 427 um das Startkodon von B99
handelt.

Zusätzliche Information über die weiter stromaufwärts
liegende Sequenz von B99 kann durch
15 molekularbiologische Standardmethoden gewonnen werden,
z.B. mittels 5'-RACE („rapid amplification of cDNA
ends“). Bei dieser Methode wird RNA, vorzugsweise mRNA,
aus Zellen oder Geweben, in denen B99 transkribiert
wird (z.B. Kolonkarzinom-Gewebe oder von
20 Lungenadenokarzinom abgeleitete Zelllinien wie A549)
revers transkribiert und anschließend mit einem Adaptor
bekannter Sequenz ligiert. Eine PCR mit einem
Adaptorprimer (bindet spezifisch an den Adaptor am 5'-
Ende der cDNA) und einem B99-spezifischen Primer (z.B.
25 SEQ ID NO:8, 10, 11) erlaubt die Amplifikation
entsprechender B99-Fragmente. Diese PCR-Produkte
können, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach
Standardmethoden kloniert und, insbesondere durch DNA
Sequenzierung, charakterisiert werden.

30 Eine alternative Methode zur Charakterisierung des
5'-Endes ist das Screenen von cDNA-Bibliotheken durch

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Hybridisierung mit für B99 spezifischen DNA-Sonden oder Antisense.

Führt das Screenen von cDNA-Bibliotheken aufgrund methodisch bedingter Beschränkungen, z.B. ineffiziente
5 reverse Transkription bedingt durch ausgeprägte
Sekundärstrukturen der RNA, nicht zum gewünschten Ziel,
können genomische Bibliotheken untersucht werden, indem
z.B., wie beim Screenen von cDNA-Bibliotheken, durch
Hybridisierung mit für B99 spezifischen DNA-Sonden
10 Klone isoliert werden können, die die stromaufwärts vom
erhaltenen 5'-Ende der cDNA liegende Sequenzinformation
z.B. die Promotorregion von B99 enthalten.

Die isolierte cDNA kodiert für das tumorassoziierte
Antigen (TAA) der Bezeichnung B99 mit der in SEQ ID
15 NO:2 angegebenen Aminosäuresequenz (B99-1). Die Sequenz
von B99-1 wird definiert durch das Startcodon an
Position 427 der isolierten B99-cDNA.

In einem weiteren Versuch zur Klonierung des
kodierenden Bereichs von B99, bei dem cDNA aus der
20 Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 verwendet wurde,
wurde eine Sequenz ermittelt, die im Vergleich zur in
SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz eine Insertion eines
Nukleotids an Position 923 aufweist (SEQ ID NO:3 bzw.
SEQ ID NO:5). Diese Insertion führt zu einer
25 Veränderung des offenen Leserahmens von B99 mit einer
daraus resultierenden veränderten Aminosäuresequenz im
C-terminalen-Bereich des B99-Proteins; die von diesem
Leserahmen abgeleitete Sequenz dieses B99-Antigens
(B99-2) ist in SEQ ID NO:4 dargestellt. Außer der
30 Insertion weist die aus A549-Zellen isolierte cDNA

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

einen Nukleotidaustausch an Position 622 im Vergleich zu Sequenz SEQ ID NO:1 auf. Dieser Nukleotidaustausch bedingt an Position Nr. 66 einen Ersatz von Arginin (SEQ ID NO:2, B99-1) durch Tryptophan (SEQ ID NO:4, B99-2). Abgesehen von diesem Aminosäureaustausch ist die Aminosäuresequenz von B99-2 bis einschließlich Position 166 identisch mit B99-1.

Die Insertion eines Nukleotids an Position 923 ergibt einen zweiten potentiellen Leserahmen von Pos. 845 bis 1744 der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz. Ein von einer cDNA mit diesem Leserahmen exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:6 dargestellte Aminosäuresequenz auf (B99-3). Die Sequenz von B99-3 ist von Pos. 1 bis 27 unterschiedlich zu B99-1 und ab Pos 28 identisch mit B99-1.

Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung B99, ausgewählt aus der Gruppe von Polypeptiden mit der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 angegebenen Aminosäuresequenz.

Die in SEQ ID NO:2 (B99-1), SEQ ID NO:4 (B99-2) und SEQ ID NO:6 (B99-3) dargestellten Aminosäuresequenzen können Abweichungen aufweisen, z.B. solche, die durch Austausch von Aminosäuren bedingt sind, sofern das B99-Derivat die für die Anwendung in einer Tumorstoffe erwünschten immunogenen Eigenschaften aufweist. (Ein Beispiel für einen B-99-Polymorphismus dieser Art ist der durch die Punktmutation bedingte Unterschied an Position 66 zwischen B99-1 und B99-2).

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Im folgenden wird, wenn nicht anders angegeben, die Bezeichnung „B99“ stellvertretend für B99-1, B99-2 und B99-3 verwendet.

Die natürliche Aminosäuresequenz von B99 (bzw. 5 entsprechend die Sequenzen der B99-cDNA) kann gegebenenfalls modifiziert sein, indem einzelne Aminosäuren in einem B99 CTL-Epitop ausgetauscht werden, um, im Vergleich zum natürlichen B99 CTL-Epitop, eine Steigerung der Affinität von B99-Peptiden 10 zu MHC-I-Molekülen und damit eine erhöhte Immunogenität und letztlich eine verstärkte Reaktivität gegenüber Tumoren zu bewirken. Modifikationen im Bereich der B99-Epitope können am B99-Gesamtprotein (dieses wird von den APCs zu den entsprechenden Peptiden prozessiert) 15 bzw. an größeren B99-Proteinfragmenten oder an B99-Peptiden (vgl. unten) vorgenommen werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung immunogene Fragmente und Peptide, die von B99 abgeleitet sind. Letztere werden im folgenden als 20 "B99-Peptide" bezeichnet. Eine erste Gruppe sind B99-Peptide, die eine humorale Immunantwort (Induktion von Antikörpern) auslösen. Derartige Peptide sind ausgewählte Abschnitte von B99 (mindestens 12 bis 15 Aminosäuren), die mittels sogenannter Vorhersage- 25 Algorithmen ("prediction algorithms") wie z.B. dem "surface probability blot" (Emini et al., 1985), dem "hydrophobicity blot" (Kyte and Doolittle, 1982) und dem "antigenic index" (Jameson and Wolf, 1988) ermittelt werden können.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- Es ist bekannt, daß tumorassoziierte Antigene tumorspezifische Mutationen aufweisen können, die zu einer immunologischen Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe beitragen (Mandrizzato et al., 1997; Hogan et al., 1998; Gaudi et al., 1999; Wölfel et al., 1995).
- Um das Vorhandensein tumorspezifischer B99-Mutationen festzustellen, wird, zweckmäßig mit Hilfe von Sonden aus der erfindungsgemäßen isolierten cDNA, die B99-cDNA aus einem oder mehreren unterschiedlichen Tumoren kloniert und die erhaltenen Sequenzen mit Normalgewebs-B99-cDNA verglichen. Es ist zu erwarten, daß Tumor-B99-Peptide aus einem gegenüber Normalgewebs-B99 mutierten Sequenzabschnitt im Vergleich zu Normalgewebs-B99-Peptiden aus dem entsprechenden Abschnitt eine verstärkte Immunogenität aufweisen. Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt B99-Peptide, abgeleitet von Bereichen eines tumorexprimierten B99, die tumorspezifische Mutationen aufweisen.
- Bei der Auswahl von B99-Peptidkandidaten verdienen die Regionen von B99-2 und B99-3, die sich von B99-1 unterscheiden, besonderes Interesse. Unter der Voraussetzung, daß es sich bei der Insertion der B99-DNA, die zu diesen Unterschieden in der Aminosäuresequenz führt, um eine tumorspezifische Mutation handelt, ist nämlich zu erwarten, daß Peptide aus diesem Bereich eine verstärkte Immunogenität im Vergleich zu Peptiden aus B99-1 aufweisen. Um zu bestätigen, daß die Insertion tumorspezifisch ist, können Antikörper gegen diesen Bereich generiert und Tumorzellen auf Expression von B99-2 und B99-3 untersucht werden.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

B99-Peptide werden direkt oder in modifizierter Form (z.B. an KLH = "keyhole limpet hemocyanine" gekoppelt) verabreicht und die Bildung von Antikörpern mittels gängiger immunologischer Assays, z.B. mittels ELISA, 5 bestimmt.

Weitere, im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugte, B99-Peptide sind diejenigen, die durch MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort bewirken. Es gibt zwei Klassen von 10 MHC-Molekülen, nämlich MHC-I-Moleküle, die von CD8-positiven CTLs und MHC-II-Moleküle, die von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt werden.

Damit ein Peptid eine zelluläre Immunantwort auslöst, muß es an ein MHC-Molekül binden, wobei der zu 15 behandelnde Patient das MHC-Molekül in seinem Repertoire aufweisen muß. Die Bestimmung des MHC-Subtyps des Patienten stellt somit, im Hinblick auf die Auslösung einer zellulären Immunantwort, eine der wesentlichen Voraussetzungen für die wirksame Anwendung eines 20 Peptids an diesem Patienten dar.

Die Sequenz eines therapeutisch einzusetzenden B99-Peptids wird durch das jeweilige MHC-Molekül hinsichtlich Ankeramino-säuren und Länge vorgegeben. Definierte Ankerpositionen und Länge gewährleisten, daß 25 ein Peptid in die Peptid-Bindungsfurche des jeweiligen MHC-Moleküls des Patienten paßt. Dies hat zur Folge, daß das Immunsystem stimuliert wird und eine zelluläre Immunreaktion erzeugt wird, die sich, im Falle der Verwendung eines von einem Tumorantigen abgeleiteten 30 Peptids, gegen die Tumorzellen des Patienten richtet.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Immunogene B99-Peptide können nach bekannten Methoden identifiziert werden, eine der Grundlagen dafür ist die Beziehung zwischen MHC-Bindung und CTL-Induktion.

Da also die Sequenz immunogener Peptide aufgrund ihres
5 Peptidbindungsmotivs vorherbestimmbar ist, können
B99-Peptide, die CTL-Epitope darstellen, aufgrund der
B99-Proteinsequenz identifiziert und synthetisiert
werden. Dazu sind verschiedene Methoden geeignet, die
zur Identifizierung von CTL-Epitopen von bekannten
10 Protein-Antigenen verwendet wurden; z.B. die von Stauss
et al., 1992, für die Identifizierung von T-Zell-
Epitopen in humanem Papillomavirus beschriebene
Methode.

Die allelspezifischen Anforderungen jedes MHC-I Allel-
15 Produkts an ein Peptid, das an das MHC-Molekül bindet
und von diesem präsentiert wird, wurden als Motiv
zusammengefaßt (z.B. Falk et al., 1991). Bisher ist
eine große Anzahl sowohl von MHC-Peptid-Motiven als
auch von MHC-Liganden bekannt. Eine im Rahmen der
20 vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Suche nach
Epitopen eines bekannten Proteins, das in ein
bestimmtes MHC-I-Molekül paßt, wurde in einem
Übersichtsartikel von Rammensee et al., 1995,
beschrieben. Sie umfaßt die folgenden Schritte:
25 zunächst wird die Protein-Sequenz auf Abschnitte
untersucht, die dem Anker-Motiv entsprechen, wobei
gewisse Variationen hinsichtlich Peptidlänge und
Ankerbesetzung möglich sind. Wenn z.B. ein Motiv ein
9-mer mit Ile oder Leu am Ende vorschreibt, können auch
30 10-mer mit einem entsprechenden C-Terminus in Betracht
gezogen werden, ebenso Peptide mit anderen

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

aliphatischen Resten, wie Val oder Met am C-Terminus. Auf diese Weise wird eine Reihe von Peptid-Kandidaten erhalten. Diese werden auf das Vorhandensein möglichst vieler Ankerreste, die sie gemeinsam mit bereits

5 bekannten Liganden haben, untersucht und/oder daraufhin, ob sie für verschiedene MHC-Moleküle "bevorzugte" Reste haben (entsprechend der Tabelle von Rammensee et al., 1995). Um schwach bindende Peptide auszuschließen, werden zweckmäßig Bindungs-Assays

10 durchgeführt. Wenn die Anforderungen an die Peptid-Bindung für bestimmte MHC-Moleküle bekannt sind, können die Peptid-Kandidaten auch auf Nicht-Ankerreste untersucht werden, die sich negativ oder positiv auf die Bindung auswirken, oder die diese erst ermöglichen

15 (Ruppert et al., 1993). Bei dieser Vorgangswise ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß das Peptid-Bindungs-Motiv für die Suche nach natürlichen Liganden nicht allein ausschlaggebend ist; auch andere Aspekte, z.B. die Enzymspezifität während der Antigenprozessierung,

20 tragen - zusätzlich zur Spezifität der MHC-Bindung - zur Identität des Liganden bei. Eine Methode, die diese Aspekte berücksichtigt, und die im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Identifizierung von immunogenen B99-Peptiden geeignet ist, wurde u.a. von

25 Kawakami et al., 1995, angewendet, um auf der Grundlage bekannter HLA-A*0201 Motive gp100 Epitope zu identifizieren.

Die Peptide können auch im Hinblick auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-II-Moleküle ausgewählt werden.

30 Das MHC-II-Bindungsmotiv, das sich über neun Aminosäuren erstreckt, weist einen höheren Grad an Degeneration in den Ankerpositionen auf als das MHC-I-

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Bindungsmotiv. Es wurden kürzlich, ausgehend von der Röntgenstrukturanalyse von MHC-II-Molekülen, Methoden entwickelt, die die genaue Analyse der MHC-II-Bindungsmotive, und ausgehend davon, Variationen der Peptidsequenz erlauben (Rammensee et al., 1995, und die dort zitierte Originalliteratur). Peptide, die an MHC-II-Moleküle binden, werden den CD4-T-Zellen typischerweise von dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen präsentiert. Die CD4-T-Zellen wiederum aktivieren dann in der Folge direkt CTLs durch z.B. Cytokin-Ausschüttung und verstärken die Effizienz der Antigen-Präsentation durch APC (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen).

Seit kurzem sind Datenbanken und Vorhersage-Algorithmen verfügbar, die mit großer Verlässlichkeit die Vorhersage von Peptid-Epitopen erlauben, die an ein bestimmtes MHC-Molekül binden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden, unter Verwendung des von Parker et al., 1994 und Rammensee et al., 1995 beschriebenen Algorithmus, für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1, -A2, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tabelle 2 aufgelistet. Auf ähnliche Weise können, gegebenenfalls unter Verwendung weiterer Algorithmen, die den unterschiedlichen Charakteristika der Peptide (Hydrophobizität, Ladung, Größe) bzw. Anforderungen an die Peptide, z.B. die 3D-Struktur des HLA-Moleküls, Rechnung tragen, weitere potentielle

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Peptid-Epitope ermittelt werden; dies gilt auch für Peptid-Epitope anderer HLA-Typen.

- Nach Auswahl von B99-Peptid-Kandidaten mit Hilfe der angeführten Methoden wird deren MHC-Bindung mittels
- 5 Peptidbindungs-Assays getestet. Als nächstes wird die Immunogenität der Peptide mit guten Bindungseigenschaften bestimmt (Stabilität der Peptid-MHC-Wchselwirkung korreliert in den meisten Fällen mit Immunogenität; van der Burg et al., 1996). Um die
- 10 Immunogenität des ausgewählten Peptids oder Peptid-Äquivalents zu bestimmen, können Methoden, wie z.B. von Sette et al., 1994, beschrieben, in Kombination mit quantitativen MHC-Bindungs-Assays verwendet werden. Alternativ kann die Immunogenität des ausgewählten
- 15 Peptids über *in vitro* CTL-Induktion mittels bekannter Methoden (wie weiter unten für *ex vivo* CTL-Induktion beschrieben) getestet werden. Das Prinzip der in mehreren Schritten durchgeführten Methode für die Auswahl von Peptiden, die zur Auslösung einer
- 20 zellulären Immunantwort fähig sind, ist in der WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, beschrieben. Eine allgemeine Strategie zum Erhalt effizienter immunogener Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wurde außerdem von Schweighoffer, 1997, beschrieben.

- Statt die Originalpeptide zu verwenden, die in die Bindungsfurche von MHC-I -oder MHC-II-Molekülen passen, also Peptide, die unverändert von B99 abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der
- 30 Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge Variationen

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- vorgenommen werden, sofern durch diese Variationen die effektive Immunogenität des Peptids, die sich zusammensetzt aus seiner Bindungsaffinität an das MHC-Molekül und seiner Fähigkeit, T-Zell-Rezeptoren zu
- 5 stimulieren, nicht nur nicht beeinträchtigt ist, sondern vorzugsweise verstärkt wird. In diesem Fall werden also künstliche Peptide oder Peptid-Äquivalente verwendet, die entsprechend den Anforderungen der Bindungsfähigkeit an ein MHC-Molekül entworfen sind.
- 10 Solchermaßen veränderte Peptide werden als „heteroclitische Peptide“ bezeichnet. Sie können nach folgenden Methoden erhalten werden:
- Zunächst werden die Epitope von MHC-I- bzw. MHC-II-Liganden bzw. deren Variation z.B. nach dem von
- 15 Rammensee et al., 1995, beschriebenen Prinzip vorgenommen. Die Länge des Peptids entspricht in Falle seiner Abstimmung auf MHC-I Moleküle vorzugsweise einer Minimalsequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeramino-säuren.
- 20 Gegebenenfalls kann das Peptid auch am C- und/oder an N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung die Bindungsfähigkeit an das MHC-Molekül nicht beeinträchtigt bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalsequenz zellulär prozessiert werden kann.
- 25 Die modifizierten Peptide werden daraufhin auf ihre Erkennung durch TILs („tumor-infiltrating lymphocytes“), auf CTL-Induktion sowie auf verstärkte MHC-Bindung und Immunogenität geprüft, wie von Parkhurst et al., 1996, und Becker et al., 1997,
- 30 beschrieben.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Eine weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Auffindung von Peptiden mit stärkerer Immunogenität als die der natürlichen B99-Peptide besteht im Screenen von Peptid-Bibliotheken mit CTLs, die die natürlich auf Tumoren vorkommenden B99-Peptide erkennen, wie von Blake et al., 1996, beschrieben; in diesem Zusammenhang wird die Verwendung kombinatorischer Peptid-Bibliotheken vorgeschlagen, um Moleküle zu entwerfen, welche von MHC-I-restringierten CTLs erkannte Tumorepitope nachahmen.

Die B99-Polypeptide der vorliegenden Erfindung oder davon abgeleitete immunogene Fragmente oder Peptide können rekombinant oder mittels Peptid-Synthese hergestellt werden, wie in der WO 96/10413 beschrieben, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Für die rekombinante Herstellung wird das entsprechende DNA-Molekül nach Standardmethoden in einen Expressionsvektor eingefügt, in eine geeignete Wirtszelle transfiziert, der Wirt unter geeigneten Expressionsbedingungen kultiviert und das Protein gereinigt. Für die chemische Synthese von B99-Peptiden können herkömmliche Methoden verwendet werden, z.B. im Handel erhältliche automatische Peptid-Synthesizer.

Alternativ zu natürlichen B99-Peptiden oder heteroclitischen Peptiden können Substanzen, die solche Peptide vortäuschen, z.B. "Peptidomimetica" oder "retro-inverse-Peptide", verwendet werden. Zur Testung dieser Moleküle im Hinblick auf die therapeutische Verwendbarkeit in einer Tumorstoffimpfung werden dieselben Methoden angewendet wie oben für die natürlichen B99-Peptide oder B99-Peptidäquivalente.

WO 00/66727

PCT/EP00/03551

Das TAA der Bezeichnung B99 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z.B. um
5 eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von B99-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Nierenzell-, Lungen-, Kolon-, Pankreas-, Brust- und
10 Magenkarzinom.

Die Immunantwort in Form einer Induktion von CTLs kann *in vivo* oder *ex vivo* bewirkt werden.

Für die *in vivo* Induktion von CTLs wird eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als wirksame
15 Komponente das TAA B99 bzw. davon abgeleitete Fragmente oder Peptid(e), einem Patienten verabreicht, der an einer mit dem TAA assoziierten Tumorerkrankung leidet, wobei die Menge an TAA(Peptid) ausreichen muß, um eine wirksame CTL-Antwort auf den Antigen-tragenden Tumor zu
20 erzielen.

Die Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung. Vorzugsweise dient die Zusammensetzung der parenteralen
25 Verabreichung, z.B. für die subkutane, intradermale oder intramuskuläre Anwendung. Die B99-TAAs/Peptide sind in einem pharmazeutisch annehmbaren, vorzugsweise wässrigen, Träger gelöst oder suspendiert. Die Zusammensetzung kann außerdem übliche Hilfsstoffe, wie
30 Puffer, etc. enthalten. Die TAAs/Peptide können allein

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

oder in Kombination mit Adjuvantien, z.B. inkomplettem Freund's Adjuvans, Saponinen, Aluminiumsalzen oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, Polykationen wie Polyarginin oder Polylysin, verwendet werden. Die

5 Peptide können auch an Komponenten, die die CTL-Induktion oder CTL-Aktivierung unterstützen, gebunden werden, z.B. an T-Helferpeptide, Lipide oder Liposomen, oder sie werden gemeinsam mit diesen Substanzen und/oder gemeinsam mit immunstimulierenden

10 Substanzen, z.B. Zytokinen (IL-2, IFN- γ) verabreicht. Methoden und Formulierungen, die zur Herstellung und Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet sind, sind in der WO 95/04542 und WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit Bezug

15 genommen wird, beschrieben.

B99(Fragmente) bzw. B99-Peptide können auch verwendet werden, um eine CTL-Antwort *ex vivo* auszulösen. Eine *ex vivo* CTL-Antwort auf einen Tumor, der B99 exprimiert, wird induziert, indem man die CTL-Vorläuferzellen

20 zusammen mit APCs und B99-Peptiden bzw B99-Protein inkubiert. Dann läßt man die aktivierten CTLs expandieren, worauf sie dem Patienten wieder verabreicht werden. Alternativ können APCs mit B99-Peptiden beladen werden, was zu einer effizienten Aktivierung zellulärer

25 Immunreaktionen gegen B99 positive Tumoren führen kann (Mayordomo et al., 1995; Zitvogel et al., 1996). Eine geeignete Methode um Peptide auf Zellen, z.B. dendritische Zellen, zu laden, wird in der WO 97/19169 geoffenbart.

30 In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination mehrerer verschiedener B99-Peptide oder

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- B99-Peptidaquivalente angewendet. In einer weiteren Ausführungsform werden B99-Peptide mit von anderen TAAs abgeleiteten Peptiden kombiniert. Die Auswahl von Peptiden für derartige Kombinationen wird im Hinblick
- 5 auf die Erfassung unterschiedlicher MHC-Typen getroffen, um eine möglichst breite Patientengruppe abzudecken, und/oder sie wird auf ein möglichst breites Indikationsspektrum abgestellt, indem Peptide mehrerer unterschiedlicher Tumorantigene kombiniert werden. Die
- 10 Anzahl der Peptide in einer pharmazeutischen Zusammensetzung kann über einen weiten Bereich schwanken, typischerweise enthält eine klinisch anwendbare Vakzine 1 bis 15, vorzugsweise 3 bis 10 verschiedene Peptide.
- 15 Die erfindungsgemäßen Peptide können auch als diagnostische Reagentien eingesetzt werden. Beispielsweise können die Peptide dazu benutzt werden, um das Ansprechen eines Patienten auf die durch das immunogene Peptid hervorgerufene humorale oder zelluläre
- 20 Immunantwort zu testen. Dadurch besteht die Möglichkeit, ein Behandlungsprotokoll zu verbessern. Beispielsweise kann in Abhängigkeit der Darreichungsform (Peptid, Gesamtprotein oder DNA-Vakzine) des TAA die Zunahme von Vorläufer T-Zellen in den PBLs, die eine Reaktivität
- 25 gegen das definierte Peptidepitop aufweisen, untersucht werden (Robbins und Kawakami, 1996 sowie darin zitierte Referenzen). Außerdem können die Peptide oder das Gesamtprotein bzw. gegen das TAA gerichtete Antikörper dazu verwendet werden, um den Krankheitsverlauf eines
- 30 B99-positiven Tumors zu charakterisieren (z.B. durch immunhistochemische Analysen von Primärtumor und Metastasen). Eine derartige Strategie hat sich schon

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- mehrfach als erfolgreich erwiesen, z.B. der Nachweis des Östrogenrezeptors als Entscheidungsgrundlage zur Endokrintherapie bei Brustkrebs; c-erbB-2 als relevanter Marker bei Prognostik und Therapieverlauf bei Brustkrebs
- 5 (Ravaioli et al., 1998; Revillion et al., 1998); PSMA ("prostate specific membrane antigen") als Marker für Epithelialzellen des Prostatakarzinoms im Serum bzw. durch Einsatz eines ¹¹¹In-markierten monoklonalen Antikörpers gegen PSMA bei der Immunoscintigraphie auf
- 10 Prostatakarzinom (Murphy et al., 1998 und inkludierte Referenzen); CEA ("carcinoembryonic antigen") als serologischer Marker für die Prognose und Verlauf bei Patienten des kolorektalen Karzinoms (Jessup und Loda, 1998).
- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt isolierte DNA-Moleküle, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften von 399 oder für Fragmente davon.

- In einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein
- 20 isoliertes DNA-Molekül, das ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz enthält oder das ein Polynukleotid enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

- 25 Unter „stringenten Bedingungen“ wird z.B. verstanden: Inkubation über Nacht bei 65°C - 68°C mit 6xSSC (1x SSC = 150 mM NaCl, 15mM Tri-Natriumcitrat), 5xDenhardt's Lösung, 0.2%SDS, 50 µg/ml Lachsspermin-DNA, daran anschließend Waschen zweimal 30 min mit
- 30 2xSSC, 0.1% SDS bei 65°C, einmal 30 min mit 0.2xSSC,

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

0.1% SDS bei 65°C und gegebenenfalls abschließendes Spülen mit 0.1xSSC, 0.1%SDS bei 65°C, oder äquivalente Bedingungen.

- In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende
- 5 Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, das ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz enthält oder das ein Polynukleotid enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz
- 10 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

- Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle bzw. Fragmente davon kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung B99 (B99-1, B99-2 oder B99-3) mit der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz bzw.
- 15 für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind DNA Moleküle mitumfaßt, die durch die Degeneration des genetischen Codes Abweichungen von der in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 bzw. SEQ ID NO:5 dargestellten Sequenz aufweisen.

- 20 Die Erfindung betrifft auch DNA-Moleküle, die durch konservativen Austausch von Aminosäuren bedingte Abweichungen von der in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz aufweisen, sofern sie für ein B99-Derivat bzw. Fragmente oder
- 25 Peptide mit den für die Anwendung als Tumorstoffe erwünschten immunogenen Eigenschaften kodieren.

Im folgenden werden die oben definierten, gegebenenfalls modifizierten, für B99-1, B99-2 bzw. B99-3 bzw. für Fragmente davon kodierenden DNA-

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Moleküle, wenn nicht anderes angegeben, als „B99-DNA-Moleküle“ bezeichnet.

Die B99-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung oder die entsprechenden RNAs, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, werden, wie die davon kodierte(n) (Poly)Peptide, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen eingesetzt.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden DNA-Moleküle, kodierend für natürliche B99-Polypeptide verwendet. Alternativ zur natürlichen B99-cDNA bzw. Fragmenten davon können modifizierte Derivate verwendet werden. Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen, die für ein Protein(fragment) bzw. Peptide mit stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen gelten wie für die oben beschriebenen Peptide. Eine weitere Art der Modifikation ist die Aneinanderreihung zahlreicher Sequenzen, kodierend für immunologisch relevante Peptide, nach Art einer Perlschnur ("string-of-beads"; Toes et al., 1997). Die Sequenzen können auch durch Anfügung von Hilfselementen modifiziert werden, z.B. Funktionen, die eine effizientere Abgabe und Prozessierung des Immunogens gewährleisten (Wu et al., 1995). Beispielsweise kann durch Anfügen einer Lokalisierungssequenz in das endoplasmatische Retikulum ("ER targeting sequence") die Prozessierung und damit die Präsentation und letztlich die Immunogenität des Antigen erhöht werden.

WO 00/66727

PCT/EP00/03452

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein rekombinantes DNA-Molekül, das B99-DNA enthält.

Die B99-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung können, vorzugsweise in rekombinanter Form als Plasmide, direkt oder als Bestandteil eines rekombinanten Virus, oder Bakteriums verabreicht werden. Prinzipiell kann jede gentherapeutische Methode für die Immuntherapie von Krebs auf Basis von DNA ("DNA-Vakzine") auf B99-DNA angewendet werden, und zwar sowohl *in vivo* als auch *ex vivo*.

Beispiele für die *in vivo* Verabreichung sind die direkte Injektion von "nackter" DNA, entweder intramuskulär oder mittels Gen-Pistole ("gene gun") von der sich gezeigt hat, daß sie zur Bildung von CTLs gegen Tumorantigene führt. Beispiele für rekombinante Organismen sind Vaccinia Virus, Adenovirus oder *Listeria monocytogenes* (eine Übersicht wurde von Coulie, 1997, gegeben). Desweiteren können synthetische Träger für Nukleinsäuren, wie kationische Lipide, Mikrosphären, Mikrokügelchen oder Liposomen für die *in vivo* Verabreichung von Nukleinsäure-Molekülen, kodierend für B99-Peptid verwendet werden. Ähnlich wie für Peptide können verschiedene Hilfsstoffe, die die Immunantwort verstärken, mitverabreicht werden, z.B. Zytokine, entweder in Form von Proteinen oder dafür kodierenden Plasmiden. Die Applikation kann gegebenenfalls mit physikalischen Methoden, z.B. Elektroporation, kombiniert werden.

WO 00/66717

PCT/EP00/03552

Ein Beispiel für die ex vivo Verabreichung ist die Transfektion dendritischer Zellen, wie von Tuting, 1997, beschrieben, oder anderer APCs, die als zelluläre Krebsvakzine zur Anwendung kommen.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt die Verwendung von Zellen, die B99 exprimieren, entweder von sich aus oder, in gegebenenfalls modifizierter Form, nach Transfektion mit der entsprechend kodierenden Sequenz, für die
- 10 Herstellung einer Krebsvakzine.

- Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Antikörper gegen B99 bzw. Fragmente davon. Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren, insbesondere Kaninchen,
- 15 mittels Injektion des Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

- Monoklonale anti-B99-Antikörper können nach Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein,
- 20 1975, beschriebenen Prinzip gewonnen werden, indem Tiere, insbesondere Mäuse, immunisiert, anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere immortalisiert werden, z.B. durch Fusion mit Myelomzellen, und der Überstand der erhaltenen
- 25 Hybridome mittels immunologischer Standard-Assays auf monoklonale anti-B99-Antikörper gescreent wird. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf herkömmliche Weise chimisiert (Neuberger et al.,

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

1984, Boulianne et al., 1984) oder humanisiert (Riechmann et al., 1988, Graziano et al., 1995) werden.

Humane monoklonale anti-B99-Antikörper (fragmente) können auch von sog. „Phage Display Libraries“ (Winter et al., 1994, Griffiths et al., 1994, Krufik et al., 1995, Mc Guinness et al., 1996) und mittels transgener Tiere (Brüggemann et al., 1996, Jakobovits et al., 1995) gewonnen werden.

Die erfindungsgemäßen anti-B99-Antikörper können in immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von B99-spezifischen Antikörpern, um beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu bringen, der B99 exprimiert. Beispiele für solche Substanzen sind zytotoxische Agentien oder radioaktive Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor vorort zu schädigen. Aufgrund der tumorspezifischen Expression von B99 sind dabei keine oder nur geringe Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt können mit Hilfe von B99-Antikörpern Substanzen zur Sichtbarmachung von Tumoren, die B99 exprimieren, herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen. Therapeutische und diagnostische Anwendungen von Antikörpern, die für anti-B99-Antikörper in Frage kommen, sind in der WO 95/33771 für beschrieben.

Das TAA der Bezeichnung B99 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von B99-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Nierenzell-, Lungen-, Kolon-, Pankreas-, Brust- und Magenkarzinom.

Auf Grund der bevorzugten Expression von B99 in Tumorzellen kann angenommen werden, daß dieses Protein eine wichtige Funktion für den Tumor hat, z.B. für Entstehung, Infiltration und Wachstum. B99(DNA) kann daher in Screening-Assays verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die die Aktivität dieses Proteins modulieren, insbesondere inhibieren. In einer Ausführungsform kann ein derartiger Assay darin bestehen, das B99 Protein, oder ein aktives Fragment davon, in Zellen, die auf die Aktivität von B99 mit Proliferation reagieren, einzubringen bzw. die entsprechende B99 DNA in der Zelle zur Expression zu bringen, und die Proliferation der Zellen in Gegenwart und in Abwesenheit einer Testsubstanz zu bestimmen. Substanzen mit proliferationshemmender Wirkung können zur Behandlung von Tumoren mit starker B99-Expression verwendet werden, insbesondere beim Nierenzell-, Lungen-, Kolon- und Mammakarzinom sowie beim Hodgkin-Lymphom.

WO 80/66727

PCT/EP00/03552

Figurenübersicht

- Fig. 1: RT-PCR Analyse von cDNA-Pools verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern
- 5 Fig. 2: RT-PCR Analyse von individuellen cDNAs verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern
- Fig. 3: Transkription von B99 in Normalgeweben: Northern Blot Analyse von mRNA aus 16 Normalgeweben
- 10 Fig. 4: Immunhistochemische Analyse von vier verschiedenen Fällen von Adenokarzinomen mit B99-Serum
- Fig. 5: MHC Stabilisierung auf T2-Zellen mittels verschiedenen Konzentrationen von B99-Peptiden

15

Beispiel 1

- RDA („Representational Difference Analysis“) von der humanen Adenokarzinomzelllinie der Lunge (A549) und normalem Lungengewebe
- 20 Die von ATCC bezogene humane Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 (CCL 185) wurde in T150 Zellkulturflaschen hochgezüchtet. Als Nährmedium diente MEM mit 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin. Alle 3 bis 4 Tage wurden die
- 25 Zellen durch Trypsinisieren 1:5 bis 1:10 zur Propagation gespalten. Nach Erreichen von etwa

WG 00/66727

PCT/EP00/03552

- 80% Konfluenz wurden pro T150 Zellkulturflasche 4 ml einer Trypsinlösung (Angaben pro Liter: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,13g Na₂HPO₄-wasserfrei, 0,2g KH₂PO₄, 100ml 2,5% Trypsinlösung, 1g EDTA-Na-Salz; pH7,2-7,4)
- 5 zum Ernten der Zellen eingesetzt. Die 4 ml wurden in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert, mit 8 ml PBS versetzt, bei 1200 rpm in einer Haereus Tischzentrifuge (Megafuge 2.0R) 5 min bei 4°C zentrifugiert, das Zellpellet mit 1 ml Lysis-Puffer (10mM TrisHCl pH8, 140mM NaCl, 1,3 mM MgCl₂, 0,5% NP40) versetzt, kräftig geschüttelt und in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 12 000 rpm und 4°C 5 min in einer Sigma Tischzentrifuge (Sigma 202 MK) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und nach Zusatz
- 15 von 55 µl 20% SDS-Lösung zweimal mit dem doppelten Volumen an einer CHCl₃/Phenol (1:1 v/v) Mischung und einmal mit dem einfachen Volumen an CHCl₃ extrahiert. Die wässrige RNA-enhaltende Phase wurde mit 1/10 Volumen an 3M NaAc (pH5) und dem zweifachen
- 20 Volumen an 96% EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C die RNA präzipitiert. Ausgehend von 1 mg total-RNA wurde für die Isolierung von poly-A(+)RNA mittels des PolyAtract Kit (Promega) entsprechend dem Hersteller-Protokoll vorgegangen. Die Lagerung der A549 poly-
- 25 A(+)RNA mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DEPC-behandeltem H₂O erfolgte in Aliquots bei -80°C.

- Zur Durchführung der repräsentativen Differenzanalyse (RDA; Hubank and Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) wurde die poly-A(+)RNA der Lungenadenokarzinom-Zelllinie
- 30 A549 als „tester“, die von normalem Lungengewebe (1 mg/ml; Clontech, Palo Alto; #6524-1) als „driver“ eingesetzt. Die RDA wurde unter Verwendung des PCR-

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

select™ kit (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt mit der Ausnahme, daß ein modifiziertes Primer/Adaptor-2-Oligonukleotidsystem mit folgender Sequenz zum Einsatz kam:

5 5'-TGTTAGCGTGAGACGACAGAAAGCGCGTGGTACCGAGCTCGAG-3'
 (Adaptor-2-alt-1; SEQ ID NO:19),
 5'-AGGGCGTGGTACCGAGCTCGAG-3' (nested-PCR-primer-2-alt;
 SEQ ID NO:20) und 5'-GGCTCGAGCTC-3' (Adaptor-2-alt-2;
 SEQ ID NO:21). Die neu generierten Primer/Adaptor-

10 Sequenzen ermöglichen durch die Anwesenheit von drei neuen Restriktionsenzymstellen (Kpn I, Sac I und Xho I) in der Sequenz des nested-PCR-primer-2-alt nach Klonierung der subtrahierten cDNA-Fragmente in den pPCR11-Vektor ein nachträgliches Herausschneiden der

15 jeweiligen cDNA-Fragmente. Das Designen einer Primer/Adaptorsequenz mit mehreren verfügbaren Restriktionsenzymstellen war deshalb notwendig, weil besonders in den Primersequenzen - bedingt durch die PCR-Amplifikationsschritte - oft Punktmutationen zu

20 beobachten waren.

Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA mittels oligo-dT wurde die erhaltene cDNA von „tester“ und „driver“ mit *RsaI* verdaut (*RsaI* ist ein 4-Basen erkennendes Restriktionsenzym und liefert im

25 statistischen Mittel 256 bp lange cDNA-Fragmente). Gleiche Teile von „tester-cDNA“ wurden entweder mit den Adaptoren 1 oder 2 ligiert und anschließend getrennt mit einem Überschuß an „driver-cDNA“ bei 65°C hybridisiert. Danach wurden die beiden Ansätze vereinigt

30 und einer zweiten Hybridisierung mit frischer denaturierter „driver-cDNA“ unterworfen. Die angereicherten „tester“-spezifischen cDNAs wurden

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

anschließend durch PCR mit für die Adaptoren 1 bzw. 2
spezifischen Primern exponentiell amplifiziert. Für
eine weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser
Reaktion einer zweiten PCR mit spezifischen nach innen
5 versetzten („nested“) Primern unterworfen. Die aus
dieser Reaktion resultierenden, exponentiell
amplifizierten cDNA-Fragmente wurden direkt in den
pCRIT-Vektor (Invitrogen; „TA-cloning vector“) ligiert
und anschließend ein Drittel des Ligationsansatzes in
10 kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transfiziert.

712 positive Transformanten (Blau-Weiß-Selektion)
wurden erhalten und in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium
(1,3 ml pro Napf) für 48 h bei 37°C kultiviert. Pro Napf
15 wurden 750 µl der *E. coli* Suspensionen für die
Präparation der Plasmid-DNA eingesetzt (96-Napf-
Minipräparationsmethode von QIAGEN nach Vorschrift des
Herstellers). Die verbleibenden Bakterienkulturen
wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

20 Es wurde eine aus 712 Einzelklonen bestehende cDNA-
Subtraktionsbibliothek erhalten, die sowohl in Form von
E. coli Glycerin-Stammkulturen als auch in Form
gereinigter Plasmide vorlag.

25 Beispiel 2

DNA-Sequenzierung und Annotation von TRA-Kandidaten

Die isolierte Plasmid-DNA sämtlicher 712 Klone (siehe
Beispiel 1) wurde nach der Sanger-Methode auf einem
ABI-Prism Gerät sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

wurden mittels der BioScout-Software (LION, Heidelberg) annotiert und Datenbankvergleichen (Genbank) unterzogen. Von 712 Klonen konnten 678 sequenziert und annotiert werden. Der Rest (34) wies als Insert

5 entweder nur poly(A) Sequenzen auf oder entsprach einem religierten Vektor oder war nicht sequenzierbar. Von den 678 annotierbaren Sequenzen erwiesen sich 357 als Gene mit bekannter Funktion. Die restlichen 321 repräsentierten Klone, kodierend für Gene mit

10 unbekannter Funktion; 59 davon wiesen nicht einmal Einträge in der humanen EST-Datenbank auf. Bekannte Gene wurden nicht weiter behandelt. Für jene unbekanntes Gene, für die ein EST-Eintrag verfügbar war, wurde eine Abschätzung des Expressionsprofils

15 vorgenommen; dabei wurden all jene ESTs mit > 95% Identität (BLAST), die zur entsprechend experimentell ermittelten Sequenz der Subtraktionsbibliotheken gehörten, überprüft. Bei der Annotation wurde eine Unterteilung in i) kritische Normalgewebe, ii) foetale,

20 „verzichtbare“ und immunprivilegierte Gewebe und iii) Tumore und Tumor-Zelllinien vorgenommen. Auf der Basis dieses „virtuellen mRNA-Profiles“ wurden 200 Klone, für die keine ESTs in der Gruppe i) gefunden wurden, für weitere experimentelle Analysen ausgewählt

25 (inklusive der 59 Klone, für die keine EST-Eintragung vorlag). Zur weiteren Einengung der Kandidatenklone wurden aus den von den 200 ausgewählten Klonen ermittelten Sequenzen Oligonukleotidprimerpaare entworfen und synthetisiert. Es wurden zunächst

30 8 verschiedene, von humanem Gewebe abgeleitete cDNA-Bibliotheken (GibcoBRL „SUPERSCRIPT™“), welche direktional in pCMV-SPORT kloniert sind, mittels

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- qualitativer PCR auf das Vorhandensein der jeweiligen Kandidaten getestet. Die dabei eingesetzten cDNA-Bibliotheken stammten aus Gewebe von Herz (#10419-018), Leber (#10422-012), Leukozyten (#10421-022), Niere (#10420-016), Lunge (#10424-018), Testis (#10426-013), Gehirn (#10418-010) und fötalem Gehirn (#10662-013).
- Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 20 µl Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz enthielten 1x TaqPol-Puffer (50mM KCl, 10 mM TrisHCl pH9, 0,1% Triton X-100),
- 10 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Promega), 0,025 U/µl Taq-DNA-Polymerase (Promega), jeweils 5 pM an spezifischen Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:8 und 100 ng der jeweils zu untersuchenden Plasmid-DNA. Zur Kontrolle wurden spezifische Primer für GAPDH
- 15 (SEQ ID NO:14 und 15) eingesetzt. Zur Überprüfung des selektiven Nachweises wurden die Primerpaare parallel auch auf das isolierte Plasmid hin ausgetestet. Die Nachweisbarkeit von Fragmenten der zu erwartenden Länge in einem der kritischen Normalgewebe (Herz, Leber,
- 20 Lunge, Niere und Leukozyten), nicht jedoch in den cDNA-Bibliotheken aus immunprivilegierten Geweben (Gehirn, fötales Gehirn und Testis) unter diesen PCR-Bedingungen (1 Zyklus: 3' 94°C; 35 Zyklen: 1' 94°C - 1' 55°C - 1' 72°C; 1 Zyklus: 7' 72°C) wurde als
- 25 Ausscheidungskriterium definiert. Mittels dieser qualitativen PCR-Analyse konnte die Zahl der Kandidaten auf 56 eingeeengt werden.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Beispiel 3

Transkriptionelle Analyse der Kandidaten-Klone in verschiedenen Tumor- und Normalgeweben

- Für die RT-PCR Analyse wurden cDNA-Pools verwendet die aus je 3 µg total-RNA von 3 verschiedenen Geweben des gleichen Typs hergestellt wurden. Die 9 µg total-RNA pro Gewebepool aus Tumor- oder Normalgeweben wurden mittels AMV-RT (Promega) entsprechend der Herstellerempfehlung revers transkribiert. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit genomischer DNA wurde die RNA vorher mit DNase I (Boehringer Mannheim) inkubiert. Qualität und Menge der cDNAs wurde durch PCR mit GAPDH spezifischen Primern (SEQ ID NO:14 und 15) nach 20 Zyklen (30'' 95°C, 90'' 60°C) überprüft.
- B99-cDNA wurde durch 25, 30 und 35 Zyklen des Programms 1' 95°C, 1' 55°C, 1' 72°C mit den B99-spezifischen Primern gemäß SEQ ID NO:7 und 8 amplifiziert. Analog wurden die anderen 55 Kandidaten-Klone mit jeweils spezifischen Primern untersucht. Die PCR Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Für 3 der 56 untersuchten Klone konnte mittels RT-PCR eine vermehrte Expression in verschiedenen Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben gezeigt werden. Ein Beispiel für Kandidat B99 ist in Fig. 1 gezeigt: Die RT-PCR Analyse von cDNA-Pools verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern ergab ein starkes Signal im Kolonkarzinom und in der Lungenadenokarzinomlinie A549 sowie ein schwaches Signal im Brustkarzinom und im Nierenzellkarzinom. Von allen untersuchten Normalgeweben war ein schwaches Signal nur

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

in Kolongewebe feststellbar. Im weiteren Verlauf wurde der Kandidat B99 genauer evaluiert.

Beispiel 4

5 Expressionsprofil von B99 in Tumor- und Normalgeweben

Einer der 56 Kandidaten (Bezeichnung: B99) zeigte mittels RT-PCR Transkription in 3 von 5 getesteten Tumorgewebe-Pools ein Signal. In den meisten getesteten Normalgeweben konnte hingegen keine Transkription
10 festgestellt werden.

Für eine detaillierte Untersuchung der B99-Expression wurden im folgenden cDNAs individueller Tumor- und Normalgewebeproben mittels PCR analysiert. Dabei zeigte sich, daß die Mehrzahl aller untersuchten
15 Kolonkarzinome (17/ 23), alle Pankreaskarzinome (3/ 3) und alle Magenkarzinome (4/4) B99 exprimieren. In entsprechenden Normalgeweben wurde eine Expression in 1/ 4, 0/ 3 bzw. 2/ 4 Fällen nachgewiesen. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt, Fig. 2
20 zeigt exemplarische Ergebnisse für Pankreas- und Kolongewebe: Mittels RT-PCR Analyse von individuellen cDNAs verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern konnte in 6 von 7 Tumorproben B99-cDNA nachgewiesen werden, während nur
25 eines der untersuchten Normalgewebe (1/ 6) eine schwache Expression von B99 zeigte.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Tabelle 1:

Tumorgewebe		Normalgewebe	
Typ	Positive Fälle/ getestete Fälle	Typ	Positive Fälle/ getestete Fälle
Kolonkarzinom	17/ 23	Kolon	1/4
Leberkarzinom	0/3	Leber	0/4
Lungenkarzinom	2/9	Lunge	0/4
Mammakarzinom	0/10	n.d.	
Pankreas- karzinom	3/3	Pankreas	0/4
Nierenzell- karzinom	1/10	Niere	0/4
Magenkarzinom	4/4	Magen	2/4
		Lymphozyten	0/1
		Dünndarm	1/1
		Ovar	0/1
		Testis	0/4
		Prostata	0/1
		Thymus	0/1
		Milz	0/4
		Muskel	0/1
		Gehirn	0/1
		Herz	0/4

Für die Northern Blot Analyse wurden Human Multiple Tissue Northern blots (Clontech, Palo Alto) mit dem

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

[α -³²P]dCTP (NEN, Boston) markierten 271 bp B99 PCR Produkt bei 65° für 16 h hybridisiert. Die Visualisierung erfolgte durch Standard-Autoradiografie (Xomat BR film, Kodak) und Exposition auf einen Phosphorimager (Molecular Dynamics). Fig. 3 zeigt das Ergebnis dieser Analyse von 16 Normalgeweben. Dabei zeigte sich lediglich in Kolon und deutlich schwächer in Duodenum ein Transkript von ~3,0 kb Größe. Die geringe Intensität des Signals läßt jedoch eine immunologisch relevante Expression als unwahrscheinlich erscheinen.

Das Ergebnis aller Versuche bezüglich des mRNA-Profiles von B99 (kompiliert aus RT-PCR und Northern Blot Analyse) ist in Tab. 1 zusammengefaßt. Beispiel 4 zeigt, daß B99 in einem hohen Prozentsatz von Tumoren verschiedener Indikationen deutlich transkribiert wird, während in allen untersuchten Normalgeweben keine oder nur vereinzelte Transkription gefunden wurde.

Beispiel 5: Nachweis der Proteinexpression von B99 im humanen Tumoren

Zum Nachweis der Proteinexpression von B99 wurden B99-spezifische Antikörper in Kaninchen generiert. Zum Immunisieren wurde das bakterielle Fusionsprotein pGEX-ORF2-1/1 verwendet (Position 1278 bis 1740 SEQ ID No:1) verwendet, das erhaltene Serum wurde mittels Peptid B99-KML (SEQ ID NO:61) affinitätsgereinigt. Zur Überprüfung der spezifischen Reaktivität des Serums wurde der gesamte Leserahmen von B99 als GFP-Fusionsprotein transient in COS-Zellen exprimiert und die transfizierten Zellen im Western-Blot mit dem Serum

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

B99-NKF getestet. Dabei zeigte sich, daß das Serum deutlich mit dem exprimierten B99 Fusionsprotein reagiert. In weiterer Folge wurden 56 Proben von verschiedenen Tumortypen immunhistochemisch mit dem Serum B99-NKF auf B99 Expression hin analysiert (Tabelle 2). Dabei zeigte sich in 53 Fällen eine Expression von B99 in den Tumorzellen. Beispiele sind in Fig. 4 zu sehen, die die immunhistochemische Analyse von vier verschiedenen Fällen von Adenokarzinomen zeigt (a: Kolon, b: Brust; c: Pankreas; d: Magen). In allen Fällen ist eine deutliche Anfärbung der Tumorzellen zu sehen, während Bindegewebe und Gefäße keine Anfärbung zeigen. In Fig. 4a kann man weiterhin sehen, daß residuale normale Kolonmukosa keine Reaktivität mit dem Antikörper zeigt. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin. Die positive Reaktivität in der Immunhistochemie wurde in einer Auswahl der Fälle mittels RT-PCR auch auf RNA-Ebene bestätigt. Dabei lieferten auch Brusttumoren ein positives PCR-Signal. Dieser gegenüber Beispiel 4 unterschiedliche Befund kann durch die Verwendung anderer PCR-Primer als in Beispiel 4 erklärt werden.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Tabelle 2

Tumortyp	positive Fälle/ getestete Fälle
Brust Adenokarzinom	8/ 8
Kolon Adenokarzinom	10/ 11
Lunge Adenokarzinom	7/ 8
Lunge Plattenepithelkarzinom	8/ 8
Pankreas Adenokarzinom	11/ 12
Magen Adenokarzinom	9/ 9

Beispiel 6

5 Klonierung von B99

- Klon B99 besitzt zwischen den durch die RDA eingeführten Adaptoren ein 271 bp langes Insert eines unbekanntes humanen Gens. Zur vollständigen Klonierung der humanen Sequenz wurde wie folgt vorgegangen: eine
- 10 UniGene Analyse (National Center for Biotechnology Information) ergab folgende zu B99 homologe ESTs: AA315469, AA345780, AA295520. Mit Hilfe dieser ESTs konnte die B99 Sequenz auf 439 Nukleotide verlängert werden. Neue Primer innerhalb dieser Sequenz wurden
- 15 synthetisiert (SEQ ID NO:9 bis 12). Durch PCR mit verschiedenen Kombinationen dieser Primer konnten die jeweiligen theoretischen Fragmentlängen aus A549 cDNA amplifiziert werden.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Klonierung des 3'-Endes: 10 µg total-RNA aus der Nierenzellkarzinom-Zelllinie 786-0 wurden mittels Oligo-dT Primer revers transkribiert, und ein Aliquot dieser cDNA wurde einer PCR unterzogen, deren Programm mit hohen Annealingtemperaturen beginnt, sodaß nur der genspezifische Primer an die cDNA bindet (Primer SEQ ID NO:7 bzw. 9), während der zweite Primer (T_m -53°C, SEQ ID NO:13) erst bei niedrigerer Temperatur an die neu synthetisierte DNA-Vorlage bindet. Diese sog. "touch-down PCR" (Mastercycler Gradient, Eppendorf) wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 20 Zyklen (15'' 95°C, 30'' 75°C (reduziert um 0,7°C je Zyklus)), 1 Zyklus 7'' 72°C, sowie 20 Zyklen (15'' 95°C, 30'' 50°C), 1 Zyklus 7'' 72°C).

Ein Aliquot des obigen Ansatzes wurde mittels einer zweiten Primerkombination (SEQ ID NO:7 und 13 bzw. SEQ ID NO:12 und 13) unter den gleichen Bedingungen wie vorher erneut PCR amplifiziert. Aliquots der PCR-Ansätze wurden direkt in den pCEM-T easy-Vektor (Promega) ligiert und anschließend in kompetente *E. coli* J109 (Promega) transformiert. Positive Klone wurden nach PCR-Selektion sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine Übereinstimmung mit der bisherigen Sequenz ab dem für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer und darüberhinaus 1777 zusätzliche Nukleotide bis zum Beginn einer PolyA-Sequenz im 3'-Bereich der Sequenz. PCR Amplifikation von cDNA aus Tumorzelllinien (786-0, A549) sowie Gewebeproben von Kolonkarzinomen mit den Primern gemäß SEQ ID NO: 16 bis 18 ergaben mit den ursprünglichen Primern die nach der Klonierung erwarteten Fragmente. In dem nunmehr aus 2216 bp bestehenden cDNA-Fragment konnte ein

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- durchgehender Leserahmen von Pos. 427 bis 1743 identifiziert werden. Weiter im 5'-Bereich der Sequenz konnten keine zusätzlichen Leserahmen identifiziert werden, woraus zu schließen ist, daß der Bereich von
- 5 0 bis 427 bereits zum 5'-nicht translatierten Bereich der B99 mRNA gehört.
- Mit Hilfe der Primer SEQ ID NO:12 und SEQ ID NO:17 wurde der gesamte kodierende Bereich von B99 aus A549-cDNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. Bei
- 10 der Sequenzierung wurden mehrere Klone mit einer Insertion von einem Nukleotid an Pos. 923 im Vergleich zu SEQ ID NO:1 (kodiert für B99-1) erhalten (SEQ ID NO:3 bzw. SEQ ID NO:5).
- Diese Insertion führt zu einer Veränderung des offenen
- 15 Leserahmens von B99 mit einer daraus resultierenden veränderten Aminosäuresequenz im C-terminalen-Bereich des B99-Proteins; die von diesem Leserahmen abgeleitete Sequenz des B99-Antigens (B99-2) ist in SEQ ID NO:4 dargestellt.
- 20 Einer der aus A549-Zellen isolierten Klone zeigte neben der genannten Insertion einen Nukleotidaustausch an Position 622 im Vergleich zu Sequenz SEQ ID NO:1 auf. Dieser Nukleotidaustausch bedingt an Position Nr. 66 der Aminosäuresequenz einen Ersatz von Arginin
- 25 (SEQ ID NO:2, B99-1) durch Tryptophan (SEQ ID NO:4, B99-2). Abgesehen von diesem Aminosäureaustausch ist die Aminosäuresequenz von B99-2 bis zu Position 166 identisch mit B99-1.
- Darüberhinaus bedingt die genannte Insertion einen
- 30 zweiten potentiellen Leserahmen von Pos. 845 bis 1744

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz. Ein von einer cDNA mit diesem Leserahmen exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:6 dargestellte Aminosäuresequenz auf (B99-3). Die Sequenz von B99-3 ist von Pos. 1 bis 27 unterschiedlich zu B99-1 und ab Pos. 28 identisch mit B99-1.

Beispiel 7

Potentielle MHC-Bindungspeptide in der kodierenden Region von B99

Potenitielle Peptid-Epitope innerhalb der kodierenden Region von B99-1 gemäß SEQ ID NO: 2 (Aminosäureposition: 1-438; Tab. 3A), von B99-2 gemäß SEQ ID NO:4 (Aminosäureposition 150-190; Tab. 3B) und von B99-3 gemäß SEQ ID NO:6 (Aminosäureposition 1-40; Tab. 3C) wurden mittels den von Parker et. al., 1994 beschriebenen Algorithmen unter Zugrundelegung bekannter Motive (Rammensee et al. 1995) durchgeführt. Für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1, -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, wurden 9-mer Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tabelle 3 aufgelistet. Durch analoges Vorgehen können weitere potentielle Peptid-Epitope für andere HLA-Typen bzw. 8- und 10-mer Peptide ermittelt werden.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Tabelle 3A

Immunogene 999-Peptid-Kandidaten (B99-1)

Start- position in SEQ ID NO:2/ SEQ ID NO:	Sequenz	HLA
5	Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu	B14
12	Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met	A*0201
19	Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu	A*0201
21	Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu	A*0201
85	Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys	A3
90	Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe	A3
95	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr	B*4403
96	Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu	B7
123	Pro Leu Ser Lys Glu Glu	A3

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

	Val Glu Phe	
127	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr	B*4403
147	Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala	B14
167	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	A*0201
206	Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu	A*0201
209	Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	A*0201
251	Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys	A1, A3
275	Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys	A3
305	Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys	A3
318	Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr	A1
400	Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu	A*0201
407	Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys	A3
413	Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu	B7

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

422	Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr	A1
423	Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys	A1, A3

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Tabelle 3B

Immunogene B39-Peptid-Kandidaten (E99-2)

Start- position in SEQ ID NO:4/ SEQ ID NO:		
152	Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr	A1, A3
154	Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr Cys Val	A*0201
160	Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val	A*0201
163	His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn	A1
164	Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe	A1, H*4403
172	Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr	A1
177	Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys	A1
182	Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln	A*0201

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Tabelle 3C

Immunogene B99-Peptid-Kandidaten (B99-3)

Start- position in SEQ ID NO:6/ SEQ ID NO:		
2	Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr	A1, B14
5	Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu	A*0201
10	Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg	A1
12	Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr	A1, A3
14	Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val	A*0201
16	Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met	A*0201

5

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Beispiel 8

MHC-Stabilisierungsversuch mit potentiellen
B99-spezifischen MHC-Bindungspeptiden

- Potentielle B99-MHC-Bindungspeptide wurden in einem
5 T2-Peptid-Beladungsversuch auf ihre Fähigkeit hin
überprüft, HLA-A2 Moleküle auf der Oberfläche von
T2-Zellen zu stabilisieren, was einen Hinweis auf ihre
MHC-Bindungsfähigkeit darstellt. Der Versuch wurde
durchgeführt, wie von Böhm et al., 1998, beschrieben.
10 Die Stabilisierung wurde durch eine FACS-Analyse mit
einem HLA-A2 spezifischen Antikörper (BB7.2) gemessen.
Fünf Peptide zeigten einen Stabilisierungseffekt wenn
sie in einer Konzentration von 100 µg/ml verwendet
wurden, dargestellt durch eine Erhöhung der mittleren
15 Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle ohne
Peptid bzw. zu einem MAGE-3 A1-Kontrollpeptid, welches
keine Bindung zeigt. (Tabelle 4):

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Tabelle 4

Peptid	Sequenz	durchschnittliche Fluoreszenzintensität
kein Peptid		2,27
MAGE-3 A1 Negativ- kontrolle	Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr	2,25
B99-12	Tyr Leu Trp Ala Leu Cys Tyr Met Leu	7,46
B99-19	Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu	7,43
B99-21	Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu	3,32
B99-187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	3,57
B99-209	Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	4,72

Zur weiteren Analyse wurden diese Peptide in einer

5 Verdünnungsreihe im selben Testsystem untersucht, um
eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit der Bindung
zu zeigen. Fig. 5 zeigt die MHC Stabilisierung auf
T2-Zellen mittels verschiedener Konzentrationen von B99
Peptiden. Insbesondere die Peptide B99-19, B99-187 und

10 B99-209 zeigen eine deutliche
Konzentrationsabhängigkeit der MHC-Stabilisierung,
weshalb diese Peptide bevorzugte Kandidaten für
Immunisierungsstrategien sind. Als Positivkontrolle
wurde Tyrosinase, als Negativkontrolle das HLA-A1-

15 spezifische Peptid MAGE-3 verwendet.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Literatur

- 5 Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga,
J., and Knop, J. (1997), *J. Immunol. Methods* 203,
171-180.
- Blake, J., Johnston, J.V., Hellström, K.E., Marquardt,
10 H., and, Chen, L. (1996), *J. Exp. Med.* 184,
121-130.
- C. M. Böhrt, M. L. Hanski, S. Stefanovic, H. G.
Rammensee, H. Stein, J. Taylor-Papadimitriou, E. O.
15 Riecken, and C. Hanski. *Int.J.Cancer* 1998.Mar.2.
75:688-693
- Boon, T, J. C. Carottini, B. Van den Eynde, P. van der
Bruggen, and A. Van Pel (1994), *Annu.Rev.Immunol.*
20 12: 337-365
- Boon T, (1998). Tumor antigens recognized by cytolytic
T cells. *Cancer Vaccine Week - Interantional
Symposium, New York, Oct 1998; abstract S01*
- 25 Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312: 643-646
- Bruggemann, M. und Neuberger, M.S., (1996), *Immunol.
Today* 17: 391-397
- 30 Buschle M, Schmidt W, Zauner W, Mechtler K, Trska B,
Kirlappos H, Birnstiel M (1997), *Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A.* 94:3256-3261

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- Celluzzi, CM and Falc, LD, Jr. (1998), *J. Immunol.* 160:
3081-3085
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure,
5 A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E.,
Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997), *Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1914-1918.
- Coulis, P.G. (1997), *Mol. Med. Today* 3: 261-268
- 10 Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow,
TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, and
Slingsluff, CL, Jr. (1994), *Science* 264: 716-719
- 15 Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik,
A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov,
K., Gurskaya, W., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D.
(1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6025-
6030.
- 20 Drancff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, F.,
Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H.,
Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993), *Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. A* 90: 3539-3543.
- 25 Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J (1985),
J. Virol. 55: 836-839
- Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., and
30 Rammensee, H-G (1991), *Nature* 351: 290-296.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H.I., Simons, J.W., Karasuyama, H., Vogelstein, B., and Frost, P. (1990), *Cell* 60: 397-403.
- 5
Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronir, K., Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), *J. Exp. Med.* 172: 1217-1224.
- 10 Gaudi C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F (1999), *J Immunol* 162:1730-1738
- Graziano, R.F., et al., (1995), *J. Immunol.* 155: 4996-5002
- 15 Griffiths, A.D., et al., (1994), *EMBO J.* 13: 3245-3260
- Halliday, CM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, and Barnetson RS (1995), *World J. Surg.* 19: 352-358
- 20 Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SBC, Lekstrom KJ, Deacon DD, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CL, Ross MM (1998), *Cancer Res* 58:5144-5150
- 25 Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), *Nucleic. Acids. Res.* 22, 5640-5648.
- Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J., and Knuth, A. (1998), *J. Exp. Med.* 187, 265-270.
- 30

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- Jakobovits, A., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:
561-566
- 5 Jameson, BA and Wolf, H (1988) The antigenic index: a
novel algorithm for predicting antigenic
determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4: 181-186
- Jessup, JM and Loda, M (1998) Prognostic markers in
10 rectal carcinoma. *Semin. Surg. Oncol.* 15: 131-140.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K.,
King, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A.,
Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1995), *J.*
15 *Immunol.* 154: 3961-3968.
- Kawakami, Y, Robbins, PF, and Rosenberg, SA (1996),
Keio J. Med. 45: 106-108
- 20 Köhler, G. und Milstear, C. (1975), *Nature* 263, 495-497
- Kruif, J., et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 92: 3938-3942
- 25 Kyte, J and Doolittle, RF (1982), *J. Mol. Biol.* 157:
105-132
- Lethe, B, Lucas, S, Michaux, L, De Smet, C, Godelaine,
D, Serrano, A, De Plaen, E, and Boon, T (1998),
30 *Int. J. Cancer* 76: 903-908

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F, Viel S, and Hercend T (1993), *Cancer Res.* 53: 3569-3573
- 5 Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P (1997) , *J Exp Med* 186:785-793
- Marchand M, Keynants P, Rankin B et al (1995), *Int. J. Cancer* 63:883-885
- 10 Mayordomo, J.L., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falco, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., and Lotze, M.T. (1995), *Nature Medicine* 1, 1297-1302.
- 15 McGuinness, B.T., et al., (1996), *Nature Biotechnol.* 14, 1149
- Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 8:651-657
- 20 Murphy, G.P., Elgamal, A.A., Su, S.L., Bostwick, D.G., and Holmes, E.H. (1998), *Cancer* 83, 2259-2269
- 25 Neuberger, M.S., et al., (1984), *Nature* 312: 604-608
- Pardoll, D. M. (1998) *Nature Medicine* 4: 525-531
- Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. (1994), *J. Immunol.* 152:163.
- 30

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- Parkhurst, M.R., Saigaller, M.L., Southwood, S.,
Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and
Kawakami, Y. (1996), *J. Immunol.* 157, 2539-2548.
- 5 Paterson Y, Ikonomidis G (1996), *Curr. Opin. Immunol.*
5: 664-9
- Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995),
Immunogenetics 41:178-228
- 10 Rapellino, M, Pechio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, and
Cavallo, A (1995), *Anticancer Res.* 15: 1065-1070
- Ravaioli, A., Bagli, L., Zucchini, A., and Monti, F.
15 (1998), *Cell. Prolif.* 31, 113-126
- Revillion, F, Bonnetterre, J, and Peyrat, JP (1998),
Eur. J. Cancer 34: 791-808
- 20 Restifo NP (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5: 658-63
- Riechmann, L., et al., (1988), *Nature* 332: 323-327
- Robbins, PF and Kawakami, Y (1996), *Curr. Opin.*
25 *Immunol.* 8: 628-636
- Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey,
H.M., and Sette, A. (1993), *Cell* 74, 929-937.
- 30 Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, R., Cochlevius, B.,
Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G.,

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- Schober, I., and Pfreundschuh, M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11810-11813
- 5 Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989
- Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair K, Hofstetter A, Riethmuller G, and Segurado OG
10 (1993), J. Immunol. 151: 4209-4220
- Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kirlappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94:3262-3267
15
- Schweighoffer, T. (1997), Onc. Res. 3, 164-176
- Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-P., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., and Chisari, F.V. (1994), J. Immunol. 153, 5586-5592.
20
- 25 Stauss, H.J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., and Sinclair, C. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89, 7871-7875.
- Tepper, R.I., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1989),
30 Cell 57: 503-512.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- Tighe H, Corr, M, Roman M, and Raz E (1998), Immunol. Today 19:89-97
- 5 Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Bessing, M.E., Van-der-Sch, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (26): 14660-14665
- 10 Turing, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., and Storkus, W.J., (1997), Eur. J. Immunol. 27, 2702-2707,.
- Van den Eynde, B. and Brichard, V.G. (1995), Curr. Opin. Immunol. 7, 674-681.
- 15 Van den Eynde, BJ, and van der Bruggen, P (1997), Curr. Opin. Immunol. 9:684-693
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. (1991, Science 254:1643-1647
- 20 van der Burg, S.H., et al., (1996), J. Immunol. 156, 3308-3314
- 25 van Elsas, A., van der Minne, C.E., Borghi, M., van der Spek, C.W., Braakman, E., Osanto, S., and Schrier, P.I. (1996), CTL Recognition of an IL-2 Producing Melanoma Vaccine. In: Immunology of human melanoma. Tumor-host interaction and immunotherapy, edited by
- 30 M. Maio, Amsterdam: IOS, 1996, p. 165-173

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- van Elsas, A., Aarnoudse, C., van der Minne, C.E., van der Spek, C.W., Brouwerstijn, N., Osanto, S., and Schriek, P.I. (1997), *J. Immunother.* 20: 343-353.
- 5 Vaughan, T.J., et al., (1998), *Nature Biotechnol.* 16, 535-539
- Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, KW (1995), *Science* 270: 484-487
- 10 Wang, L., et al., (1997), *Mol. Immunol.* 34: 609-618
- Wang, RF (1997), *Mol. Med.* 3: 716-731
- 15 Wax, S.D., Rosenfield, C.L., and Taubman, M.B., (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 13041-13047.
- Wax, S.D., Tsao, L., Lieb, M.E., Fallon, J.T., and Taubman, M.B. (1996), *Lab. Invest.* 74, 797-808.
- 20 Winter, G., et al., (1994), *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455
- Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), *Int. J. Cancer* 57: 413-418
- 25 Woelfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D (1995), *Science* 269: 1281-1284
- 30 Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho,

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

K.R., August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(25): 11671-11675.

5 Zitvogel, L., Mayordomo, J.I., Tjandrawan, T., DeLeo, A.B., Clarke, M.R., Lotze, M.T., and Storkus, W.J. (1996), J. Exp. Med. 183, 87-97.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

Patentansprüche

1. Tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung B99,
ausgewählt aus der Gruppe von Polypeptiden mit der
5 in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6
angegebenen Aminosäuresequenz.
2. Immunogenes Proteinfragment oder Peptid, dadurch
gekennzeichnet, daß es von einem in Anspruch 1
definierten tumorassoziierten Antigen abgeleitet
10 ist.
3. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2,
das eine humorale Immunantwort auslöst.
4. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2,
das bzw. dessen Abbauprodukte durch MHC-Moleküle
15 präsentiert worden und eine zelluläre Immunantwort
auslösen.
5. Immunogenes Peptid nach Anspruch 4, ausgewählt aus
der Gruppe von Peptiden gemäß SEQ ID NO:22 bis 55.
6. Immunogenes Peptid nach Anspruch 5, ausgewählt aus
20 der Gruppe von Peptiden gemäß SEQ ID NO:31, 57
und 59.
7. Immunogenes (Poly)peptid nach einem der Ansprüche
1 bis 6 für die Immuntherapie von
Krebserkrankungen *in vivo* oder *ex vivo*, wobei das
25 (Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen
des Patienten induziert, die B99 exprimieren.

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

8. Pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie als wirksame Komponente ein oder mehrere immunogene (Poly)peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie verschiedene von B99 abgeleitete immunogene Peptide enthält.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere von B99 abgeleitete Peptide in Mischung mit von anderen tumorassoziierten Antigenen abgeleiteten Peptiden enthält.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide an mindestens zwei verschiedene HLA-Typen binden.
12. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften eines in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigens oder für Fragmente davon.
13. DNA-Molekül nach Anspruch 12, kodierend für ein immunogenes Polypeptid der Bezeichnung B99 mit der in SEQ ID NO:2, 4 oder 6 dargestellten Aminosäuresequenz bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide.
14. DNA-Molekül nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:1, 3 oder 5 dargestellten Sequenz ist

WO 00/66727

PCT/EP00/03552

- oder mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:1, 3
oder 5 dargestellten Sequenz unter stringenten
Bedingungen hybridisiert.
15. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein DNA-
5 Molekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14.
16. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 12 bis 15,
für die Immuntherapie von Krebserkrankungen, wobei
das von dem DNA-Molekül exprimierte B99-
(Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen
10 des Patienten induziert, die B99 exprimieren.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als
wirksamen Bestandteil ein oder mehrere der in
einem der Ansprüche 12 bis 16 definierten
DNA-Moleküle.
- 15 18. Verwendung von Zellen, die das in Anspruch 1
definierte tumorassoziierte Antigen exprimieren,
für die Herstellung einer Krebsvakzine.
19. Antikörper gegen ein in einem der Ansprüche 1
bis 6 definiertes (Poly)peptid.
- 20 20. Antikörper nach Anspruch 19, dadurch
gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
21. Antikörper nach Anspruch 19 oder 20 für die
Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen, die
mit der Expression von B99 assoziiert sind.

25

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. November 2000 (09.11.2000)

PCT

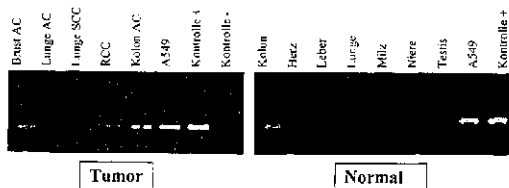
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/066727 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/12, C07K 1467, C12N 9/10, A61K 3808, 3804, 3170, 3900, C07K 1618
- (52) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05552
- (21) Internationales Anmeldedatum: 19. April 2000 (19.04.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 19 225.1 28. April 1999 (28.04.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von USA): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE/01); Postfach 200, D 55216 Ingelheim am Rhein (DE)
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder; Anmelder (nur für USA): ADOLF Günther (A/01); Süßgasse 15-17/10, A-1070 Wien (A/1); HELDER, Karl-Heinz (DE/AT); Johann-Strauss-Platzstraße
- (74) Anwälte: LAUDIEN, Dieter; Boehringer Ingelheim GmbH, D-55216 Ingelheim am Rhein usw. (DE)
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AU, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, EG, ID, IL, IN, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, IT.LU, MC, NL, PT, SE).
- Veröffentlicht: mit internationalen Recherchenbericht
- (48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten Fassung: 12. September 2002
- (15) Informationen zur Berichtigung: siehe PCT Gazette Nr. 37/2002 vom 12. September 2002, Section II

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Titel: TUMOUR ASSOCIATED ANTIGEN

(54) Bezeichnung: TUMORASSOZIIERTES ANTIGEN



(57) Abstract: The invention relates to a tumour-associated antigen, to immunogenic peptides derived therefrom, to DNA molecules that code for said peptides and to the use thereof in the immunotherapy of cancer.

(57) Zusammenfassung: Tumorssoziiertes Antigen, davon abgeleitete immunogene Peptide und dafür kodierende DNA-Moleküle sowie deren Verwendung in der Immuntherapie von Krebskrankungen.

WO 00/066727 A1

WO 00/066727 A1

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen sind auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WG 00066727

PCT/EP00/03552

Titel: Tumorassoziiertes Antigen

Die Erfindung bezieht sich auf die Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

- 5 Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen zu schützen bzw. diese aktiv zu bekämpfen. Die Bedeutung eines intakten Immunsystems zeigt sich vor allem bei vererbten oder erworbenen Immundefizienzen. Der Einsatz
- 10 von prophylaktischen Vakzinprogrammen erwies sich in vielen Fällen als äußerst zielführende und erfolgreiche immunologische Intervention im Kampf gegen virale oder bakterielle Infektionserkrankungen. Weiters hat sich gezeigt, daß das Immunsystem auch an der Eliminierung
- 15 von Tumorzellen maßgeblich beteiligt ist. Dabei spielt die Erkennung der tumorassoziierten Antigene (TAAs) durch Komponenten des Immunsystems eine wesentliche Rolle. Im weitesten Sinn kann jede (peptidische oder nicht peptidische) Komponente einer Tumorzelle, die von
- 20 einem Element des Immunsystems erkannt und zur Stimulation einer immunologischen Antwort führt, als immunogenes Tumorantigen fungieren. Besondere Bedeutung kommt dabei jenen Tumorantigenen zu, die nicht nur eine immunologische Reaktion hervorrufen, sondern auch eine
- 25 Abstoßung des Tumors bewirken. Die Identifizierung definierter Antigene, die solch eine immunologische Reaktion bewirken können, stellt einen wichtigen Schritt für die Entwicklung einer molekular definierten Tumorstoffdarstellung dar. Obwohl noch nicht ganz geklärt ist,
- 30 welche Elemente des Immunsystems für eine Abstoßung des

Tumors verantwortlich sind, besteht doch ein Konsens darüber, daß dabei CD8-exprimierende zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) eine Hauptrolle spielen (Coulie, 1997). Besonders bei jenen Tumorzarten (z.B. Melanom und
5 Nierenkazinom), die eine relativ hohe Spontanremissionsrate aufweisen, konnte eine Korrelation zwischen klinischem Verlauf und dem vermehrten Auftreten von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen festgestellt werden (Schendel et al., 1993; Mackensen
10 et al., 1993; Halliday et al., 1995; Kawakami et al., 1995; Kawakami et al., 1996; Wang, 1997; Celluzzi und Falco, 1998). Dabei wurden spezifische CTL-Klone entweder aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) oder peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) nach
15 Kokultivierung mit meist autologen Tumorzellen und Zytokinstimulation *in vitro* erhalten. Sowohl in Tiermodellen als auch in *in vitro* kultivierten humanen Zellkultursystemen konnte die T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen durch Transfektion der Tumorzellen mit
20 Zytokinen verstärkt werden (van Elsas et al., 1997; Gansbacher et al., 1990; Tepper et al., 1989; Fearon et al., 1990; Dranoff et al., 1993).

Aufgrund der Korrelation zwischen Remission und Beteiligung von CD8⁺-T-Zellen ist die Identifizierung
25 tumorassoziierter Antigene (TAA), die durch CD8-positive CTLs erkannt werden, ein erklärtes Hauptziel auf dem Weg zur Entwicklung einer Tumorstoffimpfung (Pardoll, 1998; Robbins und Kawakami, 1996). Ob auch andere Zelltypen des Immunsystems wie
30 z.B. CD4⁺-T-Helferzellen eine wesentliche Rolle spielen ist noch unklar; einige Studien mit MAGE-3/HLA-A1 Peptiden in Melanompatienten deuten darauf hin

WG 00/066727

PCT/EP00/03552

3

(Marchand et al., 1995; Boon et al., 1998). In den vergangenen Jahren ist eine Reihe von TAAs, die durch CTLs erkannt werden, identifiziert worden (Boon et al., 1994; van den Eynde und van der Bruggen, 1997).

- 5 T-Zellen erkennen Antigene als Peptidfragmente, die an Zelloberflächen von MHC-Molekülen („major histocompatibility complex“, im Menschen „HLA“ = „human leukocyte antigen“) präsentiert werden. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-I Moleküle kommen auf
- 10 den meisten Zellen mit Kern vor und präsentieren Peptide (üblicherweise 8-10-mer), die durch proteolytischen Abbau endogener Proteine entstehen (sog. Antigen-Verarbeitung, „antigen processing“). Peptid:MHC-I Komplexe werden von CD8-positiven CTLs
- 15 erkannt. MHC-II Moleküle kommen nur auf sog. „professionellen antigen-präsentierenden Zellen“ (APC) vor, und präsentieren Peptide exogener Proteine, die im Zuge der Endocytose von APC aufgenommen und verarbeitet werden. Peptid:MHC-II Komplexe werden von CD4-Helfer-T-
- 20 Zellen erkannt. Durch eine Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Peptid:MHC Komplex können verschiedene Effektormechanismen ausgelöst werden, die im Fall von CTLs zur Apoptose der Zielzelle führen. Das geschieht, wenn entweder der MHC (z.B. im Fall der
- 25 Transplantatabstoßung), oder das Peptid (z.B. im Fall intrazellulärer Pathogene) als fremd erkannt wird. Allerdings erfüllen nicht alle präsentierten Peptide die strukturellen und funktionellen Anforderungen für eine effektive Interaktion mit T-Zellen (wie von
- 30 Rammensee et al., 1995 und weiter unten beschrieben).

WG 00/066727

PCT/EP00/03552

4

- Für den Einsatz von TAA's in einer Tumervakzine sind grundsätzlich mehrere Applikationsformen möglich: Das Antigen kann entweder als rekombinantes Protein mit geeigneten Adjuvantien bzw. Trägersystemen, oder als
- 5 für das Antigen kodierende cDNA in Plasmid- (DNA-Vakzine; Tighe et al., 1998), bzw. viralen Vektoren (Restifo, 1997) appliziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von rekombinanten
- 10 Bakterien (z.B. *Listeria*, *Salmonella*), die das humane Antigen rekombinant exprimieren und durch ihre zusätzlichen Komponenten eine adjuvative Wirkung haben (Paterson, 1996; Pardoll, 1998). In allen diesen Fällen ist eine Verarbeitung und Präsentation des Antigens durch sog. „professionelle antigen-präsentierende
- 15 Zellen“ (APC) notwendig. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz synthetischer Peptide (Melief et al., 1996), die den korrespondierenden T-Zell-Epitopen des Antigens entsprechen und die entweder von außen auf die APC geladen (Buschle et al., 1997; Schmidt et al.,
- 20 1997) oder von den APC aufgenommen und intrazellulär auf die MHC I Moleküle transferiert werden. Die therapeutisch effizienteste Applikationsform für ein definiertes Antigen wird im allgemeinen in klinischen Studien bestimmt.
- 25 Zu den von den tumorspezifischen CTLs erkannten Antigenen bzw. deren Epitopen zählen Moleküle, die aus sämtlichen Proteinklassen stammen können (z.B. Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Enzyme; zur Übersicht siehe Rammensee et al., 1995; Robbins und
- 30 Kawakami, 1996). Diese Proteine müssen nicht notwendigerweise an der Zelloberfläche lokalisiert sein, wie dies bei der Erkennung durch Antikörper

WO 00/066727

5

PCT/EP00/03552

erforderlich ist. Um für die Erkennung durch CTLs als tumorspezifisches Antigen zu fungieren bzw. um für die Therapie eingesetzt zu werden, müssen die Proteine bestimmte Bedingungen erfüllen: erstens soll das Antigen hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert werden und in sog. "kritischen" Normalgeweben nicht oder nur in geringerer Konzentration als in Tumoren vorkommen. Kritische Normalgewebe sind essentielle Gewebe; eine gegen sie gerichtete Immunreaktion könnte unter Umständen schwerwiegende, zum Teil lethale Folgen haben. Zweitens soll das Antigen nicht nur im Primärtumor, sondern auch in den Metastasen vorhanden sein. Des Weiteren ist es im Hinblick auf eine breite klinische Anwendung des Antigens erstrebenswert, wenn es in mehreren Tumorarten in hoher Konzentration vorhanden ist. Eine weitere Vorbedingung für die Eignung eines TAA als wirksamer Bestandteil einer Vakzine ist das Vorhandensein von T-Zell-Epitopen in der Aminosäuresequenz des Antigens; vom TAA abgeleitete Peptide sollen zu einer *in vitro/in vivo* T-Zell Antwort führen ("immunogenes" Peptid). Ein weiteres Selektionskriterium für ein klinisch breit anwendbares immunogenes Peptid ist die Häufigkeit, mit der das Antigen in einer gegebenen Patientenpopulation anzutreffen ist.

Die immunogenen tumorassoziierten Antigene (TAAs), von denen größtenteils bereits gezeigt wurde, daß sie T-Zell Epitope besitzen, lassen sich in mehrere Kategorien einteilen, u.a. virale Proteine, mutierte Proteine, Überexprimierte Proteine, durch chromosomale Translokation gebildete Fusionsproteine, Differenzierungsantigene, onkofetale Antigene (Van der

WO 00/066727

6

PCT/EP00/03552

Eynde und Brichard, 1995; van den Eynde und van der Bruggen, 1997).

Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von TAAs, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Tumorstoffe darstellen, beruhen einerseits auf dem Einsatz von in Patienten bereits induzierten CTLs (zelluläre Immunantwort) oder Antikörpern (humorale Immunantwort), oder basieren auf der Erstellung differenzieller Transkriptionsprofile zwischen Tumoren und Normalgeweben. Im ersten Fall, dem immunologischen Ansatz, werden Patienten-CTLs für ein Screening eukaryotischer Tumor-cDNA-Expressionsbibliotheken, die über MHC-I Moleküle die CTL-Epitope präsentieren, eingesetzt (Boon et al., 1994), während mittels hochaffiner Patienten-Antisera prokaryotische-cDNA-Expressionsbibliotheken, direkt über eine Immunoblot-Analyse der einzelnen Plaques auf das Vorhandensein von TAAs untersucht werden (Sahin et al., 1995). Eine Kombination von CTL-Reaktivität und proteinchemischen Verfahren stellt die Isolierung von aus MHC-I isolierten Peptiden von Tumorzellen dar, die über Reaktivität mit Patienten-CTLs vorselektioniert wurden. Die Peptide werden aus dem MHC-I Komplex ausgewaschen und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert (Falk et al., 1991; Woelfel et al., 1994; Cox et al., 1994). Die Ansätze, welche CTLs zum Charakterisieren von Antigenen verwenden, sind aufgrund der erforderlichen Kultivierung und Aktivierung von CTLs mit einem erheblichen Aufwand verbunden bzw. nicht immer erfolgreich.

WG 00/066727

7

PCT/EP00/03552

Methoden zur Identifizierung von TAA's, welche auf dem Vergleich des Transkriptionsprofils von Normal- mit Tumorgewebe beruhen, sind vielfältig; dazu zählen die differenzielle Hybridisierung, die Erstellung von

5 Subtraktions-cDNA-Banken ("representational difference analysis"; Hubank und Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) und der Einsatz der DNA-Chip Technologie oder der SAGE-Methode (Velculescu et al., 1995). Im Gegensatz zur oben erwähnten immunologischen Methode mit Hilfe

10 von Patienten-CTLs muß beim Einsatz von molekularbiologischen Methoden gezeigt werden, daß die damit gefundenen potentiellen Antigenkandidaten tumorspezifisch (tumorassoziiert) sind und tatsächlich T-Zell Epitope besitzen, die eine zytotoxische T-Zell

15 Antwort auslösen können. In zumindest einem Fall (NY-ESO/EGE-1) wurde ein Antigen sowohl durch die Verwendung von Patientenserum als auch durch RDA identifiziert (Chen et al., 1997; Lothe et al. 1998), außerdem wurden CTL-Epitope dieses Antigens und eine

20 gleichzeitige spontane humorale und T-Zell Antwort in einem Patienten beschrieben (Jager et al., 1998).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein neues tumorassoziiertes Antigen (TAA) bereitzustellen.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA

25 („representational difference analysis“) zwischen einer Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie (A549) und Normallungengewebe eine cDNA-Subtraktionsbibliothek hergestellt wurde. Zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene wurden anschließend die

30 erhaltenen cDNA-Klone sequenziert und mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen verglichen. Unter den

WG 00/066727

8

PCT/EP00/03552

- dabei annotierten Genen befanden sich 321 unbekannte, zu denen größtenteils ESTs („expressed sequence tags“)-Einträge in der Datenbank existierten. Nach einer weiteren qualitativen PCR-Analyse in cDNA-Bibliotheken vor kritischen Normalgeweben und immunprivilegierten Geweben sowie detaillierteren Datenbankrecherchen wurden die Anzahl der Kandidatenklone auf 56 eingeschränkt, deren ESTs nicht aus kritischen Normalgeweben stammen. Mittels RT-PCR wurde
- 5 festgestellt, daß drei der 56 untersuchten Klone eine Expression hauptsächlich in verschiedenen Tumorgeweben und keine oder geringe Expression in Normalgeweben aufweisen. Der qualitative Vergleich (mittels PCR) der Expression eines der Klone (B99) zwischen Tumor- und
- 10 Normalgewebe zeigte eine Überexpression der B99-cDNA in verschiedenen Tumoren. Das mittels Northern Blot analysierte Expressionsprofil zeigte ergänzend, daß B99 in den untersuchten Normalgeweben keine oder nur eine schwache Transkription aufwies.
- 15 Die humane B99-cDNA wurde kloniert, die erhaltene Sequenz ist in SEQ ID NO:1 dargestellt. Die Sequenzanalyse der klonierten humanen B99-cDNA ergab, daß von Position 427 bis Position 1743 ein durchgehender offener Leserahmen vorliegt, der, auf
- 20 Nukleotid- und Proteinebene, eine hohe Identität mit dem offenen Leserahmen von beta-1,3-Galaktosyl-o-Glykosyl-Glykoprotein beta-1,6-n-Azetyglucosaminyltransferase besitzt. Aus den aus Northern Blot Experimenten gewonnenen Daten ist zu
- 25 schließen, daß das B99-Transkript eine Länge von ca. 3,0 kb hat. Der klonierte Bereich der B99-cDNA beträgt 2216 bp, wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes

WG 00066727

PCT/EP00/03552

9

am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA
in diesem Bereich spricht. Der Unterschied in der Größe
der klonierten B99-cDNA im Vergleich zu der aus der
Northern Blot Analyse ableitbaren Größe läßt sich durch
5 das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes unbekannter
Länge sowie eine zusätzliche Sequenz in 5'-nicht
translatierten Bereich von B99 erklären. Aufgrund der
Tatsache, daß im 5'-Bereich der klonierten cDNA von
Position 0 bis 427 kein durchgehender Leserahmen
10 vorhanden ist, kann gefolgert werden, daß es sich bei
dem ATG an Position 427 um das Startkodon von B99
handelt.

Zusätzliche Information über die weiter stromaufwärts
liegende Sequenz von B99 kann durch
15 molekularbiologische Standardmethoden gewonnen werden,
z.B. mittels 5'-RACE („rapid amplification of cDNA
ends“). Bei dieser Methode wird RNA, vorzugsweise mRNA,
aus Zellen oder Geweben, in denen B99 transkribiert
wird (z.B. Kolonkarzinom-Gewebe oder von
20 Lungenadenokarzinom abgeleitete Zelllinien wie A549)
revers transkribiert und anschließend mit einem Adaptor
bekannter Sequenz ligiert. Eine PCR mit einem
Adaptorprimer (bindet spezifisch an den Adaptor am 5'-
Ende der cDNA) und einem B99-spezifischen Primer (z.B.
25 SEQ ID NO:8, 10, 11) erlaubt die Amplifikation
entsprechender B99-Fragmente. Diese PCR-Produkte
können, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach
Standardmethoden kloniert und, insbesondere durch DNA
Sequenzierung, charakterisiert werden.

30 Eine alternative Methode zur Charakterisierung des
5'-Endes ist das Screenen von cDNA-Bibliotheken durch

WG 00/066727

10

PCT/EP00/03552

Hybridisierung mit für B99 spezifischen DNA-Sonden oder Antisera.

Führt das Screenen von cDNA-Bibliotheken aufgrund methodischer Bedingter Beschränkungen, z.B. ineffiziente reverse Transkription bedingt durch ausgeprägte Sekundärstrukturen der RNA, nicht zum gewünschten Ziel, können genomische Bibliotheken untersucht werden, indem z.B., wie beim Screenen von cDNA-Bibliotheken, durch Hybridisierung mit für B99 spezifischen DNA-Sonden Klone isoliert werden können, die die stromaufwärts vom erhaltenen 5'-Ende der cDNA liegende Sequenzinformation z.B. die Promotorregion von B99 enthalten.

Die isolierte cDNA kodiert für das tumorassoziierte Antigen (TAA) der Bezeichnung B99 mit der in SEQ ID NO:2 angegebenen Aminosäuresequenz (B99-1). Die Sequenz von B99-1 wird definiert durch das Startcodon an Position 427 der isolierten B99-cDNA.

In einem weiteren Versuch zur Klonierung des kodierenden Bereichs von B99, bei dem cDNA aus der Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 verwendet wurde, wurde eine Sequenz ermittelt, die im Vergleich zur in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz eine Insertion eines Nukleotids an Position 923 aufweist (SEQ ID NO:3 bzw. SEQ ID NO:5). Diese Insertion führt zu einer Veränderung des offenen Leserahmens von B99 mit einer daraus resultierenden veränderten Aminosäuresequenz im C-terminalen-Bereich des B99-Proteins; die von diesem Leserahmen abgeleitete Sequenz dieses B99-Antigens (B99-2) ist in SEQ ID NO:4 dargestellt. Außer der Insertion weist die aus A549-Zellen isolierte cDNA

WG 00/066727

II

PCT/EP00/03552

einen Nukleotidaustausch an Position 622 im Vergleich zu Sequenz SEQ ID NO:1 auf. Dieser Nukleotidaustausch bedingt an Position Nr. 66 einen Ersatz von Arginin (SEQ ID NO:2, B99-1) durch Tryptophan (SEQ ID NO:4, B99-2). Abgesehen von diesem Aminosäureaustausch ist die Aminosäuresequenz von B99-2 bis einschließlich Position 166 identisch mit B99-1.

Die Insertion eines Nukleotids an Position 923 ergibt einen zweiten potentieller Leserahmen von Pos. 845 bis 1744 der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz. Ein von einer cDNA mit diesem Leserahmen exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:6 dargestellte Aminosäuresequenz auf (B99-3). Die Sequenz von B99-3 ist von Pcs. 1 bis 27 unterschiedlich zu B99-1 und ab Pcs 28 identisch mit B99-1.

Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung B99, ausgewählt aus der Gruppe von Polypeptiden mit der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 angegebenen Aminosäuresequenz.

Die in SEQ ID NO:2 (B99-1), SEQ ID NO:4 (B99-2) und SEQ ID NO:6 (B99-3) dargestellten Aminosäuresequenzen können Abweichungen aufweisen, z.B. solche, die durch Austausch von Aminosäuren bedingt sind, sofern das B99-Derivat die für die Anwendung in einer Tumorstoffimpfung erwünschten immunogenen Eigenschaften aufweist. (Ein Beispiel für einen B-99-Polymorphismus dieser Art ist der durch die Punktmutation bedingte Unterschied an Position 66 zwischen B99-1 und B99-2).

Im folgenden wird, wenn nicht anders angegeben, die Bezeichnung „B99“ stellvertretend für B99-1, B99-2 und B99-3 verwendet.

Die natürliche Aminosäuresequenz von B99 (bzw. 5 entsprechend die Sequenzen der B99-cDNA) kann gegebenenfalls modifiziert sein, indem einzelne Aminosäuren in einem B99 CTL-Epitop ausgetauscht werden, um, im Vergleich zum natürlichen B99 CTL-Epitop, eine Steigerung der Affinität von B99-Peptiden 10 zu MHC-I-Molekülen und damit eine erhöhte Immunogenität und letztlich eine verstärkte Reaktivität gegenüber Tumoren zu bewirken. Modifikationen im Bereich der B99-Epitope können am B99-Gesamtprotein (dieses wird von den APCs zu den entsprechenden Peptiden prozessiert) 15 bzw. an größeren B99-Proteinfragmenten oder an B99-Peptiden (vgl. unten) vorgenommen werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung immunogene Fragmente und Peptide, die von B99 abgeleitet sind. Letztere werden im folgenden als 20 "B99-Peptide" bezeichnet. Eine erste Gruppe sind B99-Peptide, die eine humorale Immunantwort (Induktion von Antikörpern) auslösen. Derartige Peptide sind ausgewählte Abschnitte von B99 (mindestens 12 bis 15 Aminosäuren), die mittels sogenannter Vorhersage- 25 Algorithmen ("prediction algorithms") wie z.B. dem "surface probability plot" (Emini et al., 1985), dem "hydrophobicity plot" (Kyte and Doolittle, 1982) und dem "antigenic index" (Jameson and Wolf, 1988) ermittelt werden können.

Es ist bekannt, daß tumorassoziierte Antigene tumorspezifische Mutationen aufweisen können, die zu einer immunologischen Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe beitragen (Mandrizzato et al., 1997; Hogan et al., 1998; Caudi et al., 1999; Wölfel et al., 1995).

5 Um das Vorhandensein tumorspezifischer B99-Mutationen festzustellen, wird, zweckmäßig mit Hilfe von Sonden aus der erfindungsgemäßen isolierten cDNA, die B99-cDNA aus einem oder mehreren unterschiedlichen Tumoren kloniert

10 und die erhaltenen Sequenzen mit Normalgewebs-B99-cDNA verglichen. Es ist zu erwarten, daß Tumor-B99-Peptide aus einem gegenüber Normalgewebs-B99 mutierten Sequenzabschnitt im Vergleich zu Normalgewebs-B99-Peptiden aus dem entsprechenden Abschnitt eine

15 verstärkte Immunogenität aufweisen. Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt B99-Peptide, abgeleitet von Bereichen eines tumorexprimierten B99, die tumorspezifische Mutationen aufweisen.

20 Bei der Auswahl von B99-Peptidkandidaten verdienen die Regionen von B99-2 und B99-3, die sich von B99-1 unterscheiden, besonderes Interesse. Unter der Voraussetzung, daß es sich bei der Insertion der B99-DNA, die zu diesen Unterschieden in der

25 Aminosäuresequenz führt, um eine tumorspezifische Mutation handelt, ist nämlich zu erwarten, daß Peptide aus diesem Bereich eine verstärkte Immunogenität im Vergleich zu Peptiden aus B99-1 aufweisen. Um zu bestätigen, daß die Insertion tumorspezifisch ist,

30 können Antikörper gegen diesen Bereich generiert und Tumorzellen auf Expression von B99-2 und B99-3 untersucht werden.

B99-Peptide werden direkt oder in modifizierter Form (z.B. an KLH = "keyhole limpet hemocyanine" gekoppelt) verabreicht und die Bildung von Antikörpern mittels gängiger immunologischer Assays, z.B. mittels ELISA, 5 bestimmt.

Weitere, im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugte, B99-Peptide sind diejenigen, die durch MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort bewirken. Es gibt zwei Klassen von 10 MHC-Molekülen, nämlich MHC-I-Moleküle, die von CD8-positiven CTLs und MHC-II-Moleküle, die von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt werden.

Damit ein Peptid eine zelluläre Immunantwort auslöst, muß es an ein MHC-Molekül binden, wobei der zu 15 behandelnde Patient das MHC-Molekül in seinem Repertoire aufweisen muß. Die Bestimmung des MHC-Subtyps des Patienten stellt somit, im Hinblick auf die Auslösung einer zellulären Immunantwort, eine der wesentlichen Voraussetzungen für die wirksame Anwendung eines 20 Peptids an diesem Patienten dar.

Die Sequenz eines therapeutisch einzusetzenden B99-Peptids wird durch das jeweilige MHC-Molekül hinsichtlich Ankeraminosäuren und Länge vorgegeben. Definierte Ankerpositionen und Länge gewährleisten, daß 25 ein Peptid in die Peptid-Bindungsfurche des jeweiligen MHC-Moleküls des Patienten paßt. Dies hat zur Folge, daß das Immunsystem stimuliert wird und eine zelluläre Immunreaktion erzeugt wird, die sich, im Falle der Verwendung eines von einem Tumorantigen abgeleiteten 30 Peptids, gegen die Tumorzellen des Patienten richtet.

Immurogene B99-Peptide können nach bekannten Methoden identifiziert werden, eine der Grundlagen dafür ist die Beziehung zwischen MHC-Bindung und CTL-Induktion.

Da also die Sequenz immunogener Peptide aufgrund ihres Peptidbindungsmotivs vorherbestimmbar ist, können B99-Peptide, die CTL-Epitope darstellen, aufgrund der B99-Proteinsequenz identifiziert und synthetisiert werden. Dazu sind verschiedene Methoden geeignet, die zur Identifizierung von CTL-Epitopen vor bekannten Protein-Antigenen verwendet wurden; z.B. die von Stauss et al., 1992, für die Identifizierung von T-Zell-Epitopen in humanem Papillomavirus beschriebene Methode.

Die allelspezifischen Anforderungen jedes MHC-I Allel-Produkts an ein Peptid, das an das MHC-Molekül bindet und von diesem präsentiert wird, wurden als Motiv zusammengefaßt (z.B. Falk et al., 1991). Bisher ist eine große Anzahl sowohl von MHC-Peptid-Motiven als auch von MHC-Liganden bekannt. Eine im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Suche nach Epitopen eines bekannten Proteins, das in ein bestimmtes MHC-I-Molekül paßt, wurde in einem Übersichtsartikel von Rammensee et al., 1995, beschrieben. Sie umfaßt die folgenden Schritte: zunächst wird die Protein-Sequenz auf Abschnitte untersucht, die dem Anker-Motiv entsprechen, wobei gewisse Variationen hinsichtlich Peptidlänge und Ankerbesetzung möglich sind. Wenn z.B. ein Motiv ein 9-mer mit Ile oder Leu am Ende vorschreibt, können auch 10-mer mit einem entsprechenden C-Terminus in Betracht gezogen werden, ebenso Peptide mit anderen

aliphatischen Resten, wie Val oder Met am C-Terminus. Auf diese Weise wird eine Reihe von Peptid-Kandidaten erhalten. Diese werden auf das Vorhandensein möglichst vieler Ankerreste, die sie gemeinsam mit bereits

5 bekannten Liganden haben, untersucht und/oder daraufhin, ob sie für verschiedene MHC-Moleküle "bevorzugte" Reste haben (entsprechend der Tabelle von Rammensee et al., 1995). Um schwach bindende Peptide auszuschließen, werden zweckmäßig Bindungs-Assays

10 durchgeführt. Wenn die Anforderungen an die Peptid-Bindung für bestimmte MHC-Moleküle bekannt sind, können die Peptid-Kandidaten auch auf Nicht-Ankerreste untersucht werden, die sich negativ oder positiv auf die Bindung auswirken, oder die diese erst ermöglichen

15 (Ruppert et al., 1993). Bei dieser Vorgangsweise ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß das Peptid-Bindungs-Motiv für die Suche nach natürlichen Liganden nicht allein ausschlaggebend ist; auch andere Aspekte, z.B. die Enzymspezifität während der Antigenprozessierung,

20 tragen - zusätzlich zur Spezifität der MHC-Bindung - zur Identität des Liganden bei. Eine Methode, die diese Aspekte berücksichtigt, und die im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Identifizierung von immunogenen B99-Peptiden geeignet ist, wurde u.a. von

25 Kawakami et al., 1995, angewendet, um auf der Grundlage bekannter HLA-A*0201 Motive gp100 Epitope zu identifizieren.

Die Peptide können auch im Hinblick auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-II-Moleküle ausgewählt werden.

30 Das MHC-II-Bindungsmotiv, das sich über neun Aminosäuren erstreckt, weist einen höheren Grad an Degeneration in den Ankerpositionen auf als das MHC-I-

Bindungsmotiv. Es wurden kürzlich, ausgehend von der Röntgenstrukturanalyse von MHC-II-Molekülen, Methoden entwickelt, die die genaue Analyse der MHC-II-Bindungsmotive, und ausgehend davon, Variationen der Peptidsequenz erlauben (Rammensee et al., 1995, und die dort zitierte Originalliteratur). Peptide, die an MHC-II-Moleküle binden, werden den CD4-T-Zellen typischerweise von dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen präsentiert. Die CD4-T-Zellen wiederum aktivieren dann in der Folge direkt CTLs durch z.B. Cytokine-Ausschüttung und verstärken die Effizienz der Antigen-Präsentation durch APC (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen).

Seit kurzem sind Datenbanken und Vorhersage-Algorithmen verfügbar, die mit großer Verlässlichkeit die Vorhersage von Peptid-Epitopen erlauben, die an ein bestimmtes MHC-Molekül binden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden, unter Verwendung des von Parker et al., 1994 und Rammensee et al., 1995 beschriebenen Algorithmus, für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1, -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tabelle 2 aufgelistet. Auf ähnliche Weise können, gegebenenfalls unter Verwendung weiterer Algorithmen, die den unterschiedlichen Charakteristika der Peptide (Hydrophobizität, Ladung, Größe) bzw. Anforderungen an die Peptide, z.B. die 3D-Struktur des HLA-Moleküls, Rechnung tragen, weitere potentielle

Peptid-Epitope ermittelt werden; dies gilt auch für Peptid-Epitope anderer HLA-Typen.

- Nach Auswahl von B99-Peptid-Kandidaten mit Hilfe der angeführten Methoden wird deren MHC-Bindung mittels
- 5 Peptidbindungs-Assays getestet. Als nächstes wird die Immunogenität der Peptide mit guten Bindungseigenschaften bestimmt (Stabilität der Peptid-MHC-Wechselwirkung korreliert in den meisten Fällen mit Immunogenität; van der Burg et al., 1996). Um die
- 10 Immunogenität des ausgewählten Peptids oder Peptid-Äquivalents zu bestimmen, können Methoden, wie z.B. von Sette et al., 1994, beschrieben, in Kombination mit quantitativen MHC-Bindungs-Assays verwendet werden. Alternativ kann die Immunogenität des ausgewählten
- 15 Peptids über *in vitro* CTL-Induktion mittels bekannter Methoden (wie weiter unten für *ex vivo* CTL-Induktion beschrieben) getestet werden. Das Prinzip der in mehreren Schritten durchgeführten Methode für die Auswahl von Peptiden, die zur Auslösung einer
- 20 zellulären Immunantwort fähig sind, ist in der WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, beschrieben. Eine allgemeine Strategie zum Erhalt effizienter immunogener Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wurde außerdem von Schweighoffer, 1997, beschrieben.

- Statt die Originalpeptide zu verwenden, die in die Bindungsfurche von MHC-I -oder MHC-II-Molekülen passen, also Peptide, die unverändert von B99 abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der
- 30 Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge Variationen

- vorgenommen werden, sofern durch diese Variationen die effektive Immunogenität des Peptids, die sich zusammensetzt aus seiner Bindungsaffinität an das MHC-Molekül und seiner Fähigkeit, T-Zell-Rezeptoren zu
- 5 stimulieren, nicht nur nicht beeinträchtigt ist, sondern vorzugsweise verstärkt wird. In diesem Fall werden also künstliche Peptide oder Peptid-Äquivalente verwendet, die entsprechend den Anforderungen der Bindungsfähigkeit an ein MHC-Molekül entworfen sind.
- 10 Solchermaßen veränderte Peptide werden als „heteroclitische Peptide“ bezeichnet. Sie können nach folgenden Methoden erhalten werden:
- Zunächst werden die Epitope von MHC-I- bzw. MHC-II-Liganden bzw. deren Variation z.B. nach dem von
- 15 Rammensee et al., 1995, beschriebenen Prinzip vorgenommen. Die Länge des Peptids entspricht im Falle seiner Abstimmung auf MHC-I Moleküle vorzugsweise einer Minimalssequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeraminosäuren.
- 20 Gegebenenfalls kann das Peptid auch am C- und/oder am N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung die Bindungsfähigkeit an das MHC-Molekül nicht beeinträchtigt bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalssequenz zellulär prozessiert werden kann.
- 25 Die modifizierten Peptide werden daraufhin auf ihre Erkennung durch TILs („tumor-infiltrating lymphocytes“), auf CTL-Induktion sowie auf verstärkte MHC-Bindung und Immunogenität geprüft, wie von Parkhurst et al., 1996, und Becker et al., 1997,
- 30 beschrieben.

Eine weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Auffindung von Peptiden mit stärkerer Immunogenität als die der natürlichen B99-Peptide besteht im Screenen von Peptid-Bibliotheken mit CTLs, die die natürlich auf Tumoren vorkommenden B99-Peptide erkennen, wie von Blake et al., 1996, beschrieben; in diesem Zusammenhang wird die Verwendung kombinatorischer Peptid-Bibliotheken vorgeschlagen, um Moleküle zu entwerfen, welche von MHC-I-restringierten CTLs erkannte Tumorepitope nachahmen.

Die B99-Polypeptide der vorliegenden Erfindung oder davon abgeleitete immunogene Fragmente oder Peptide können rekombinant oder mittels Peptid-Synthese hergestellt werden, wie in der WO 96/10413 beschrieben, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Für die rekombinante Herstellung wird das entsprechende DNA-Molekül nach Standardmethoden in einen Expressionsvektor eingefügt, in eine geeignete Wirtszelle transfiziert, der Wirt unter geeigneten Expressionsbedingungen kultiviert und das Protein gereinigt. Für die chemische Synthese von B99-Peptiden können herkömmliche Methoden verwendet werden, z.B. im Handel erhältliche automatische Peptid-Synthesizer.

Alternativ zu natürlichen B99-Peptiden oder heteroclitischen Peptiden können Substanzen, die solche Peptide vortäuschen, z.B. "Peptidomimetica" oder "retro-inverse-Peptide", verwendet werden. Zur Testung dieser Moleküle im Hinblick auf die therapeutische Verwendbarkeit in einer Tumorstoffimpfung werden dieselben Methoden angewendet wie oben für die natürlichen B99-Peptide oder B99-Peptidäquivalente.

Das TAA der Bezeichnung B99 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z.B. um
5 eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von B99-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim
10 Nierenzell-, Lungen-, Kolon-, Pankreas-, Brust- und Magenkarzinom.

Die Immunantwort in Form einer Induktion von CTLs kann *in vivo* oder *ex vivo* bewirkt werden.

Für die *in vivo* Induktion von CTLs wird eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als wirksame
15 Komponente das TAA B99 bzw. davon abgeleitete Fragmente oder Peptid(e), einem Patienten verabreicht, der an einer mit dem TAA assoziierten Tumorerkrankung leidet, wobei die Menge an TAA(Peptid) ausreichen muß, um eine wirksame CTL-Antwort auf den Antigen-tragenden Tumor zu
20 erzielen.

Die Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung. Vorzugsweise dient die Zusammensetzung der parenteralen
25 Verabreichung, z.B. für die subkutane, intradermale oder intramuskuläre Anwendung. Die B99-TAAs/Peptide sind in einem pharmazeutisch annehmbaren, vorzugsweise wässrigen, Träger gelöst oder suspendiert. Die Zusammensetzung kann außerdem übliche Hilfsstoffe, wie
30 Puffer, etc. enthalten. Die TAAs/Peptide können allein

- oder in Kombination mit Adjuvantien, z.B. inkomplettem Freund's Adjuvans, Saponinen, Aluminiumsalzen oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, Polykationen wie Polyarginin oder Polylysin, verwendet werden. Die
- 5 Peptide können auch an Komponenten, die die CTL-Induktion oder CTL-Aktivierung unterstützen, gebunden werden, z.B. an T-Helferpeptide, Lipide oder Liposomen, oder sie werden gemeinsam mit diesen
- 10 Substanzen und/oder gemeinsam mit immunstimulierenden Substanzen, z.B. Zytokinen (IL-2, IFN- γ) verabreicht. Methoden und Formulierungen, die zur Herstellung und Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen
- 15 Zusammensetzung geeignet sind, sind in der WO 95/04542 und WO 97/39721, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird, beschrieben.
- B99(Fragmente) bzw. B99-Peptide können auch verwendet werden, um eine CTL-Antwort ex vivo auszulösen. Eine ex vivo CTL-Antwort auf einen Tumor, der B99 exprimiert, wird induziert, indem man die CTL-Vorläuferzellen
- 20 zusammen mit APCs und B99-Peptiden bzw B99-Protein inkubiert. Dann läßt man die aktivierten CTLs expandieren, worauf sie dem Patienten wieder verabreicht werden. Alternativ können APCs mit B99-Peptiden beladen werden, was zu einer effizienten Aktivierung zellulärer
- 25 Immunreaktionen gegen B99 positive Tumoren führen kann (Mayordomo et al., 1995; Zitvogel et al., 1996). Eine geeignete Methode um Peptide auf Zellen, z.B. dendritische Zellen, zu laden, wird in der WO 97/19169 geoffenbart.
- 30 In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination mehrerer verschiedener B99-Peptide oder

- B99-Peptidäquivalente angewendet. In einer weiteren Ausführungsform werden B99-Peptide mit von anderen TAAs abgeleiteten Peptiden kombiniert. Die Auswahl von Peptiden für derartige Kombinationen wird im Hinblick
- 5 auf die Erfassung unterschiedlicher MHC-Typen getroffen, um eine möglichst breite Patientenpopulation abzudecken, und/oder sie wird auf ein möglichst breites Indikationsspektrum abgestellt, indem Peptide mehrerer unterschiedlicher Tumorantigene kombiniert werden. Die
- 10 Anzahl der Peptide in einer pharmazeutischen Zusammensetzung kann über einen weiten Bereich schwanken, typischerweise enthält eine klinisch anwendbare Vakzine 1 bis 15, vorzugsweise 3 bis 10 verschiedene Peptide.
- 15 Die erfindungsgemäßen Peptide können auch als diagnostische Reagentien eingesetzt werden. Beispielsweise können die Peptide dazu benutzt werden, um das Ansprechen eines Patienten auf die durch das immunogene Peptid hervorgerufene humorale oder zelluläre
- 20 Immunantwort zu testen. Dadurch besteht die Möglichkeit, ein Behandlungsprotokoll zu verbessern. Beispielsweise kann in Abhängigkeit der Darreichungsform (Peptid, Gesamtprotein oder DNA-Vakzine) des TAA die Zunahme von Vorläufer T-Zellen in den PBLs, die eine Reaktivität
- 25 gegen das definierte Peptidepitop aufweisen, untersucht werden (Robbins und Kawakami, 1996 sowie darin zitierte Referenzen). Außerdem können die Peptide oder das Gesamtprotein bzw. gegen das TAA gerichtete Antikörper dazu verwendet werden, um den Krankheitsverlauf eines
- 30 B99-positiven Tumors zu charakterisieren (z.B. durch immunhistochemische Analysen von Primärtumor und Metastasen). Eine derartige Strategie hat sich schon

- mehrfach als erfolgreich erwiesen, z.B. der Nachweis des Östrogenrezeptors als Entscheidungsgrundlage zur Endokrintherapie bei Brustkrebs; c-erbB-2 als relevanter Marker bei Prognostik und Therapieverlauf bei Brustkrebs
- 5 (Ravaioli et al., 1998; Revillion et al., 1998); PSMA ("prostate specific membrane antigen") als Marker für Epithelialzellen des Prostatakarzinoms im Serum bzw. durch Einsatz eines ¹¹¹In-markierten monoklonalen Antikörpers gegen PSMA bei der Immunoszintigraphie auf
- 10 Prostatakarzinom (Murphy et al., 1998 und inkludierte Referenzen); CEA ("carcinoembryonic antigen") als serologischer Marker für die Prognose und Verlauf bei Patienten des kolorektalen Karzinoms (Jessup und Joda, 1998).
- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt isolierte DNA-Moleküle, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften von B99 oder für Fragmente davon.

In einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein

20 isoliertes DNA-Molekül, das ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz enthält oder das ein Polynukleotid enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

- 25 Unter „stringenten Bedingungen“ wird z.B. verstanden: Inkubation über Nacht bei 65°C - 68°C mit 6xSSC (1x SSC = 150 mM NaCl, 15mM Tri-Natriumcitrat), 5xDenhardt's Lösung, 0.2%SDS, 50 µg/ml Lachsspermien-DNA, daran anschließend Waschen zweimal 30 min mit
- 30 2xSSC, 0.1% SDS bei 65°C, einmal 30 min mit 0.2xSSC,

0.1% SDS bei 65°C und gegebenenfalls abschließendes Spülen mit 0.1xSSC, 0.1%SDS bei 65°C, oder äquivalente Bedingungen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende
5 Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, das ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz enthält oder das ein Polynukleotid enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz
10 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle bzw. Fragmente davon kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung B99 (B99-1, B99-2 oder B99-3) mit der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz bzw.
15 für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind DNA Moleküle mitumfaßt, die durch die Degeneration des genetischen Codes Abweichungen von der in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 bzw. SEQ ID NO:5 dargestellten Sequenz aufweisen.

20 Die Erfindung betrifft auch DNA-Moleküle, die durch konservativen Austausch von Aminosäuren bedingte Abweichungen von der in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz aufweisen, sofern sie für ein B99-Derivat bzw. Fragmente oder
25 Peptide mit den für die Anwendung als Tumorstoffen erwünschten immunogenen Eigenschaften kodieren.

Im folgenden werden die oben definierten, gegebenenfalls modifizierten, für B99-1, B99-2 bzw. B99-3 bzw. für Fragmente davon kodierenden DNA-

Moleküle, wenn nicht anderes angegeben, als „B99-DNA-Moleküle“ bezeichnet.

Die B99-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung oder die entsprechenden RNAs, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, werden, wie die davon kodierte(n) (Poly)Peptide, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen eingesetzt.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden DNA-Moleküle, kodierend für natürliche B99-Polypeptide verwendet. Alternativ zur natürlichen B99-cDNA bzw. Fragmenten davon können modifizierte Derivate verwendet werden. Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen, die für ein Protein(fragment) bzw. Peptide mit stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen gelten wie für die oben beschriebenen Peptide. Eine weitere Art der Modifikation ist die Aneinanderreihung zahlreicher Sequenzen, kodierend für immunologisch relevante Peptide, nach Art einer Perlschnur ("string-of-beads"; Toes et al., 1997). Die Sequenzen können auch durch Anfügung von Hilfselementen modifiziert werden, z.B. Funktionen, die eine effizientere Abgabe und Prozessierung des Immunogens gewährleisten (Wu et al., 1995). Beispielsweise kann durch Anfügen einer Lokalisierungssequenz in das endoplasmatische Retikulum ("ER targeting sequence") die Prozessierung und damit die Präsentation und letztlich die Immunogenität des Antigen erhöht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein rekombinantes DNA-Molekül, das B99-DNA enthält.

Die B99-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung können, vorzugsweise in rekombinanter Form als Plasmide, direkt oder als Bestandteil eines rekombinanten Virus, oder Bakteriums verabreicht werden. Prinzipiell kann jede gentherapeutische Methode für die Immuntherapie von Krebs auf Basis von DNA ("DNA-Vakzine") auf B99-DNA angewendet werden, und zwar sowohl *in vivo* als auch *ex vivo*.

Beispiele für die *in vivo* Verabreichung sind die direkte Injektion von "nackter" DNA, entweder intramuskulär oder mittels Gen-Pistole ("gene gun") von der sich gezeigt hat, daß sie zur Bildung von CTLs gegen Tumorantigene führt. Beispiele für rekombinante Organismen sind Vaccinia Virus, Adenovirus oder *Listeria monocytogenes* (eine Übersicht wurde von Coulie, 1997, gegeben). Desweiteren können synthetische Träger für Nukleinsäuren, wie kationische Lipide, Mikrosphären, Mikrokügelchen oder Liposomen für die *in vivo* Verabreichung von Nukleinsäure-Molekülen, kodierend für B99-Peptid verwendet werden. Ähnlich wie für Peptide können verschiedene Hilfsstoffe, die die Immunantwort verstärken, mitverabreicht werden, z.B. Zytokine, entweder in Form von Proteinen oder dafür kodierenden Plasmiden. Die Applikation kann gegebenenfalls mit physikalischen Methoden, z.B. Elektroporation, kombiniert werden.

Ein Beispiel für die ex vivo Verabreichung ist die Transfektion dendritischer Zellen, wie von Tuting, 1997, beschrieben, oder anderer APCs, die als zelluläre Krebsvakzine zur Anwendung kommen.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt die Verwendung von Zellen, die B99 exprimieren, entweder von sich aus oder, in gegebenenfalls modifizierter Form, nach Transfektion mit der entsprechend kodierenden Sequenz, für die
10 Herstellung einer Krebsvakzine.

- Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Antikörper gegen B99 bzw. Fragmente davon. Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren, insbesondere Kaninchen,
15 mittels Injektion des Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

- Monoklonale anti-B99-Antikörper können nach Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein,
20 1975, beschriebenen Prinzip gewonnen werden, indem Tiere, insbesondere Mäuse, immunisiert, anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere immortalisiert werden, z.B. durch Fusion mit Myelomzellen, und der Überstand der erhaltenen
25 Hybridome mittels immunologischer Standard-Assays auf monoklonale anti-B99-Antikörper gescreent wird. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf herkömmliche Weise chimisiert (Neuberger et al.,

1984, Boulianne et al., 1984) oder humanisiert (Riechmann et al., 1988, Graziano et al., 1995) werden.

Humane monoklonale anti-B99-Antikörper(fragmente) können auch von sog. „Phage Display Libraries“ (Winter et al., 1994, Griffiths et al., 1994, Kruif et al., 1995, Mc Guinness et al., 1996) und mittels transgener Tiere (Brüggemann et al., 1996, Jakobovits et al., 1995) gewonnen werden.

Die erfindungsgemäßen anti-B99-Antikörper können in immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von B99-spezifischen Antikörpern, um beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu bringen, der B99 exprimiert. Beispiele für solche Substanzen sind zytotoxische Agentien oder radioaktive Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor vorort zu schädigen. Aufgrund der tumorspezifischen Expression von B99 sind dabei keine oder nur geringe Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt können mit Hilfe von B99-Antikörpern Substanzen zur Sichtbarmachung von Tumoren, die B99 exprimieren, herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen.

Therapeutische und diagnostische Anwendungen von Antikörpern, die für anti-B99-Antikörper in Frage kommen, sind in der WO 95/33771 für beschrieben.

Das TAA der Bezeichnung B99 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika

können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von B99-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Nierenzell-, Lungen-, Kolon-, Pankreas-, Brust- und Magenkarzinom.

Auf Grund der bevorzugten Expression von B99 in Tumorzellen kann angenommen werden, daß dieses Protein eine wichtige Funktion für den Tumor hat, z.B. für Entstehung, Infiltration und Wachstum. B99(DNA) kann daher in Screening-Assays verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die die Aktivität dieses Proteins modulieren, insbesondere inhibieren. In einer Ausführungsform kann ein derartiger Assay darin bestehen, das B99 Protein, oder ein aktives Fragment davon, in Zellen, die auf die Aktivität von B99 mit Proliferation reagieren, einzubringen bzw. die entsprechende B99 DNA in der Zelle zur Expression zu bringen, und die Proliferation der Zellen in Gegenwart und in Abwesenheit einer Testsubstanz zu bestimmen. Substanzen mit proliferationshemmender Wirkung können zur Behandlung von Tumoren mit starker B99-Expression verwendet werden, insbesondere beim Nierenzell-, Lungen-, Kolon- und Mammakarzinom sowie beim Hodgkin-Lymphom.

WO 00/066727

JI

PCT/EP00/03552

Figurenübersicht

- Fig. 1: RT-PCR Analyse von cDNA-Pools verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern
- 5 Fig. 2: RT-PCR Analyse von individuellen cDNAs verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern
- Fig. 3: Transkription von B99 in Normalgeweben: Northern Blot Analyse von mRNA aus 16 Normalgeweben
- 10 Fig. 4: Immunhistochemische Analyse von vier verschiedenen Fällen von Adenokarzinomen mit B99-Serum
- Fig. 5: MHC Stabilisierung auf T2-Zellen mittels verschiedenen Konzentrationen von B99-Peptiden

15

Beispiel 1

- RDA („Representational Difference Analysis“) von der humanen Adenokarzinomzelllinie der Lunge (A549) und normalem Lungengewebe
- 20 Die von ATCC bezogene humane Lungadenokarzinom-Zelllinie A549 (CCL 185) wurde in T150 Zellkulturflaschen hochgezüchtet. Als Nährmedium diente MEM mit 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kalberserum und 2 mM L-Glutamin. Alle 3 bis 4 Tage wurden die
- 25 Zellen durch Trypsinisieren 1:5 bis 1:10 zur Propagation gespalten. Nach Erreichen von etwa

- 80% Konfluenz wurden pro T150 Zellkulturflasche 4 ml einer Trypsinlösung (Angaben pro Liter: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,13g Na₂HPO₄-wasserfrei, 0,2g KH₂PO₄, 100ml 2,5% Trypsinlösung, 1g EDTA-Na-Salz; pH7,2-7,4)
- 5 zum Ernten der Zellen eingesetzt. Die 4 ml wurden in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert, mit 8 ml PBS versetzt, bei 1200 rpm in einer Eacres Tischzentrifuge (Megafuge 2.0R) 5 min bei 4°C zentrifugiert, das Zellpellet mit 1 ml Lysis-Puffer (10mM TrisHCl pH8, 140mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% NP40) versetzt, kräftig geschüttelt und in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 12 000 rpm und 4°C 5 min in einer Sigma Tischzentrifuge (Sigma 202 MK) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und nach Zusatz
- 15 von 55 µl 20% SDS-Lösung zweimal mit dem doppelten Volumen an einer CHCl₃/Phenol (1:1 v/v) Mischung und einmal mit dem einfachen Volumen an CHCl₃ extrahiert. Die wässrige RNA-enhaltende Phase wurde mit 1/10 Volumen an 3M NaAc (pH5) und dem zweifachen
- 20 Volumen an 96% EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C die RNA präzipitiert. Ausgehend von 1 mg total-RNA wurde für die Isolierung von poly-A(+)RNA mittels des PolyATtract Kit (Promega) entsprechend dem Herstellerprotokoll vergangen. Die Lagerung der A549 poly-
- 25 A(+)RNA mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DEPC-behandeltem H₂O erfolgte in Aliquots bei -80°C.

- Zur Durchführung der repräsentativen Differenzanalyse (RDA; Hubank and Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) wurde die poly-A(+)RNA der Lungenadenokarzinom-Zelllinie
- 30 A549 als „tester“, die von normalem Lungengewebe (1 mg/ml; Clontech, Palo Alto; #6524-1) als „driver“ eingesetzt. Die RDA wurde unter Verwendung des PCR-

select™ kit (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt mit der Ausnahme, daß ein modifiziertes Primer/Adaptor-2-Oligonukleotidsystem mit folgender Sequenz zum Einsatz kam:

5 5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTACCGAGCTCCAG-3'
(Adaptor-2-alt-1; SEQ ID NO:19),
5'-AGGGCGTGGTACCGAGCTCCAG-3' (nested-PCR-primer-2-alt;
SEQ ID NO:20) und 5'-GGCTCGAGTTC-3' (Adaptor-2-alt-2;
SEQ ID NO:21). Die neu generierten Primer/Adaptor-
10 Sequenzen ermöglichen durch die Anwesenheit von drei
neuen Restriktionsenzymstellen (Kpn I, Sac I und
Xho I) in der Sequenz des nested-PCR-primer-2-alt nach
Klonierung der subtrahierten cDNA-Fragmente in den
pPCRII-Vektor ein nachträgliches Herausschneiden der
15 jeweiligen cDNA-Fragmente. Das Design einer
Primer/Adaptorsequenz mit mehreren verfügbaren
Restriktionsenzymstellen war deshalb notwendig,
weil besonders in den Primersequenzen - bedingt durch
die PCR-Amplifikationsschritte - oft Punktmutationen zu
20 beobachten waren.

Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA mittels
oligo-dT wurde die erhaltene cDNA von „tester“ und
„driver“ mit *RsaI* verdaut (*RsaI* ist ein 4-Basen
erkennendes Restriktionsenzym und liefert im
25 statistischen Mittel 256 bp lange cDNA-Fragmente).
Gleiche Teile von „tester-cDNA“ wurden entweder mit den
Adaptoren 1 oder 2 ligiert und anschließend getrennt
mit einem Überschuß an „driver-cDNA“ bei 65°C
hybridisiert. Danach wurden die beiden Ansätze vereinigt
30 und einer zweiten Hybridisierung mit frischer
denaturierter „driver-cDNA“ unterworfen. Die
angereicherten „tester“-spezifischen cDNAs wurden

anschließend durch PCR mit für die Adaptoren 1 bzw. 2
spezifischer Primern exponentiell amplifiziert. Für
eine weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser
Reaktion einer zweiten PCR mit spezifischen nach innen
5 versetzten („nested“) Primern unterworfen. Die aus
dieser Reaktion resultierenden, exponentiell
amplifizierten cDNA-Fragmente wurden direkt in den
pCRII-Vektor (Invitrogen; „TA-cloning vector“) ligiert
und anschließend ein Drittel des Ligationsansatzes in
10 kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transfiziert.

712 positive Transformanten (Blau-Weiß-Selektion)
wurden erhalten und in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium
(1,3 ml pro Napf) für 48 h bei 37°C kultiviert. Pro Napf
15 wurden 750 µl der *E. coli* Suspensionen für die
Präparation der Plasmid-DNA eingesetzt (96-Napf-
Minipräparationsmethode von QIAGEN nach Vorschrift des
Herstellers). Die verbleibenden Bakterienkulturen
wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

20 Es wurde eine aus 712 Einzelklonen bestehende cDNA-
Subtraktionsbibliothek erhalten, die sowohl in Form von
E. coli Glycerin-Stammkulturen als auch in Form
gereinigter Plasmide vorlag.

25 Beispiel 2

DNA-Sequenzierung und Annotation von TAA-Kandidaten

Die isolierte Plasmid-DNA sämtlicher 712 Klone (siehe
Beispiel 1) wurde nach der Sanger-Methode auf einem
ABI-Prism Gerät sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen

wurden mittels der BioScout-Software (LION, Heidelberg) annotiert und Datenbankvergleichen (Genbank) unterzogen. Von 712 Klonen konnten 678 sequenziert und annotiert werden. Der Rest (34) wies als Insert

5 entweder nur poly(A) Sequenzen auf oder entsprach einem religierten Vektor oder war nicht sequenzierbar. Von den 678 annotierbaren Sequenzen erwiesen sich 357 als Gene mit bekannter Funktion. Die restlichen 321 repräsentierten Klone, kodierend für Gene mit

10 unbekannter Funktion; 59 davon wiesen nicht einmal Einträge in der humanen EST-Datenbank auf. Bekannte Gene wurden nicht weiter behandelt. Für jene unbekannteren Gene, für die ein EST-Eintrag verfügbar war, wurde eine Abschätzung des Expressionsprofils

15 vorgenommen: dabei wurden alle jene ESTs mit > 95% Identität (BLAST), die zur entsprechend experimentell ermittelten Sequenz der Subtraktionsbibliotheken gehörten, überprüft. Bei der Annotation wurde eine Unterteilung in i) kritische Normalgewebe, ii) foetale,

20 „verzichtbare“ und immunprivilegierte Gewebe und iii) Tumore und Tumor-Zelllinien vorgenommen. Auf der Basis dieses „virtuellen mRNA-Profiles“ wurden 200 Klone, für die keine ESTs in der Gruppe i) gefunden wurden, für weitere experimentelle Analysen ausgewählt

25 (inklusive der 59 Klone, für die keine EST-Eintragung vorlag). Zur weiteren Einengung der Kandidatenklone wurden aus den von den 200 ausgewählten Klonen ermittelten Sequenzen Oligonukleotidprimerpaare entworfen und synthetisiert. Es wurden zunächst

30 8 verschiedene, von humanem Gewebe abgeleitete cDNA-Bibliotheken (GibcoBRL „SUPERSCRIPTTM“), welche directional in pCMV-SPORT kloniert sind, mittels

qualitativer PCR auf das Vorhandensein der jeweiligen Kandidaten getestet. Die dabei eingesetzten cDNA-Bibliotheken stammten aus Gewebe von Herz (#10419-018), Leber (#10422-012), Leukozyten (#10421-022), Niere 5 (#10420-016), Lunge (#10424-018), Testis (#10426-013), Gehirn (#10418-010) und fötalem Gehirn (#10662-013). Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 20 µl Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz enthielten 1x TaqPol-Puffer (50mM KCl, 10 mM TrisHCl pH9, 0,1% Triton X-100), 10 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Promega), 0,025 U/µl Taq-ENA-Polymerase (Promega), jeweils 5 pM an spezifischen Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:8 und 100 ng der jeweils zu untersuchenden Plasmid-DNA. Zur Kontrolle wurden spezifische Primer für GAPDH 15 (SEQ ID NO:14 und 15) eingesetzt. Zur Überprüfung des selektiven Nachweises wurden die Primerpaare parallel auch auf das isolierte Plasmid hin ausgetestet. Die Nachweisbarkeit von Fragmenten der zu erwartenden Länge in einem der kritischen Normalgewebe (Herz, Leber, 20 Lunge, Niere und Leukozyten), nicht jedoch in den cDNA-Bibliotheken aus immunprivilegierten Geweben (Gehirn, fötales Gehirn und Testis) unter diesen PCR-Bedingungen (1 Zyklus: 3' 94°C; 35 Zyklen: 1' 94°C - 1' 55°C - 1' 72°C; 1 Zyklus: 7' 72°C) wurde als 25 Ausscheidungskriterium definiert. Mittels dieser qualitativen PCR-Analyse konnte die Zahl der Kandidaten auf 56 eingeengt werden.

WG 00/066727

37

PCT/EP00/03552

Beispiel 3

Transkriptionelle Analyse der Kandidaten-Klone in
verschiedenen Tumor- und Normalgeweben

Für die RT-PCR Analyse wurden cDNA-Pools verwendet die
5 aus je 3 µg total-RNA von 3 verschiedenen Geweben des
gleichen Typs hergestellt wurden. Die 9 µg total-RNA
pro Gewebepool aus Tumor- oder Normalgeweben wurden
mittels AMV-RT (Promega) entsprechend der
Herstellerempfehlung revers transkribiert. Zur
10 Vermeidung von Kontaminationen mit genomischer DNA
wurde die RNA vorher mit DNase I (Boehringer Mannheim)
inkubiert. Qualität und Menge der cDNAs wurde durch PCR
mit GAPDH spezifischen Primern (SEQ ID NO:14 und 15)
nach 20 Zyklen (30'' 95°C, 90'' 60°C) überprüft.
15 B99-cDNA wurde durch 25, 30 und 35 Zyklen des Programms
1' 95°C, 1' 55°C, 1' 72°C mit den B99-spezifischen
Primern gemäß SEQ ID NO:7 und 8 amplifiziert. Analog
wurden die anderen 55 Kandidaten-Klone mit jeweils
spezifischen Primern untersucht. Die PCR Produkte
20 wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und
Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Für 3 der 56
untersuchten Klone konnte mittels RT-PCR eine vermehrte
Expression in verschiedenen Tumorgeweben im Vergleich
zu Normalgeweben gezeigt werden. Ein Beispiel für
25 Kandidat B99 ist in Fig. 1 gezeigt: Die RT-PCR Analyse
von cDNA-Pools verschiedener humaner Tumor- und
Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern ergab ein
starkes Signal im Kolonkarzinom und in der Lungenadeno-
Karzinomlinie A549 sowie ein schwaches Signal im
30 Brustkarzinom und im Nierenzellkarzinom. Von allen
untersuchten Normalgeweben war ein schwaches Signal nur

in Kolongewebe feststellbar. Im weiteren Verlauf wurde der Kandidat B99 genauer evaluiert.

Beispiel 4

5 Expressionsprofil von B99 in Tumor- und Normalgeweben

Einer der 56 Kandidaten (Bezeichnung: B99) zeigte mittels RT-PCR Transkription in 3 von 5 getesteten Tumorgewebe-Pools ein Signal. In den meisten getesteten Normalgeweben konnte hingegen keine Transkription
10 festgestellt werden.

Für eine detaillierte Untersuchung der B99-Expression wurden im folgenden cDNAs individueller Tumor- und Normalgewebeprobe mittels PCR analysiert. Dabei zeigte sich, daß die Mehrzahl aller untersuchten
15 Kolonkarzinome (17/ 23), alle Pankreaskarzinome (3/ 3) und alle Magenkarzinome (4/4) B99 exprimieren. In entsprechenden Normalgeweben wurde eine Expression in 1/ 4, 0/ 3 bzw. 2/ 4 Fällen nachgewiesen. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt, Fig. 2
20 zeigt exemplarische Ergebnisse für Pankreas- und Kolongewebe: Mittels RT-PCR Analyse von individuellen cDNAs verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern konnte in 6 von 7
Tumorproben B99-cDNA nachgewiesen werden, während nur
25 eines der untersuchten Normalgewebe (1/ 6) eine schwache Expression von B99 zeigte.

Tabelle 1:

Tumorgewebe		Normalgewebe	
Typ	Positive Fälle/ getestete Fälle	Typ	Positive Fälle/ getestete Fälle
Kolonkarzinom	1/1 23	Kolon	1/4
Leberkarzinom	0/3	Leber	0/4
Lungenkarzinom	2/3	Lunge	0/4
Mammakarzinom	0/10	n.d.	
Pankreas- karzinom	3/3	Pankreas	0/4
Nierenzell- karzinom	1/10	Niere	0/4
Magenkarzinom	4/4	Magen	2/4
		Lymphozyten	0/1
		Dünndarm	1/1
		Ovar	0/1
		Testis	0/4
		Prostata	0/1
		Thymus	0/1
		Milz	0/4
		Muskel	0/1
		Gehirn	0/1
		Herz	0/4

Für die Northern Blot Analyse wurden Human Multiple Tissue Northern blots (Clontech, Palo Alto) mit dem

[α -³²P]dCTP (NEN, Boston) markierten 271 bp B99 PCR Produkt bei 65° für 16 h hybridisiert. Die Visualisierung erfolgte durch Standard-Autoradiografie (Xomat AR film, Kodak) und Exposition auf einen

5 Phosphorimager (Molecular Dynamics). Fig. 3 zeigt das Ergebnis dieser Analyse von 16 Normalgeweben. Dabei zeigte sich lediglich in Kolon und deutlich schwächer in Duodenum ein Transkript von ~3,0 kb Größe. Die geringe Intensität des Signals läßt jedoch eine

10 immunologisch relevante Expression als unwahrscheinlich erscheinen.

Das Ergebnis aller Versuche bezüglich des mRNA-Profiles von B99 (kompiliert aus RT-PCR und Northern Blot Analyse) ist in Tab. 1 zusammengefaßt. Beispiel 4

15 zeigt, daß B99 in einem hohen Prozentsatz von Tumoren verschiedener Indikationen deutlich transkribiert wird, während in allen untersuchten Normalgeweben keine oder nur vereinzelte Transkription gefunden wurde.

Beispiel 5: Nachweis der Proteinexpression von B99 im

20 humanen Tumoren

Zum Nachweis der Proteinexpression von B99 wurden B99-spezifische Antikörper in Kaninchen generiert. Zum Immunisieren wurde das bakterielle Fusionsprotein pGEX-CRP2-1/1 verwendet (Position 1278 bis 1740 SEQ ID No:1)

25 verwendet, das erhaltene Serum wurde mittels Peptid B99-KML (SEQ ID NO:61) affinitätsgereinigt. Zur Überprüfung der spezifischen Reaktivität des Serums wurde der gesamte Leserahmen von B99 als GFP-Fusionsprotein transient in COS-Zellen exprimiert und

30 die transfizierten Zellen im Western-Blot mit dem Serum

B99-NKF getestet. Dabei zeigte sich, daß das Serum deutlich mit dem exprimierten B99 Fusionsprotein reagiert. In weiterer Folge wurden 56 Proben von verschiedenen Tumortypen immunhistochemisch mit dem Serum B99-NKF auf B99 Expression hin analysiert (Tabelle 2). Dabei zeigte sich in 53 Fällen eine Expression von B99 in den Tumorzellen. Beispiele sind in Fig. 4 zu sehen, die die immunhistochemische Analyse von vier verschiedenen Fällen von Adenokarzinomen zeigt (a: Kolon, b: Brust; c: Pankreas; d: Magen). In allen Fällen ist eine deutliche Anfärbung der Tumorzellen zu sehen, während Bindegewebe und Gefäße keine Anfärbung zeigen. In Fig. 4a kann man weiterhin sehen, daß residuale normale Kolormukosa keine Reaktivität mit dem Antikörper zeigt. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin. Die positive Reaktivität in der Immunhistochemie wurde in einer Auswahl der Fälle mittels RT-PCR auch auf RNA-Ebene bestätigt. Dabei lieferten auch Brusttumoren ein positives PCR-Signal. Dieser gegenüber Beispiel 4 unterschiedliche Befund kann durch die Verwendung anderer PCR-Primer als in Beispiel 4 erklärt werden.

Tabelle 2

Tumortyp	positive Fälle/ getestete Fälle
Brust Adenokarzinom	8/ 8
Kolon Adenokarzinom	10/ 11
Lunge Adenokarzinom	7/ 8
Junge Plattenepithelkarzinom	8/ 8
Pankreas Adenokarzinom	11/ 12
Magen Adenokarzinom	9/ 9

Beispiel 6

5 Klonierung von B99

Klon B99 besitzt zwischen den durch die RDA eingeführten Adaptoren ein 271 bp langes Insert eines unbekanntes humanen Gens. Zur vollständigen Klonierung der humanen Sequenz wurde wie folgt vorgegangen: eine

10 UniGene Analyse (National Center for Biotechnology Information) ergab folgende zu B99 homologe ESTs: AA315469, AA345780, AA295520. Mit Hilfe dieser ESTs konnte die B99 Sequenz auf 439 Nukleotide verlängert werden. Neue Primer innerhalb dieser Sequenz wurden

15 synthetisiert (SEQ ID NO:9 bis 12). Durch PCR mit verschiedenen Kombinationen dieser Primer konnten die jeweiligen theoretischen Fragmentlängen aus A549 cDNA amplifiziert werden.

- Klonierung des 3'-Endes: 10 µg total-RNA aus der Nierenzellkarzinom-Zelllinie 786-0 wurden mittels Oligo-dT Primer revers transkribiert, und ein Aliquot dieser cDNA wurde einer PCR unterzogen, deren Programm
- 5 mit hohen Annealingtemperaturen beginnt, sodaß nur der genspezifische Primer an die cDNA bindet (Primer SEQ ID NO:7 bzw. 9), während der zweite Primer (T_m 53°C, SEQ ID NO:13) erst bei niedrigerer Temperatur an die neu synthetisierte DNA-Vorlage bindet. Diese sog.
- 10 "touch-down PCR" (Mastercycler Gradient, Eppendorf) wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 20 Zyklen (15'' 95°C, 30'' 75°C (reduziert um 0,7°C je Zyklus)), 1 Zyklus 7' 72°C, sowie 20 Zyklen (15'' 95°C, 30'' 50°C), 1 Zyklus 7' 72°C).
- 15 Ein Aliquot des obigen Ansatzes wurde mittels einer zweiten Primerkombination (SEQ ID NO:7 und 13 bzw. SEQ ID NO:12 und 13) unter den gleichen Bedingungen wie vorher erneut PCR amplifiziert. Aliquots der PCR-Ansätze wurden direkt in den pGLY-T easy-Vektor
- 20 (Promega) ligiert und anschließend in kompetente *E. coli* J109 (Promega) transformiert. Positive Klone wurden nach PCR-Selektion sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine Übereinstimmung mit der bisherigen Sequenz ab dem für die PCR-Amplifikation
- 25 verwendeten Primer und darüberhinaus 1777 zusätzliche Nukleotide bis zum Beginn einer PolyA-Sequenz im 3'-Bereich der Sequenz. PCR Amplifikation von cDNA aus Tumorzelllinien (786-0, A549) sowie Gewebeproben von Kolonkarzinomen mit den Primern gemäß SEQ ID NO: 16 bis
- 30 18 ergaben mit den ursprünglichen Primern die nach der Klonierung erwarteten Fragmente. In dem nunmehr aus 2216 bp bestehenden cDNA-Fragment konnte ein

durchgehender Leserahmen von Pos. 427 bis 1743 identifiziert werden. Weiter im 5'-Bereich der Sequenz konnten keine zusätzlichen Leserahmen identifiziert werden, woraus zu schließen ist, daß der Bereich von 5 0 bis 427 bereits zum 5'-nicht translatierten Bereich der B99 mRNA gehört.

Mit Hilfe der Primer SEQ ID NO:12 und SEQ ID NO:17 wurde der gesamte kodierende Bereich von B99 aus A549-cDNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. Bei 10 der Sequenzierung wurden mehrere Klone mit einer Insertion von einem Nukleotid an Pos. 923 im Vergleich zu SEQ ID NO:1 (kodiert für B99-1) erhalten (SEQ ID NO:3 bzw. SEQ ID NO:5).

Diese Insertion führt zu einer Veränderung des offenen 15 Leserahmens von B99 mit einer daraus resultierenden veränderten Aminosäuresequenz im C-terminalen-Bereich des B99-Proteins; die von diesem Leserahmen abgeleitete Sequenz des B99-Antigens (B99-2) ist in SEQ ID NO:4 dargestellt.

20 Einer der aus A549-Zellen isolierten Klone zeigte neben der genannten Insertion einen Nukleotidaustausch an Position 622 im Vergleich zu Sequenz SEQ ID NO:1 auf. Dieser Nukleotidaustausch bedingt an Position Nr. 66 der Aminosäuresequenz einen Ersatz von Arginin 25 (SEQ ID NO:2, B99-1) durch Tryptophan (SEQ ID NO:4, B99-2). Abgesehen von diesem Aminosäureaustausch ist die Aminosäuresequenz von B99-2 bis zu Position 166 identisch mit B99-1.

Darüberhinaus bedingt die genannte Insertion einen 30 zweiten potentiellen Leserahmen von Pos. 845 bis 1744

WG 00/066727

45

PCT/EP00/03552

der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten
Sequenz. Ein von einer cDNA mit diesem Leserahmen
exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:6
dargestellte Aminosäuresequenz auf (B99-3). Die Sequenz
5 von B99-3 ist von Pos. 1 bis 27 unterschiedlich zu
B99-1 und ab Pos. 28 identisch mit B99-1.

Beispiel 7

Potentielle MHC-Bindungspeptide in der kodierenden
10 Region von B99

Potentielle Peptid-Epitope innerhalb der kodierenden
Region von B99-1 gemäß SEQ ID NO: 2
(Aminosäureposition: 1-438; Tab. 3A), von B99-2 gemäß
SEQ ID NO:4 (Aminosäureposition 150-190; Tab. 3B) und
15 von B99-3 gemäß SEQ ID NO:6 (Aminosäureposition 1-40;
Tab. 3C) wurden mittels den von Parker et. al., 1994
beschriebenen Algorithmen unter Zugrundelegung
bekannter Motive (Rammensee et al. 1995) durchgeführt.
Für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1,
20 -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, wurden 9-mer
Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten
ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden
und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die
ermittelten Peptide sind in Tabelle 3 aufgelistet.
25 Durch analoges Vorgehen können weitere potentielle
Peptid-Epitope für andere HLA-Typen bzw. 8- und 10-mer
Peptide ermittelt werden.

Tabelle 3A

Immunogene B99-Peptid-Kandidaten (B99-1)

Start- position in SEQ ID NO:2/ SEQ ID NO:	Sequenz	HLA
5	Lys Arg Leu Cys Gin Leu His Tyr Leu	B14
12	Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met	A*0201
19	Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu	A*0201
21	Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu	A*0201
85	Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys	A3
90	Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe	A3
95	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr	B*4403
96	Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu	B7
123	Pro Leu Ser Lys Glu Glu	A3

WO 00/066727

47

PCT/EP00/03552

	Val Glu Phe	
127	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr	B*4403
147	Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala	B14
187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	A*0201
206	Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu	A*0201
209	Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	A*0201
251	Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys	A1, A3
275	Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys	A3
305	Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys	A3
318	Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr	A1
400	Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu	A*0201
407	Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys	A3
413	Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu	S7

WO 00/066727

48

PCT/EP00/03552

422	Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr	A1
423	Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys	A1, A3

WO 00/066727

49

PCT/EP00/03552

Tabelle 3B

Immunogene B99-Peptid-Kandidaten (B99-2)

Start- position in SEQ ID NO:4/ SEQ ID NO:		
152	Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr	A1, A3
154	Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr Cys Val	A*0201
160	Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val	A*0201
163	His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn	A1
164	Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe	A1, B*4403
172	Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr	A1
177	Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys	A1
182	Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln	A*0201

Tabelle 3C

Immunogene B99-Peptid-Kandidaten (B99-3)

Start- position in SEQ ID NO:6/ SEQ ID NO:		
2	Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr	A1, B14
5	Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu	A*0201
10	Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg	A1
12	Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr	A1, A3
14	Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val	A*0201
16	Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met	A*0201

Beispiel 8

MHC-Stabilisierungsversuch mit potentiellen
B99-spezifischen MHC-Bindungspeptiden

- Potentielle B99-MHC-Bindungspeptide wurden in einem
5 T2-Peptid-Beladungsversuch auf ihre Fähigkeit hin
überprüft, HLA-A2 Moleküle auf der Oberfläche von
T2-Zellen zu stabilisieren, was einen Hinweis auf ihre
MHC-Bindungsfähigkeit darstellt. Der Versuch wurde
durchgeführt, wie von Böhm et al., 1998, beschrieben.
- 10 Die Stabilisierung wurde durch eine FACS-Analyse mit
einem HLA-A2 spezifischen Antikörper (BB7.2) gemessen.
Fünf Peptide zeigten einen Stabilisierungseffekt wenn
sie in einer Konzentration von 100 µg/ml verwendet
wurden, dargestellt durch eine Erhöhung der mittleren
15 Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle ohne
Peptid bzw. zu einem MAGE-3 A1-Kontrollpeptid, welches
keine Bindung zeigt. (Tabelle 4):

Tabelle 4

Peptid	Sequenz	durchschnittliche Fluoreszenzintensität
kein Peptid		2,27
MAGE-3 A1 Negativ- kontrolle	Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr	2,25
B99-12	Tyr Leu Trp Ala Leu Cys Tyr Met Leu	7,46
B99-19	Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu	7,43
B99-21	Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu	3,32
B99-187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	3,57
B99-209	Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	4,72

Zur weiteren Analyse wurden diese Peptide in einer
5 Verdünnungsreihe im selben Testsystem untersucht, um
eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit der Bindung
zu zeigen. Fig. 5 zeigt die MHC Stabilisierung auf
T2-Zellen mittels verschiedener Konzentrationen von B99
Peptiden. Insbesondere die Peptide B99-19, B99-187 und
10 B99-209 zeigen eine deutliche
Konzentrationsabhängigkeit der MHC-Stabilisierung,
weshalb diese Peptide bevorzugte Kandidaten für
Immunisierungsstrategien sind. Als Positivkontrolle
wurde Tyrosinase, als Negativkontrolle das HLA-A1-
15 spezifische Peptid MAGE-3 verwendet.

Literatur

- 5 Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga,
J., and Knop, J. (1997), *J. Immunol. Methods* 203,
171-180.
- Blake, J., Johnston, C.V., Hellström, K.E., Marquardt,
10 H., and Chen, L. (1996), *J. Exp. Med.* 184,
121-130.
- C. M. Böhm, M. L. Hanski, S. Stefanovic, H. G.
Rammensee, H. Stein, J. Taylor-Papadimitriou, E. O.
15 Riecken, and C. Hanski. *Int.J.Cancer* 1998.Mar.2.
75:688-693
- Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der
Bruggen, and A. Van Pel (1994), *Annu.Rev.Immunol.*
12: 337-365
- 20 Boon T, (1998). Tumor antigens recognized by cytolytic
T cells. *Cancer Vaccine Week - International
Symposium, New York, Oct 1998; abstract S01*
- 25 Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312: 643-646
- Brüggemann, M. und Neuberger, M.S., (1996), *Immunol.
Today* 17: 391-397
- 30 Buschle M, Schmidt W, Zauner W, Mechtler K, Trska B,
Kiriakopoulos H, Birnstiel M (1997), *Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A.* 94:3256-3261

WO 00/066727

54

PCT/EP00/03552

- Celluzzi, CM and Falo, LD, Jr. (1998), *J. Immunol.* 160:
3081-3085
- 5 Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahar, U., Tureci, O., Gure,
A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E.,
Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997), *Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1914-1918.
- Coulie, P.G. (1997), *Mol. Med. Today* 3: 261-268
- 10 Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow,
TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, and
Slingsluff, CL, Jr. (1994), *Science* 264: 716-719
- 15 Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chochik,
A., Mccadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov,
K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D.
(1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6025-
6030.
- 20 Drancoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P.,
Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H.,
Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993), *Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. A* 90: 3539-3543.
- 25 Emimi, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J (1985),
J. Virol. 55: 836-839
- 30 Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., and
Rammensee, H-G (1991), *Nature* 351: 290-296.

WG 00/066727

55

PCT/EP00/03552

- Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Columbek, P.,
Levitsky, H.I., Simons, J.W., Karasuyama, H.,
Vogelstein, B., and Frost, P. (1990), *Cell* 60:
397-403.
- 5
- Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K.,
Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), *J. Exp. Med.*
172: 1217-1224.
- 10 Gaudi C, Kremor F, Angevin E, Scott V, Triebel F (1999),
J Immunol 162:1730-1738
- Graziano, R.F., et al., (1995), *J. Immunol.* 155:
4996-5002
- 15
- Griffiths, A.D., et al., (1994), *EMBO J.* 13: 3245-3260
- Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, EJ, and
Barnetsen RS (1995), *World J. Surg.* 19: 352-358
- 20
- Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SRC, Lekstrom KJ, Deacon DD,
Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CH,
Ross MM (1998), *Cancer Res* 58:5144-5150
- 25 Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), *Nucleic. Acids.*
Res. 22, 5640-5648.
- Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J.,
Ringhoffer, M., Jager, D., Brand, M., Wada, H.,
30 Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J., and Knuth, A.
(1998), *J. Exp. Med.* 187, 265-270.

WG 00/066727

56

PCT/EP00/03552

- Jakobovits, A., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 561-566
- 5 Jameson, BA and Wolf, H (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4: 181-186
- Jessup, JM and Loda, M (1998) Prognostic markers in
10 rectal carcinoma. *Scand. Surg. Oncol.* 15: 131-140.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakauchi, K., King, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1995), *J. Immunol.* 154: 3961-3968.
- 15 Kawakami, Y, Robbins, PF, and Rosenberg, SA (1996), *Keio J. Med.* 45: 100-108
- 20 Köhler, G. und Milstein, C. (1975), *Nature* 265, 495-497
- Kruif, J., et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3938-3942
- 25 Kyte, J and Doolittle, RF (1982), *J. Mol. Biol.* 157: 105-132
- 30 Lethe, B, Lucas, S, Michaux, L, De Smet, C, Godelaine, D, Serrano, A, De Plaen, E, and Boon, T (1998), *Int. J. Cancer* 76: 903-908

WO 00/066727

57

PCT/EP00/03552

- Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F, Viel S, and Hercend T (1993), *Cancer Res.* 53: 3569-3573
- 5 Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P (1997), *J Exp Med* 186:785-793
- Marchand M, Weynants P, Rankin E et al (1995), *Int. J. Cancer* 63:883-885
- 10 Mayordomo, J.I., Zorina, T., Sterkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., and Lotze, M.T. (1995), *Nature Medicine* 1, 1297-1302.
- 15 McGuinness, B.T., et al., (1996), *Nature Biotechnol.* 14, 1149
- Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 8:651-657
- 20 Murphy, G.P., Elgamal, A.A., Su, S.L., Bostwick, D.G., and Holmes, E.H. (1998), *Cancer* 83, 2259-2269
- 25 Neuberger, M.S., et al., (1984), *Nature* 312: 604-608
- Pardoll, D. M.(1998) *Nature Medicine* 4: 525-531
- Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. (1994), *J. Immunol.* 152:163.
- 30

WO 00/066727

58

PCT/EP00/03552

- Parkhurst, M.R., Saigaller, M.L., Southwood, S.,
Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and
Kawakami, Y. (1996), *J. Immunol.* 157, 2539-2548.
- 5 Paterson Y, Ikonomidis G (1996), *Curr. Opin. Immunol.*
5: 664-9
- Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995),
Immunogenetics 41:178-228
- 10 Rapellino, M, Pecchio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, and
Cavallo, A (1995), *Anticancer Res.* 15: 1065-1070
- Ravaoli, A., Bagli, L., Zucchini, A., and Monti, F.
15 (1990), *Cell. Prolif.* 31, 113-126
- Revillion, F, Bonnetterre, J, and Peyrat, JP (1998),
Eur. J. Cancer 34: 791-808
- 20 Restifo NP (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5: 658-63
- Riechmann, L., et al., (1988), *Nature* 332: 323-327
- Robbins, PF and Kawakami, Y (1996), *Curr. Opin.*
25 *Immunol.* 8: 628-636
- Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey,
H.M., and Sette, A. (1993), *Cell* 74, 929-937.
- 30 Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B.,
Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G.,

WG 00/066727

59

PCT/EP00/03552

- Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11810-11813
- 5 Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989
- Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, and Segurado CG (1993), J. Immunol. 151: 4209-4220
- 10 Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kiriappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94:3262-3267
- 15 Schweighoffer, T. (1997), Onc. Res. 3, 164-176
- Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, E., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Usheroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-P., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., and Chisari, F.V. (1994), J. Immunol. 153, 5586-5592.
- 20 Stauss, H.J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., and Sinclair, C. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89, 7871-7875.
- Tepper, R.I., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1983), Coll 57: 503-512.
- 30

WO 00/066727

60

PCT/EP00/03552

- Tighe H, Corr, M, Roman M, and Raz E (1998), *Immunol. Today* 19:89-97
- Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Rensing, M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (26): 14660-14665
- Tuting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., and Storkus, W.J., (1997), *Eur. J. Immunol.* 27, 2702-2707,.
- Van den Eynde, B. and Erichard, V.G. (1995), *Curr. Opin. Immunol.* 7, 674-681.
- 15 Van den Eynde, BJ, and van der Bruggen, P (1997), *Curr. Opin. Immunol.* 9:684-693
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Choméz, C. Lurquin, E. De Flaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, 20 and T. Boon. (1991, *Science* 254:1643-1647
- van der Burg, S.H., et al., (1996), *J. Immunol.* 156, 3308-3314
- 25 van Elsas, A., van der Minne, C.E., Berghi, M., van der Spek, C.W., Braakman, E., Osanto, S., and Schriber, P.T. (1996), CTL Recognition of an IL-2 Producing Melanoma Vaccine. In: *Immunology of human melanoma. Tumor-host interaction and immunotherapy*, edited by 30 M. Maio, Amsterdam: IOS, 1996, p. 165-173

WG 00/066727

61

PCT/EP00/03552

- van Elsas, A., Aernoudse, C., van der Minne, C.F., van der Spek, C.W., Brouwenstijn, N., Osanto, S., and Schrier, P.T. (1997), *J. Immunother.* 20: 343-353.
- 5 Vaughan, T.J., et al., (1998), *Nature Biotechnol.* 16, 535-539
- Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, KW (1995), *Science* 270: 484-487
- 10 Wang, L., et al., (1997), *Mol. Immunol.* 34: 609-618
- Wang, RF (1997), *Mol. Med.* 3: 716-731
- 15 Wax, S.D., Rosenfield, C.L., and Taubman, M.B., (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 13041-13047.
- Wax, S.D., Tsao, L., Lieb, M.E., Fallon, J.T., and Taubman, M.B. (1996), *Lab. Invest.* 74, 797-808.
- 20 Winter, G., et al., (1994), *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455
- Wölfel, T, Schneider, J, Zum Büschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), *Int. J. Cancer* 57: 413-418
- 25 Wölfel T, Hauck M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Büschenfelde KH, Beach D (1995), *Science* 269: 1281-1284
- 30 Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho,

WO 00/066727

62

PCT/EP00/03552

K.R., August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(25): 11671-11675.

5 Zitvogel, L., Mayordomo, J.I., Tjandrawan, T., DeLeo, A.B., Clarke, M.R., Lotze, M.T., and Storkus, W.J. (1996), J. Exp. Med. 183, 87-97.

WG 00/066727

63

PCT/EP00/03552

Patentansprüche

1. Tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung B99,
ausgewählt aus der Gruppe von Polypeptiden mit der
5 in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6
angegebenen Aminosäuresequenz.
2. Immunogenes Proteinfragment oder Peptid, dadurch
gekennzeichnet, daß es von einem in Anspruch 1
definierten tumorassoziierten Antigen abgeleitet
10 ist.
3. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2,
das eine humorale Immunantwort auslöst.
4. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2,
das bzw. dessen Abbauprodukte durch MHC-Moleküle
15 präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort
auslösen.
5. Immunogenes Peptid nach Anspruch 4, ausgewählt aus
der Gruppe von Peptiden gemäß SEQ ID NO:22 bis 55.
6. Immunogenes Peptid nach Anspruch 5, ausgewählt aus
20 der Gruppe von Peptiden gemäß SEQ ID NO:31, 57
und 59.
7. Immunogenes (Poly)peptid nach einem der Ansprüche
1 bis 6 für die Immuntherapie von
Krebserkrankungen *in vivo* oder *ex vivo*, wobei das
25 (Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen
des Patienten induziert, die B99 exprimieren.

WG 00/066727

64

PCT/EP00/03552

8. Pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie als wirksame Komponente ein oder mehrere immunogene (Poly)peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie verschiedene von B99 abgeleitete immunogene Peptide enthält.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere von B99 abgeleitete Peptide in Mischung mit von anderen tumorassoziierten Antigenen abgeleiteten Peptiden enthält.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide an mindestens zwei verschiedene HLA-Typen binden.
12. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften eines in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigens oder für Fragmente davon.
13. DNA-Molekül nach Anspruch 12, kodierend für ein immunogenes Polypeptid der Bezeichnung B99 mit der in SEQ ID NO:2, 4 oder 6 dargestellten Aminosäuresequenz bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide.
14. DNA-Molekül nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:1, 3 oder 5 dargestellten Sequenz ist

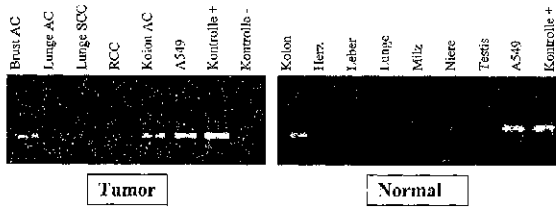
oder mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:1, 3 oder 5 dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

15. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14.
16. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 12 bis 15, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen, wobei das von dem DNA-Molekül exprimierte B99-(Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen des Patienten induziert, die B99 exprimieren.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als wirksamen Bestandteil ein oder mehrere der in einem der Ansprüche 12 bis 16 definierten DNA-Moleküle.
18. Verwendung von Zellen, die das in Anspruch 1 definierte tumorassoziierte Antigen exprimieren, für die Herstellung einer Krebsvakzine.
19. Antikörper gegen ein in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiertes (Poly)peptid.
20. Antikörper nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
21. Antikörper nach Anspruch 19 oder 20 für die Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen, die mit der Expression von B99 assoziiert sind.

WO 00/066727

PCT/EP00/03552

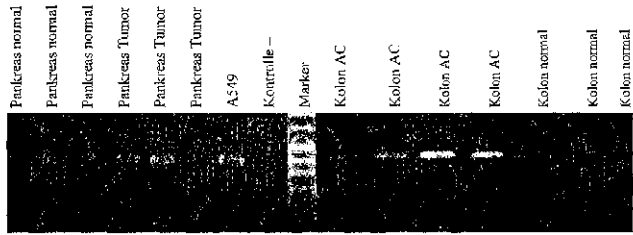
1/5
Fig. 1



WO 00/066727

PCT/EP00/03552

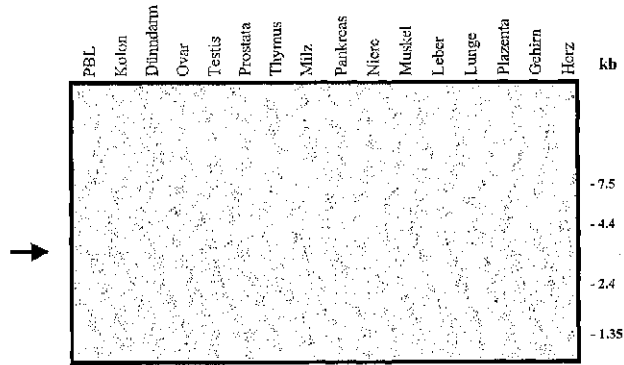
2/5
Fig. 2



WO 00/066727

PCT/EP00/03552

3/5
Fig. 3

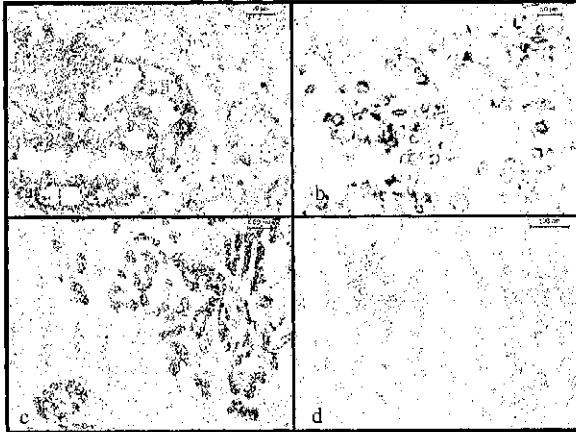


ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

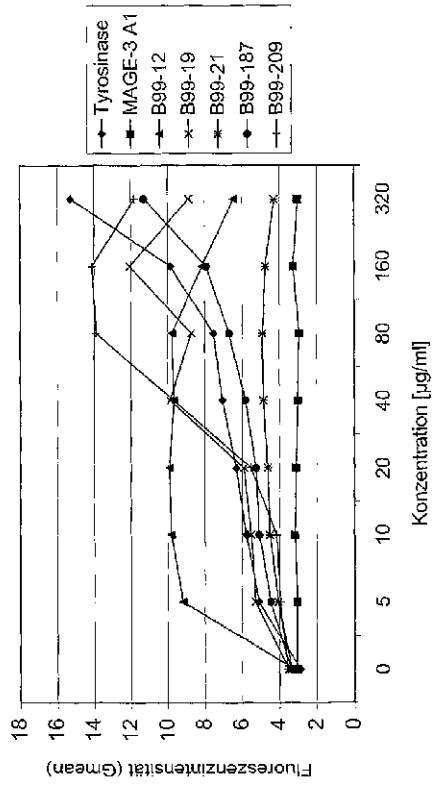
PCT/EP00/03552

4/5
Fig. 4



ERSATZBLATT (REGEL 26)

5/5
Fig. 5



ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

1

PCT/EP00/03552

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Boehringer Ingelheim International GmbH et al.
 <120> Tumcrassoziiertes Antigen
 <130> seq1ist17203
 10 <140>
 <141>
 <160> 61
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
 <211> 2216
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(426)

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (427)..(1743)

<220>
 <221> 3'UTR
 35 <222> (1744)..(2216)

<400> 1

40 GTCAGCGGAA CAGCCCTAC TACTGTGAC CTCGCTTA CACAGCAT CTCTTTCTGG 60
 GAGCCCTCG GATTCTGCA ATACCTATCA CAGTAGGTC CAGAGGAAA CAGACGAGA 120
 ACATGACCTC AAGAGGCTC CTGTACTA GAGGACAG CAGAGCCG CAGAGATAT 180
 45 TAAAGAGGAG CCGTAAACTG TTCCCTGAC AACTATGAA TGACAGAAA TACCTTTTGG 240
 AAGATTAGAA GATCAAGGA CATGTTGT CAGATTGCT GCGAGGAC ACCGCGACT 300

50 TTCTTTGG AAGAGATCA CCGCTGGA AGAGTACT CCTAGGCT AGAGAGCTA 360
 CAAAGGAT GGTACTCT CCGCTTCC TGTCTGCT CTCAGCTT CCGCATCT 420

55 GAGCG ATG GTT CAA TGG AAG AGA CTC TGC CAG CTC CAT TAC TTG TGG 480
 Met Val Glu Trp Lys Arg Leu Cys Glu Leu His Tyr Leu Trp
 1 5 10

GCT CAG GAC TGC TAT ATG CTG CTG GCC ACT GTC GCT CTG AAA CTT TCT 516

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WG 00066727

2

PCT/EP0003552

	Ala	Leu	Gly	Cys	Tyr	Met	Leu	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Leu	Lys	Leu	Ser	
	15					20					25					30	
5	TTC	AGG	TTG	AAG	TGT	GAC	TCT	GAC	CAC	TTG	GGT	CTG	CAG	TCC	ACG	GAA	561
	Phe	Arg	Leu	Lys	Cys	Asp	Ser	Asp	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Ser	Arg	Glu	
				35					40						45		
10	TCT	GAA	AGC	CAG	TAC	TGT	ACG	AAT	ATC	TTG	TTC	AAT	CTC	CAG	AAA	CTT	612
	Ser	Gln	Ser	Gln	Tyr	Cys	Arg	Asn	Ile	Leu	Tyr	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	
				50				55						60			
15	CCA	GCA	AAG	AGG	TCT	ACC	AGC	TGT	TCA	GGG	GTC	ACC	CGA	GGG	GAC	CAA	660
	Pro	Ala	Lys	Arg	Ser	Ile	Asn	Cys	Ser	Gly	Val	Thr	Asp	Gly	Asp	Gln	
				65			70						75				
20	GAG	GCA	GAG	CGT	CAG	GCT	ATT	CTG	AAT	AAU	CTG	GAG	GTC	AAG	AAG	AAG	708
	Glu	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ile	Leu	Asn	Asn	Leu	Glu	Val	Lys	Lys	Lys	
				80			85					90					
25	CGA	GAG	GCT	CTC	ACA	CAC	ACC	CAC	TAC	CTC	CCC	CTC	ACC	AGA	GAC	TGT	756
	Arg	Glu	Pro	Phe	Thr	Asp	Thr	His	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Arg	Asp	Cys	
				95		100				105						110	
30	GAG	GAC	TTC	AAG	GCT	GAA	AGG	AAG	TTC	ATA	CAG	TTC	CCA	CTG	AGC	AAA	804
	Glu	His	Phe	Lys	Ala	Glu	Arg	Lys	Phe	Ile	Gln	Phe	Pro	Leu	Ser	Lys	
				115					120					125			
35	GAA	GAG	GTG	GAG	TTC	CGT	ATT	GCA	TAC	TCT	ATG	GTC	AAT	CAA	GAG	AAG	852
	Glu	Glu	Val	Glu	Phe	Pro	Ile	Ala	Tyr	Ser	Met	Val	Ile	His	Glu	Lys	
				130				135						140			
40	ATT	GAA	AGC	TCT	GAA	AGG	CIA	CAG	CGA	GCT	GTC	TAT	GCC	CGT	CAG	AGC	900
	Ile	Glu	Asn	Phe	Glu	Arg	Leu	Arg	Ala	Val	Tyr	Ala	Pro	Gln	Asn		
				145			150						155				
45	AGA	TAC	TGT	GTC	CAU	GCG	GAT	GAG	AAG	TCC	CGA	GAA	ACT	TTC	AAA	GAG	948
	Ile	Tyr	Cys	Val	His	Val	Asp	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Thr	Phe	Lys	Glu	
				160			165						170				
50	GGG	GTC	AAA	GCA	ATT	ATT	TCT	TGC	TTC	CCA	AAT	GTC	ATC	ATA	GCC	AGT	996
	Ala	Val	Lys	Ala	Ile	Ile	Ser	Cys	Phe	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ala	Ser	
				175		180				185						190	
55	AAG	CTG	GTT	GGG	GTC	GTT	TAT	GCC	TCC	TGG	TCC	AGG	GTC	CPA	GCT	GAC	1044
	Lys	Leu	Val	Arg	Val	Val	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Asp	
				195					200					205			
50	CTC	AAC	TGC	AAG	GAA	GAC	TTG	CTC	CAG	AGC	TCA	GTC	CCG	AGG	AAA	TAC	1092
	Leu	Asn	Cys	Met	Glu	Asp	Leu	Leu	Gln	Ser	Ser	Val	Pro	Trp	Lys	Tyr	
				210				215						220			
55	TTC	CTG	AAT	ACA	TGT	GAG	ACG	GAC	TTT	UUT	ATA	AAG	AGC	AAT	GAA	GAG	1140
	Phe	Leu	Asn	Thr	Cys	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Ile	Lys	Ser	Asn	Ala	Glu	
				225			230							235			
55	AAG	GTC	CAG	GCT	CTC	AAG	ATG	TTG	AAT	GGG	AGG	AAT	AGC	ATG	GAG	TCA	1188
	Met	Val	Gln	Ala	Leu	Lys	Met	Leu	Asn	Gly	Arg	Asn	Ser	Met	Glu	Ser	
				240			245							250			

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

3

PCT/EP00/03552

	GAG GTA GCT CCT CCG GAC AAA GAA ACC GGC GGG AAA TAT CAC TTT GAG	1236
	Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr His She Glu	
	255 260 265 270	
5	GTA GTG AGA GAC ACA TTA CAC CTA ACC AAC AAG AAG GAT CTT CCC	1284
	Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys Asp Pro Pro	
	275 280 285	
10	CCT TAT AAT TTA ACT AAG TTT ACA CCG AAT CCG TAC AAT CTG GCT TCC	1332
	Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Ala Ser	
	290 295 300	
15	CGA GAT TTC GTC CCA GAT GAT TCG AAG AAC CCT AAA TCC GAA GAA CTG	1380
	Arg Asp Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser Gln Gln Leu	
	305 310	
20	AAT GAA TGG GTA AAA GAC ACT TAT AGC CCA GAT GAA CAC CTC TGG GGC	1428
	Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His Leu Trp Ala	
	320 325 330	
25	ACC GAT CAG GAT GAA CCG TGG ATG CTT GGC TCT GAT CCA AAC CAC CCC	1476
	Thr Leu Glu Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro Asn His Pro	
	335 340 345 350	
30	AAG TAC GAC ATC TCA GAC ATG ACT TCT AAT GCC AAG CTG GTC AAG TGG	1524
	Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu Val Lys Trp	
	355 360 365	
35	CAG GGT CAT CAG CCA CAC ATC GAT AAG GGT GCT CCT TAT GCT GGC TGC	1572
	Gln Gly His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr Ala Pro Cys	
	370 375 380	
40	TCT CCA ACC CAC CAG CCG CCT ATC TCC GTT TAT CCG GCT CCG GAC TTG	1620
	Ser Gly Ile His Glu Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala Gly Asp Ile	
	385 390 395	
45	AAT TGG ATG CTT CAA AAC CAT CAC CTG TTG GCC AAC AAG CTT GAC CCA	1668
	Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro	
	400 405 410	
50	AAG GTA GAT GAT AAT GCT CTT CAG TGC TTA GAA GAA TAC CTA CGT TAT	1716
	Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr	
	415 420 425 430	
55	AAG GCA AAT TAT GGG ACT GAA CTT TGA GACACACTAT GAGACCCCTG	1764
	Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *	
	435	
50	CTACCTGCG GGCAGAGACA TGTACAAACA TGTCTGAGAC TTGCTGGCAC AGTGTGGGCG	1823
	GGATCCCGG GCTTTCGANT TGGGCGATC CATTAGGAAA AGAGGGCTCC TATTAGACTG	1883
	TTGGTAAGTA GACTTTTTCG CTTGCAAMTT GGTGCTGGGG TGAAGGCTCC TTGTTCTGCG	1943
55	ACCCCTAACC CTACGATTC CTCGACAAAC TTCTGTGAAA AGTGGGAGG AGAACAGCAG	2003
	TGTAAGGGAG AGTGAAGGAG GATATGTGG TAGAGCACTT GATTTCAGTT GATGCGCTCC	2063

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WG 00066727

4

PCT/EP0003552

TGGTACTTTC TCGTTCAGT GGAGCAGCGG TCCCAATTA TTCAGGTTT GGAGCCTGG 2123
 AAGAGACTT TCAAGGAGG AGAGCTTCC CTTCTGACT GTTACTTAA AATTAATTA 2183
 5 CTTCTGACT AAGTAAAA AAAAAAAA AAA 2218

10 <210> 2
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 1

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

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WG 00/066727

5

PCT/EP00/03552

Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser Asn Ala Glu Met Val
 225 230 235 240

5 Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn Ser Met Glu Ser Glu Val
 245 250 255

Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr His Phe Glu Val Val
 260 265 270

10 Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Tyr Lys Asp Pro Pro Pro Tyr
 275 280 285

Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Ala Ser Arg Asp
 290 295 300

15 Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser Gln Gln Leu Ile Glu
 305 310 315 320

20 Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His Leu Trp Ala Thr Leu
 325 330 335

Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro Asn His Pro Lys Tyr
 340 345 350

25 Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu Val Lys Trp Gln Gly
 355 360 365

His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr Ala Pro Cys Ser Gly
 370 375 380

30 Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala Gly Asp Leu Asn Asp
 385 390 395 400

35 Met Leu Gln Asn His His Val Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys Val
 405 410 415

Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys Ala
 420 425 430

40 Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *
 435

45 <210> 3
 <211> 2217
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

50 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(425)

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (427)..(999)
 <220>

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WG 00066727

6

PCT/EP0003552

<221> 3'UTR
 <222> (1000)..(2217)

5 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(844)

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (845)..(1744)

15 <220>
 <221> 3'UTR
 <222> (1745)..(2217)

<400> 3

20 GTCACGGGAA CTCGCTGTC TACTGTGAG CTCGCTCTA CTCAGCGGT TTGTGTGCG 66
 GAGCGCCGG GATCTGCTA AACCTATCA CTCAGGCTC TGAGCGAAA CAGATGAGA 120
 AATGACCTC AAGGAGCTC CTCCTATGA GAGGACGAG CTCAGCCCTC GCAGACATAT 180

25 TAGAGGAGG CAGTAACTG TTCCCTGAC ATCTATGAA TGTUAGAAA TACCTTGGG 240
 AAGGTAAGAA GATCAGGGA GAGGCTGCT CACATTCCT GCGAGGAGC ACGGACAGC 300

30 TTGACTGGG AACGAAATC GAGCTTGA AAGATCATC CCAAGGAGG AAGGAGCTA 360
 CTAAGGATC GATGCTCTC CCACTTCCG TGTCTGCTT CTCACCTCT CAGCCATCT 420

35 GGGAG AGG GGT CAA TGG AAG AGA CAC TGC CAG CTG CAT TAC TTG TGG 468
 Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp
 1 5 10

40 GCT CTG GGC TGC TAT ATG CTG CTG GCC AAT GAG GCT CTG AAA CTT TCT 516
 Ala Leu Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser
 15 20 25 30

45 TTC AGG TTG AAG TGT GAC TCT GAC CAC TTG GGT CTG GAG TCC AGG GAA 564
 Phe Arg Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu
 35 40 45

50 TCT CAA AAG CAG TAC TGT AGG AAT ATC TTG TAT AAT TTC CTG AAA CTT 612
 Ser Gln Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu
 50 55 60

55 CCA GCA AAG TGG TCT ATC AAC TGT TCA GGG GTC ACC CGA GGG GGC CAA 660
 Pro Ala Lys Trp Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln
 65 70 75

60 GAG GCA GTC CTT CAG GCT AAT CTG AAT AAC CTG GAG GTC AAG AAG AAG 708
 Glu Ala Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys
 80 85 90

65 CGA GAG CTT TTC ACA GAC ACC CAC TAC CTC TCC ACC AGA GAC TGT 756

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

7

PCT/EP00/03552

	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys	
	95 100 105 110	
5	GAG CAC TTC AAG CCT GAA AGG AAG TTC ATA CAG TTC CCA CAG AAG AAA Glu His Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys	894
	115 120 125	
10	GAA GAG GTG GAG TTC CCT AAT GCA TAC TCT ATG GCG ATT CAT GAG AAG Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys	852
	130 135 140	
15	ATP GAA AAC TTT GAA AAG CTA CAG CAA GCT GTC TAT CCC CCT CAG AAG Ile Glu Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn	900
	145 150 155	
20	ATA TAC TGT GTC CMT GTC GAT GAA GAA GTC CCC AGA AAC TTT CAA AGA Ile Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe Gln Arg	918
	160 165 170	
25	GCC GGT CAA AAG AAT AAT TTC TTG CTT CCC AAA TGT CTT CAT AGC CAG Gly Gly Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln	996
	175 180 185 190	
30	TAA GCTGGTTCAG GAGGTTTATG CTTCTGCTC CAGGATGCA GCTGACTCA	1049
	+	
35	ACGCGATGCA AGACTGCTC CAGGCTCAG TCCCGTGGAA NCACTTCTG ANTCATGTC	1109
40	GGACGGCTT TCCATATAG AGCATGCG AGATGTCGA GGCCTCAAG ATGTTGATG	1169
45	GGGGATAG CATGGATCA GAGGTACTC CTATGCGAA AGAATCCCG TGGATATC	1229
50	ACTTGAAGG AGTGAAGG ACATTACAG TATCGAAGG GAGATGGT CTTCCCTCT	1289
55	ATATTTAAC TATGTTTACA GGAATGCTT ACATGTTGG TCCCGAGAT TTGTTGAA	1349
60	ATGTTTCAA GATCCATA TCCATCAC TCATGATG GATATATC ACTTATAGC	1409
65	CAGATGACA CTTCTGGGC ACCCTCAGC GGGACCTTG GATGCTGC TCTGTTCCA	1469
70	ACATCCCAA GTCGATAC TATGATCA CTCTATGCG CAGCTGTC ATGTCGAGG	1529
75	GTATGAGG AGACATGAT AAGGCTGTC CTATGCTGC CAGCTGTC ATGTCGAGG	1589
80	GGCTATCAG GATTTAGGG GCTGGGACT TATATGGAT GATCATAAC CATCACTCT	1649
85	TGGCAACA GTTTGACCA AAGGTATG ATATGCTCT TATGCTCA GAGATATCC	1709
90	TAGTTATAA GGCATCTAT GGGACTGAC TTGATGAC ACTATGAG GATTTCTAC	1769
95	TGTGGGCA GAGCATATC AATATGCTC AATATGCT GAGATGCT GGGTGTACA	1829
100	CGAGGCTT GCATTTGAG GATCTCTTA GATATGAG GCTGCTATA GATTTCTAC	1889
105	AATATGCT TTTGCTGC AATATGCTC CAGGATAT GCTGCTCT CTTCTACCC	1949
110	TATCTATG AGTTCTCA CTATCTCT CACTATGTA GATCATAAC TCTGCTATA	2009

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WG 00066727

8

PCT/EP0003552

GCGAGCTGA AGGAGGATA TGUGEDGAG CACTGATTT CAGTGAATG CTTGCTGTA 2069
 GCTTTCOAT CCGTGGAGC TGCGTTCCT AATAATTA GATTTGGAG CTTGCGGAG 2129
 5 ACCTTGTATG GAAGAGAG CTTCCCTCT GACTGTAA CTTAAATA AATAGCTCT 2189
 GATTCAGCT AAAAAAAA AAAAAA 2217

10

<210> 4
 <211> 191
 <212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 4

20 Met Val Gln Trp Iys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp Ala Leu
 1 5 10 15

Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser Phe Arg
 20 25 30

25

Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Gln Ser Arg Glu Ser Gln
 35 40 45

30

Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu Pro Ala
 50 55 60

Lys Trp Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln Glu Ala
 65 70 75 80

35

Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu
 85 90 95

Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys Glu His
 100 105 110

40

Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys Glu Glu
 115 120 125

45

Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Iys Ile Glu
 130 135 140

Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr
 145 150 155 160

50

Cys Val His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe Gln Arg Gly Gly
 165 170 175

Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Glu *
 180 185 190

55

<210> 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

9

PCT/EP00/03552

```

<211> 2217
<212> DNA
<213> Homo sapiens

5 <220>
  <221> 5'UTR
  <222> (1)..(844)

10 <220>
  <221> CDS
  <222> (845)..(1744)

  <220>
  <221> 3'UTR
15 <222> (1745)..(2217)

<400> 5
20 GTACAGGGAA CTGCCCCTC TACTCTGAC CCGCCCTTA CTGACAGGT CTGTCTAGG    60
   GAGCCCTGC GATPCTGTA ATACCTATC CTGAGAGTC TGAGGGBAA CAGATGAGA    120
   ACATGACTC AAGAGCTTC CTCTATGA GAAGCCAG CTGACCCCTG CCAAGATAT    180
25 TAAAGAGAG CCGAAGCG TCCCTGAG ATCTATGAA TCTCGAAA TACCTCTAG
   AAGGTAGAA GATCAGGGA CATGCTGAT CACTTAGCT GCGAGGAC ACCGCGAGC    300
30 TTGCTTGG ATGAGATCA CGACTTGA AGAGATAT CCGAGCAG AGGAGACTA    360
   CTAAGGATP GTGACTCT CCACTCTTC TTAGCTGGT CTCACCTCT CCGCCATCT
   CTGAGATCG TAAATGCA GAGATCTG CAGCTCAT ACTTCCTCC CTGCGCTCC    480
35 TTTAGCTGC TAGGACTGT GGCCTGAA CTCTCTCA GATGAGTG TGACTGAC
   CACTGGGTC TGGAGCTAG GATCCTCAA AGCAGTACT GTAGATAT CAGTATPAT    600
40 TTCTGATC TTCCAGAA GTGCTATC ACTGCTAG GAGTACCG AGGGACAAA    660
   GAGCAGTCC TTGAGCTAT TCGATATC CTGAGCTCA AATGAGAG AGAGCCATC
   ACAGACACC ACTACCTTC CCGCAGAA GACTGAGC ACTTCAGC TGAGGAGAG    780
45 CTATACAGT TCCACTGAG CAAGGAGAG GTGATCTC CATTCGTA CTTATGGTG
   ATTC ATG ABA AGA TGC AAA ACT TTG ABA GGC TAC TCC GAG CTG TGC ATG    880
   Met Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu Cys Met
   1 5 10 15
50 CCG CTC AGA ACA TAT ACP GIG TCC ATG TGG ATG ARG AAG TCC CCA GAA    937
   Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met Trp Met Lys Lys Ser Pro Glu
   20 25 30
55 ACT TTC AAA GAG GCG GTC AAA GCA ATT AAT TCT TCC TTC CCA AAT GTC    985
   Thr Phe Lys Glu Ala Val Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val
   35 40 45

```

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WG 00066727

10

PCT/EP0003552

	TTC ATA GCC AGC AAG CAG GTT CCG GTG GTF TAT GCC TCC TCG TCC AGG	1033
	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg	
	50 55 60	
5	3TS CAA GCT GAC CTC AAC TGC ATG GGA GAC TTG CTC CAG ACC TCA GTG	1081
	Val Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	
	65 70 75	
10	CCG TCG AAA TAC TTC CAG AAT ACA TGT GGG ACG GAC TTT CCT ATA AAG	1129
	Pro Trp Lys Tyr Phe Leu Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys	
	80 85 90 95	
15	AGC AAT CCA GAG ATG CAC CAG CTT CTC AAC ATG TAC AAT GCG AAG AAT	1177
	Ser Asn Ala Glu Met Val Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn	
	100 105 110	
20	AGC AAG GAG TCA GAG GTA CCF CCT AAG CAC AHA GAA ACC GCG TGG AAA	1225
	Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys	
	115 120 125	
25	TAT CAC TTT CAG GTA GTG AGA GAC ACA TTA CAC CTA ACC AAG AAG AAG	1273
	Tyr His Phe Glu Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys	
	130 135 140	
30	AAG GAT CCT CCC CCT TAT AAT TTA ACC ATG TTT ACA GCG AAT CCG TAC	1321
	Lys Asp Pro Pro Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr	
	145 150 155	
35	ATT GTG GCT TCC CCA GAT TCC GTC CAA CAG GTF TTG AAG AAC CCT AAA	1369
	Ile Val Ala Ser Arg Asp Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys	
	160 165 170 175	
40	TCC CAA CAA CTG ACC GAA TGG GTA AAA GAC ACT TAT ACC CCA GAT GAA	1417
	Ser Gln Gln Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu	
	180 185 190	
45	CAC CTC TGG CCC ACC CTT CAG CGT GCA CCG TGG ATG CCT GCG TCT GGT	1465
	His Leu Trp Ala Thr Leu Glu Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val	
	195 200 205	
50	CCC AAC CAC CCG AAG TAC GAC ATC TCA GAC ATG ACT TCT ATT GCC AGG	1513
	Pro Asn His Pro Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg	
	210 215 220	
55	CTG GTC AAG TGG CAG GGT CAT GAG GAA GAC ATC GAT AAG GGT GCT CCT	1561
	Leu Val Lys Trp Gln Gly His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro	
	225 230 235	
60	TAT GCT CCC TGC TCT GGA ATC CAC CAG CCG GCT ATC TGC GTF TAT GGG	1609
	Tyr Ala Pro Cys Ser Gly Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly	
	240 245 250 255	
65	GCC GGG GAC TTG AAT TGG ATG CTT CAA AAC CAT CAC CTG TTS GCC AAC	1657
	Ala Gly Asp Leu Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn	
	260 265 270	
70	AAG TTT GAC CCA AAG GCA GAT GAT AAT GCT CTT CAG TGC TTA GAA GAA	1705

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

11

PCT/EP00/03552

Lys Phe Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu
275 280 285

TAC CTA CCG TAT AAG GGC AIC TAT GGC ACT GAA CTT TGA GACACATAT 1754
5 Tyr Leu Arg Tyr Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu
290 295 300

GGAGCGCTG CTCCCTGCG GCGAGGACA TGTGAAACA TCCACAGAC TTCCTGGGAC 1814

AGTGTGGGTC GGAGACAGG GCTTTCGAT TGTGTCATC CTTCAGGTA AGAGGCGTGC 1974

TATTACATG TGGTAAAGA GACTTTTGC CTTCGAAAT GCGCGCTGG TAAATCGTGC 1934

TTCCTCTCTC ACCCTTACC CTAAAGTTC CTCCACTAC TTCCTGACTA AGTGCAGATG 1994

15 AGACGCTGTC TGTATAGGG AGTAGAGGAG GATATGCTG TAGAGCACTT GATTCAGTC
GATTCGCTGC CGGTACGTT TCCCTCTCTC GAGCGCGCG TTCCTAATA TTCAGGTTT 2114

20 GGTAGCGTGG AGGAGCACTT TGTATGAAA AGCACTTCC CTCCTGCTCT GTTACTTAA
AACTAAATAG CTCCTGATTC AAATRAAAA AAAAAAAA AAA 2217

25
<210> 6
<211> 300
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30
<<00> 6

Met Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro
35 1 5 10 15
Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met Trp Met Lys Lys Ser Pro Glu Thr
20 25 30

40 Phe Lys Glu Ala Val Pys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val Phe
35 40 45
Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val
50 55 60

45 Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Gln Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val Pro
65 70 75 80

50 Trp Lys Tyr Phe Leu Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser
85 90 95
Asn Ala Glu Met Val Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn Ser
100 105 110

55 Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr
115 120 125
His Phe Glu Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

12

PCT/EP00/03552

130 135 140

Asp Pro Pro Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile
 145 150 155 160

5 Val Ala Ser Arg Asp Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser
 165 170 175

Gln Gln Leu Ile Gln Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His
 180 185 190

10 Leu Trp Ala Thr Leu Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro
 195 200 205

15 Asn His Pro Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu
 210 215 220

Val Lys Trp Gln Gly His Gln Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr
 225 230 235 240

20 Ala Pro Cys Ser Gly Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala
 245 250 255

Gly Asp Leu Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys
 260 265 270

25 Phe Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr
 275 280 285

30 Leu Arg Tyr Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *
 290 295 300

35 <210> 7
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 7
 TCAATGAGAA GACCAAGCTG ACGCC 25

45 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 50 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

55 <400> 8
 GGGAGACAGG TGGAGACCGA GC 22

WO 00/066727

13

PCT/EP00/03552

5 <210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 10 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 9
 15 TCACGGGAAC TGCCCTTGCT ACTTGT 26
 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 25 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 10
 30 GCTCCTTGAG GTCAGATTCT TCATCTG 27
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 40 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 11
 45 GGACACCGAG CACAGGAAG G 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 55 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 12

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

14

PCT/EP00/03552

CCTCCCTCT GCCTGGTCTC C 21

5
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

15
<400> 13
TCGAGTGGAC CATATSTACC 20

20
<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

25
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

30
<400> 14
AAGGTGAAGG TCGAGTCAA CG 22

35
<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

45
<400> 15
GCGAGAGATG ATGACCCTTT TGGC 24

50
<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

55
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

15

PCT/EP00/03552

<400> 16
 5 GACCAAGGAGG CATAAACCAC CCGAACC 27

<210> 17
 <211> 26
 10 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 17
 20 TTCCATCAAA GTTCCTCTCC ACGCTACC 28

<210> 18
 <211> 28
 25 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 18
 35 CATCCAATTC AACTCCCAAG CCCCATAA 22

<210> 19
 <211> 43
 40 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 45 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 19
 50 TGTACCGTCA AGACGACAGA AACGCCGTGG TACTGAGGTC GAG 43

<210> 20
 <211> 22
 55 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/06727

16

PCT/EP00/03552

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 20
5 AGGGCGTGGT ACCGAGCTCG AG 22

<210> 21
<211> 11
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 21
20 GGCTCGAGCT C 11

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
45 Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
55 Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WG 00066727

17

PCT/EP0003552

1 5

5 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 25
 Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe
 1 5

15

20 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 26
 Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr
 1 5

30 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 27
 Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu
 1 5

40

45 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 28
 Pro Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Phe
 1 5

55

<210> 29
 <211> 9

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

18

PCT/EP00/03552

<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 29
Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr
1 5

10
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 30
20 Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala
1 5

25 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 31
Phe Ile Ala Ser Iys Leu Val Arg Val
1 5

35
<210> 32
<211> 9
40 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
45 Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu
1 5

50
<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 33

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

19

PCT/EP00/03552

Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys
 1 5

5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 34

Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys
 15 1 5

20
 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25
 <400> 35

Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys
 1 5 10

30
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35
 <400> 36

Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr
 40 1 5

45
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50
 <400> 37

Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu
 1 5

55
 <210> 38

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

20

PCT/EP00/03552

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 38
 Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys
 1 5
 10
 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 39
 Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu
 1 5
 20
 25
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 40
 Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr
 1 5
 35
 40
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 41
 Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys
 1 5
 50
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 42

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

21

PCT/EP00/03552

Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr
 1 5
 5
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 15 Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr Cys Val
 1 5
 20 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 44
 Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val
 1 5
 30 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 45
 His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn
 1 5
 45 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 46
 Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe
 1 5
 55

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

22

PCT/EP00/03552

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 47
 10 Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr
 1 5

 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 48
 Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys
 1 5
 25
 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 49
 35 Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln
 1 5

 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 50
 Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr
 1 5
 50

 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

23

PCT/EP00/03552

<400> 51
 Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu
 1 5
 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg
 1 5
 15

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr
 1 5
 20

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val
 1 5
 25

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met
 1 5
 30

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 00/066727

PCT/EP00/03552

24

5 <210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 56
Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met Leu
1 5 10

15 <210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 57
Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu
1 5

30 <210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 58
Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu
1 5

40 <210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 59
Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val
1 5 10

55 <210> 60
<211> 9

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WG 00/066727

25

PCT/EP00/03552

<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 60
Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
1 5

10
<210> 61
<211> 218
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 61
20 Asn Lys Phe Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu
1 5 10 15
Glu Glu Tyr

25

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 00/03552
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N9/10 A61K38/08 A61K38/04 A61K31/70 A61K39/00 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHWIENTEK TILO ET AL: "Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning of human cDNA encoding a novel beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase forming core 2 and core 4." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 8, 19 February 1999 (1999-02-19), pages 4504-4512, XP002146291 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,12-15, 19,20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier documents but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document or, taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
31 August 2000		21/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 346-2040; Telex 31 051 epo nl; Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Smalt, R

Form PCT/ISAO/10 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No
 PCT/EP 00/03552

C:(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEH JIUNN-CHERN ET AL: "Molecular cloning and expression of a novel beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and 1 branches." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 5, 29 January 1999 (1999-01-29), pages 3215-3221, XP002146292 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,12-15, 19,20
X	WO 98 39448 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 11 September 1998 (1998-09-11) Sehe Passagen die sich auf Gen 171 beziehen, und die Ansprüche.	1,12,19, 20
A	RAMMENSEE H -G ET AL: "MHC LIGANDS AND PEPTIDE MOTIFS: FIRST LISTING" IMMUNOGENETICS, DE, SPRINGER VERLAG, BERLIN, vol. 41, no. 4, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 178-228, XP000673045 ISSN: 0093-7711 cited in the application the whole document	
A	Y GUILLOUX ET AL: "A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 183, no. 3, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 1173-1183, XP002132406 ISSN: 0022-1007 the whole document	
A	YOUSEFI S ET AL: "INCREASED UDP-GLCNAC GAL-BETA-1-3-GALNAC-R GLCNAC TO GALNAC BETA-1 6-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE ACTIVITY IN METASTATIC MURINE TUMOR CELL LINES CONTROL OF POLYLACTOSAMINE SYNTHESIS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 3, 1991, pages 1772-1782, XP002146293 ISSN: 0021-9258 the whole document	

2

Form PCT/ISA(210) (reconstruction of electronic search) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/EP 00/03552

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIMODAIRA KAZUHISA ET AL: "Carcinoma-associated expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: Role of O-glycans in tumor progression." CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 23, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 5201-5206, XP002146297 ISSN: 0008-5472 the whole document	
E	WO 00 34449 A (CLAUSEN HENRIK ;SCHMIENTEK TILG (DK)) 15 June 2000 (2000-06-15) the whole document	1,12-15

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Inventor's Application No
PCT/EP 00/03552

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9839448 A	11-09-1998	AU 6545398 A EP 0972029 A EP 0972030 A WO 9839446 A	22-09-1998 19-01-2000 19-01-2000 11-09-1998
WO 0034449 A	15-06-2000	NONE	

Form PCT/ISA210 (latest amended version) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.
 Nr.
 PCT/EP 00/03552

C)(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEBEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	YEH JIUNN-CHERN ET AL: "Molecular cloning and expression of a novel beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and I branches." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 274, Nr. 5, 29. Januar 1999 (1999-01-29), Seiten 3215-3221, XP002146292 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1, 12-15, 19, 20
X	WO 98 39448 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 11. September 1998 (1998-09-11) Siehe Passagen die sich auf Gen 171 beziehen, und die Ansprüche.	1, 12, 19, 20
A	RAMMENSEE H -G ET AL: "MHC LIGANDS AND PEPTIDE MOTIFS: FIRST LISTING" IMMUNOGENETICS, DE, SPRINGER VERLAG, BERLIN, Bd. 41, Nr. 4, 1. Februar 1995 (1995-02-01), Seiten 178-228, XP000673045 ISSN: 0093-7711 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	
A	Y GUILLOUX ET AL: "A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, Bd. 183, Nr. 3, 1. März 1996 (1996-03-01), Seiten 1173-1183, XP002132406 ISSN: 0022-1007 das ganze Dokument	
A	YOUSEFI S ET AL: "INCREASED UDP-GLCNAC GAL-BETA-1-3-GALNAC-R GLCNAC TO GALNAC BETA-1 6-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE ACTIVITY IN METASTATIC MURINE TUMOR CELL LINES CONTROL OF POLYLACTOSAMINE SYNTHESIS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 266, Nr. 3, 1991, Seiten 1772-1782, XP002146293 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	

2

Form/Akt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Anl. 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nr. ~~010000~~ Aktenzeichen
PCT/EP 00/03552

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Berechnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SHIMODAIRA KAZUHISA ET AL: "Carcinoma-associated expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: Role of O-glycans in tumor progression." CANCER RESEARCH, Bd. 57, Nr. 23, 1. Dezember 1997 (1997-12-01), Seiten 5201-5206, XP002146297 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	
E	WO 00 34449 A (CLAUSEN HENRIK ;SCHWIENIEK TIL0 (DK)) 15. Juni 2000 (2000-06-15) das ganze Dokument	1,12-15

2

Formblatt PCT/ISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichung, die die zur selben Patentfamilie gehören

In
Anzeichen
PCT/EP 00/03552

Im Recherchenbericht angeführtes Patentsymbol	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9839448 A	11-09-1998	AU 6545398 A EP 0972029 A EP 0972030 A WO 9839446 A	22-09-1998 19-01-2000 19-01-2000 11-09-1998
WO 0034449 A	15-06-2000	KEINE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/82	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/32	C 0 7 K 14/82	
G 0 1 N 33/53	C 0 7 K 16/32	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/574	A
	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100096194

弁理士 竹内 英人

(74)代理人 100074228

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 アドルフ ギュンター

オーストリア アー - 1 0 7 0 ヴィーン シュティフトガッセ 1 5 - 1 7 / 1 0

(72)発明者 ハイダー カール - ハイイツ

オーストリア アー - 2 0 0 0 シュトツケラウ ヨハン - シュトラウス - プロメナーデ 4 / 1
1

(72)発明者 ゾンマーグラーバー ヴォルフガング

オーストリア アー - 3 0 0 2 プルカースドルフ ハウス 4 4 リンツァーシュトラッセ 1
9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 CA04 DA06 EA04 HA12 HA15

4B064 AG27 AG31 CA02 CA10 CA19 CC24 DA05 DA14

4C084 AA13 MA01 MA17 MA23 MA52 MA55 MA66 ZB262

4C085 AA02 AA03 AA13 AA14 BB01 CC22 CC23 EE01 GG03 GG04

GG08

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA41 DA76 DA86 EA28 EA31 EA51

FA74

专利名称(译)	肿瘤相关抗原		
公开(公告)号	JP2004500024A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2000615751	申请日	2000-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	百灵佳殷格翰国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰国际法理社会手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アドルフギンター ハイダーカールハインツ ゾンマーグルーバーヴォルフガング		
发明人	アドルフ ギンター ハイダー カール-ハインツ ゾンマーグルーバー ヴォルフガング		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/32 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	C07K14/4748 A61K39/00 A61K2039/5156 A61K2039/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.T A61K48/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/574.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /HA12 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4C084/AA13 4C084/MA01 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA52 4C084 /MA55 4C084/MA66 4C084/ZB262 4C085/AA02 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	中村稔 竹内英人 小川伸男 西岛隆义		
优先权	19919225 1999-04-28 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及主要相关抗原，由其衍生的免疫原性肽，编码所述肽的DNA分子及其在癌症免疫疗法中的用途。

