(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-512022
(P2004-512022A)
(43)公表日　平成16年4月22日(2004.4.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
A61K 31/7088	A61K 31/7088		4B065
A61K 35/12	A61K 35/12		4C084
A61K 38/00	A61K 39/00	H	4C085
A61K 39/00	A61K 39/39		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 183 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-510525(P2002-510525)
(86)(22)出願日　平成13年6月8日(2001.6.8)
(85)翻訳文提出日　平成14年12月9日(2002.12.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/018557
(87)国際公開番号　WO2001/096388
(87)国際公開日　平成13年12月20日(2001.12.20)
(31)優先権主張番号　60/210,899
(32)優先日　平成12年6月9日(2000.6.9)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/270,216
(32)優先日　平成13年2月20日(2001.2.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　397069329
コリクサ　コーポレイション
アメリカ合衆国　ワシントン　９８１０４，　シアトル，　コロンビア　ストリート　１１２４，スイート　２００
(74)代理人　100107489
弁理士　大塩　竹志
(72)発明者　ジアン，　ユーキュー
アメリカ合衆国　ワシントン　９８０３２，　ケント，　エス．　２３２エヌディー　ストリート　５００１
(72)発明者　ハーロッカー，　スーザン　エル．
アメリカ合衆国　ワシントン　９８１１７，　シアトル，　１３ティーエイチ　アベニュー　ダブリュー．　７５２２
最終頁に続く

(54)【発明の名称】結腸癌の治療および診断のための組成物および方法

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

【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者における免疫応答を刺激するための薬学的組成物であって、該組成物は、第一の成分および第二の成分を含み、該第一の成分は、生理学的に受容可能なキャリアおよび免疫刺激剤からなる群より選択され、そして該第二の成分は、以下：
（ａ）配列番号２３３２に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；
（ｂ）配列番号２２３５に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および
（ｃ）配列番号２２３５の配列に少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、
からなる群より選択されるポリペプチドを含む、薬学的組成物。
【請求項２】
患者における癌の処置のための薬学的組成物であって、該組成物は、第一の成分および第二の成分を含み、該該第一の成分は、生理学的に受容可能なキャリアおよび免疫刺激剤からなる群より選択され、そして該第二の成分は、以下：
（ａ）配列番号２３３２に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；
（ｂ）配列番号２２３５に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および
（ｃ）配列番号２２３５に記載の配列に少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、
からなる群より選択されるポリペプチドを含む、薬学的組成物。
【請求項３】
単離されたポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、以下：
（ａ）配列番号２２３２に提供される配列；
（ｂ）配列番号２２３２に提供される配列の相補体；
（ｃ）配列番号２２３２に提供される配列の少なくとも２０個連続する残基からなる配列；
（ｄ）配列番号２２３２に提供される配列に、中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列；
（ｅ）配列番号２２３２の配列に少なくとも７５％の同一性を有する配列；
（ｆ）配列番号２２３２の配列に少なくとも９０％の同一性を有する配列；ならびに
（ｇ）配列番号２２３２に提供される配列の縮重改変体、
からなる群より選択される配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項４】
単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：
（ａ）請求項３に記載のポリヌクレオチドによってコードされる配列；
（ｂ）請求項３に記載のポリヌクレオチドによってコードされる配列に、少なくとも７０％の同一性を有する配列、
（ｃ）請求項３に記載のポリヌクレオチドによってコードされる配列に、少なくとも９０％の同一性を有する配列、
（ｄ）配列番号２２３５において提供されるアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。
【請求項５】
発現制御配列に作動可能に連結された請求項３に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。
【請求項６】
請求項５に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた、宿主細胞。
【請求項７】
請求項４に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項８】
患者における癌の存在を検出するためのキットであって、キットは、以下：

（ａ）請求項４に記載のポリペプチドに結合する結合因子
（ｂ）該結合因子に結合するポリペプチドの量を、生物学的サンプル中で検出するための指示書；および
（ｃ）該ポリペプチドの量を、所定のカットオフ値と比較し、そしてこれから、該患者における癌の存在を決定するための指示書、
を備える、キット。
【請求項９】
請求項４に記載の少なくとも１つのポリペプチドを含む、融合タンパク質。
【請求項１０】
配列番号２２３２に列挙される配列に中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、オリゴヌクレオチド。
【請求項１１】
腫瘍タンパク質に特異的なＴ細胞を刺激および／または拡大するための方法であって、該方法は、以下：
（ａ）請求項４に記載のポリペプチド；
（ｂ）請求項３に記載のポリヌクレオチド；および
（ｃ）請求項３に記載のポリヌクレオチドを発現する抗原提示細胞、
からなる群より選択される少なくとも１つの成分と、Ｔ細胞とを、Ｔ細胞の刺激および／または拡大を可能にするのに十分な条件下および時間で接触させる工程、を包含する、方法。
【請求項１２】
請求項１１に記載の方法に従って調製されたＴ細胞を含む、単離されたＴ細胞集団。
【請求項１３】
第１の成分および第２の成分を含む組成物であって、該第１の成分は、生理学的に受容可能なキャリアおよび免疫刺激剤からなる群より選択され、そして該第２の成分は、以下：
（ａ）請求項４に記載のポリペプチド；
（ｂ）請求項３に記載のポリヌクレオチド；
（ｃ）請求項７に記載の抗体；
（ｄ）請求項９に記載の融合タンパク質；
（ｅ）請求項１２に記載のＴ細胞集団；および
（ｆ）請求項４に記載のポリペプチドを発現する抗原提示細胞、
からなる群より選択される、組成物。
【請求項１４】
患者における癌の存在を決定するためのキットであって、該キットは、以下：
（ａ）請求項１０に記載のオリゴヌクレオチド；
（ｂ）該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、生物学的サンプル中で検出するための指示書；および
（ｃ）該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、所定のカットオフ値と比較し、そしてこれから、該患者における癌の存在を決定するための指示書、
を備える、キット。
【請求項１５】
請求項１０に記載の少なくとも１つのオリゴヌクレオチドを備える、診断キット。
【請求項１６】
請求項７に記載の少なくとも１つの抗体および検出試薬を備える診断キットであって、該検出試薬がレポーター基を含む、診断キット。
【請求項１７】
患者における癌の発生を阻害するためのキットであって、該キットは、以下：
（ａ）以下：
（ｉ）請求項４に記載のポリペプチド；
（ｉｉ）請求項３に記載のポリヌクレオチド；および

（ｉｉｉ）請求項４に記載のポリペプチドを発現する抗原提示細胞、
からなる群より選択される少なくとも１つの成分；
（ｂ）Ｔ細胞が増殖するように、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を該成分とインキュベートするための指示書、
（ｃ）有効量の該増殖したＴ細胞を該患者に投与するための指示書
を備える、キット。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（発明の技術分野）
本発明は概して、癌（例えば、結腸癌）の治療および診断に関する。本発明は、より詳細には、結腸腫瘍タンパク質の少なくとも一部を含むポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。このようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、結腸悪性腫瘍の予防および処置のための、ならびにこのような癌の診断およびモニタリングのためのワクチンおよび薬学的組成物において用いられ得る。
【０００２】
（発明の背景）
癌は、世界中で、重大な健康問題である。癌の検出および治療において、進歩が成されてきたが、現在利用可能な、予防または処置のためのワクチンも他の普遍的に首尾よい方法もない。一般的に化学療法または手術および放射線療法の組み合わせに基づく現在の治療法は、多くの患者において不十分であることが証明され続けている。
【０００３】
結腸癌は、米国において二番目に高頻度で診断される悪性疾患であり、そして癌死の二番目に一般的な原因である。早期局在段階で検出された結腸直腸癌を有する患者での５年生存率は、９２％である；不幸にも、この段階で診断されるのは、結腸直腸癌の３７％に過ぎない。癌が隣接する器官またはリンパ節に伝播される場合、生存率は６４％に低下し、そして遠隔転移を有する患者では７％に低下する。
【０００４】
結腸癌の診断は、腸壁を通じた腫瘍の浸透の程度、および結節関与の存在または非存在に直接関し、結果として早期検出および処置が特に重要である。現在、診断は、便潜血検査、Ｓ状結腸鏡検査、結腸内視鏡検査、およびバリウム浣腸二重造影に関するスクリーニングアッセイの使用によって補助される。処置レジメンは、癌のタイプおよび段階によって決定され、そして手術、放射線療法、および／または化学療法を含む。手術（治療の最も一般的な形態）後の再発は、主な問題であり、そしてしばしば死亡の最終原因である。
【０００５】
これらの癌および他の癌のための治療におけるかなりの探索にもかかわらず、結腸癌は、効果的に診断および処置することが困難なままである。従って、このような癌を検出および処置するための改善された方法の必要性が存在する。本発明は、これらの必要性を満たし、さらに他の関係する利点を提供する。
【０００６】
（発明の要旨）
１つの局面において、本発明はポリヌクレオチド組成物を提供し、このポリヌクレオチド組成物は、以下：
（ａ）配列番号１～２２３４に提供される配列；
（ｂ）配列番号１～２２３４に提供される配列の相補体；
（ｃ）配列番号１～２２３４に提供される配列の少なくとも２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、７５個および１００個連続する残基からなる配列；
（ｄ）配列番号１～２２３４に提供される配列に中程度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列；
（ｅ）配列番号１～２２３４の配列に少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する配列；ならびに

（ｆ）配列番号１～２２３４に提供される配列の縮重改変体、
からなる群より選択される配列を含む。
【０００７】
１つの好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド組成物は、試験された結腸癌サンプルの少なくとも約２０％において、より好ましくは少なくとも約３０％において、そして最も好ましくは少なくとも約５０％において、正常組織のレベルの少なくとも約２倍、好ましくは少なくとも約５倍、そして最も好ましくは少なくとも約１０倍のレベルで、発現される。
【０００８】
本発明は、別の局面において、上記のポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド組成物を提供する。
【０００９】
本発明はさらに、配列番号２２３５に列挙される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド組成物を提供する。
【００１０】
特定の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドは、本明細書中にさらに記載されるように、免疫原性である。すなわち、これらは、免疫応答（特に、体液性および／または細胞性免疫応答）を誘発し得る。
【００１１】
本発明はさらに、開示されたポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド配列のフラグメント、改変体および／または誘導体を提供し、ここで、フラグメント、改変体および／または誘導体は、好ましくは、配列番号２２３５に示されるポリペプチド配列、または配列番号１～２２３４に示されるポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列の少なくとも約５０％免疫原性活性のレベル、好ましくは少なくとも約７０％そしてより好ましくは少なくとも約９０％の免疫原性活性のレベルを有する。
【００１２】
本発明はさらに、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドを含む発現ベクター、およびこのような発現ベクターで形質転換されたかまたはトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。
【００１３】
他の局面において、本発明は、上記のようなポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む薬学的組成物および生理学的に受容可能なキャリアを提供する。
【００１４】
本発明の関連した局面において、薬学的組成物（例えば、ワクチン組成物）が、予防適用または治療適用のために提供される。このような組成物は、一般に、本発明の免疫原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび免疫刺激剤（例えば、アジュバント）を含む。
【００１５】
本発明はさらに、以下を含む薬学的組成物を提供する：（ａ）本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合フラグメント、またはそれらのフラグメント；および（ｂ）生理学的に受容可能なキャリア。
【００１６】
さらなる局面において、本発明は、以下を含む薬学的組成物を提供する：（ａ）上記のようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞および（ｂ）薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤。例示的な抗原提示細胞としては、樹状細胞、マクロファージ、単球、線維芽細胞およびＢ細胞が挙げられる。
【００１７】
関連した局面において、以下を含む薬学的組成物が提供される：（ａ）上記のようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞および（ｂ）免疫刺激剤。
【００１８】
本発明はさらに、他の局面において、代表的に、生理学的に受容可能なキャリアおよび／

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

【００１９】

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

【００２０】

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

【００２１】

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

【００２２】

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

【００２３】

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

【００２４】

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

【００２５】

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

【００２６】

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

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

【００２７】

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

【００２８】

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

【００２９】

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

【００３０】

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

【００３１】

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

【００３２】

（発明の詳細な説明）

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

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

【００３３】

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

【００３４】

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

【００３５】

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

【００３６】

（ポリペプチド組成物）

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

【００３７】

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

【００３８】

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

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

【００３９】

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

【００４０】

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

【００４１】

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

【００４２】

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

【００４３】

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

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

【００４４】

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

【００４５】

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

【００４６】

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

【００４７】

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

【００４８】

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

【００４９】

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

【００５０】

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

【００５１】

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

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

【００５２】

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

【００５３】

【表１】

表１

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

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

標を割り当てられている（ＫｙｔｅおよびＤｏｏｌｉｔｔｌｅ、１９８２）。これらの値は以下である：イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；スレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５）。

【００５４】

特定のアミノ酸が類似の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換され得、そしてなお類似の生物学的活性を有するタンパク質を生じる（すなわち、生物学的に機能的に等価なタンパク質をなお入手する）ことが、当該分野において公知である。このような変化を作製する際に、その疎水性親水性指標が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、その疎水性親水性指標が±１以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そしてその疎水性親水性指標が±０．５以内であるアミノ酸の置換がなおより特に好ましい。同様なアミノ酸の置換が、親水性に基づいて有効になされ得ることもまた、当該分野で理解されている。米国特許第４，５５４，１０１号（その全体が本明細書中に参考として詳細に援用される）は、そのタンパク質の最大局所的平均親水性が、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるので、そのタンパク質の生物学的特性と相関することを言及している。

【００５５】

米国特許第４，５５４，１０１号に詳述されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋０．２）；グリシン（０）；スレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５±１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）；トリプトファン（－３．４）。アミノ酸は、類似の親水性の値を有する別のアミノ酸に置換され得、そしてなお、生物学的な等価物（特に、免疫学的に等価なタンパク質）を得ることが理解される。このような変化において、その親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、その親水性値が±１以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そしてその親水性値が±０．５以内であるアミノ酸の置換がなおより特に好ましい。

【００５６】

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

【００５７】

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

【００５８】

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

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

【００５９】

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

【００６０】

ポリペプチド配列が比較される場合、以下に記載されるように最大の一致で整列するときに２つの配列中のアミノ酸の配列が同じである場合、２つの配列は、「同一」であるといわれる。２つの配列間の比較は、代表的には、比較ウインドウによって配列を比較して、配列類似性の局所的領域を同定および比較することによって行われる。本明細書中で使用される「比較ウインドウ」とは、少なくとも約２０、通常は３０～約７５、４０～約５０の連続する位置のセグメントをいう。ここで、配列は、２つの配列が最適に整列された後、同じ数の連続する位置の参照配列と比較され得る。

【００６１】

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

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

【００６２】

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

【００６３】

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

【００６４】

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

【００６５】

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

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

【００６６】

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

【００６７】

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

【００６８】

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

【００６９】

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

【００７０】

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

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

【００７１】

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

【００７２】

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

【００７３】

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

【００７４】

好ましい他の実施形態において、免疫学的融合パートナーは、グラム陰性の細菌Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ｂの表面タンパク質である、プロテインＤ（ＷＯ９１／１８９２６）に由来する。好ましくは、プロテインＤ誘導体は、このタンパク質のほぼ3分の1（例えば、最初のＮ末端１００～１１０アミノ酸）を含み、そしてプロテインＤ誘導体は、脂質化（ｌｉｐｉｄａｔｅｄ）され得る。特定の好ましい実施形態にお

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

【００７５】

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

【００７６】

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

【００７７】

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

【００７８】

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

【００７９】

（ポリヌクレオチド組成物）

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

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

【００８０】

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

【００８１】

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

【００８２】

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

【００８３】

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

【００８４】

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

【００８５】

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

【００８６】

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

【００８７】

本発明の別の実施形態において、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントまたはその相補的な配列に対して、中程度～高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチド組成物が提供される。ハイブリダイゼーション技術は、分子生物学の当該分野において周知である。例示の目的であるが、他のポリヌクレオチドと本発明のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するために適切な中程度にストリンジェントな条件は、５×ＳＳＣ、０．５％　ＳＤＳ、１．０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）の溶液中の事前洗浄；５０℃～６０℃、５×ＳＳＣでの、一晩のハイブリダイゼーション；続いて、０．１％ＳＤＳを含有する２×、０．５×および０．２×ＳＳＣのそれぞれを用いた、６５℃で２０分間の２回の洗浄を含む。当業者は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが、例えば、ハイブリダイゼーション溶液の塩含量および／またはハイブリダイゼーションが実施される温度を変更することによって、容易に操作され得ることを理解する。例えば、別の実施形態において、適切な高いストリンジェントのハイブリダイゼーション条件としては、ハイブリダイゼーションの温度が、例えば、６０～６５℃または６５～７０℃に増大される点を除いて、上記の条件が挙げられる。

【００８８】

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

【００８９】

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

【００９０】
ポリヌクレオチド配列を比較する場合、２つの配列におけるヌクレオチドの配列が、以下に記載されるように最大一致について整列されるのと同じ場合に、２つの配列が「同一」であるといわれる。２つの配列の間の比較は、代表的には、配列類似性の局部領域を同定および比較するために、比較ウインドウにわたって配列を比較することによって行われる。本明細書中で使用される場合、「比較ウインドウ」は、少なくとも約２０、通常は３０～約７５、４０～約５０連続した位置のセグメントをいい、ここで、２つの配列が最適に整列された後に、配列は、連続した位置の同じ数の参照配列と比較され得る。
【００９１】
比較のための配列の最適な整列は、生命情報科学ソフトウエアのＬａｓｅｒｇｅｎｅスートにおけるＭｅｇａｌｉｇｎプログラム（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を使用して、デフォルトパラメーターを用いて行われ得る。このプログラムは、以下の参考文献に記載のいくつかの整列スキームを統合する：Ｄａｙｈｏｆｆ，Ｍ．Ｏ．（編）Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ ＤＣ Ｖｏｌ．５，補遺３，３４５－３５８頁におけるＤａｙｈｏｆｆ，Ｍ．Ｏ．（１９７８）Ａ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ ｃｈａｎｇｅ ｉｎ ｐｒｏｔｅｉｎｓ－Ｍａｔｒｉｃｅｓ ｆｏｒ ｄｅｔｅｃｔｉｎｇ ｄｉｓｔａｎｔ ｒｅｌａｔｉｏｎｓｈｉｐｓ．；Ｈｅｉｎ Ｊ．（１９９０）Ｕｎｉｆｉｅｄ Ａｐｐｒｏａｃｈ ｔｏ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ａｎｄ Ｐｈｙｌｏｇｅｎｅｓ ６２６－６４５頁 Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ｖｏｌ．１８３，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ；Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｄ．Ｇ．およびＳｈａｒｐ，Ｐ．Ｍ．（１９８９）ＣＡＢＩＯＳ ５：１５１－１５３；Ｍｙｅｒｓ，Ｅ．Ｗ．およびＭｕｌｌｅｒ Ｗ．（１９８８）ＣＡＢＩＯＳ ４：１１－１７；Ｒｏｂｉｎｓｏｎ，Ｅ．Ｄ．（１９７１）Ｃｏｍｂ．Ｔｈｅｏｒ １１：１０５；Ｓａｎｔｏｕ，Ｎ．Ｎｅｓ，Ｍ．（１９８７）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｅｖｏｌ．４：４０６－４２５；Ｓｎｅａｔｈ，Ｐ．Ｈ．Ａ．およびＳｏｋａｌ，Ｒ．Ｒ．（１９７３）Ｎｕｍｅｒｉｃａｌ Ｔａｘｏｎｏｍｙ－ｔｈｅ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｎｕｍｅｒｉｃａｌ Ｔａｘｏｎｏｍｙ，Ｆｒｅｅｍａｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ；Ｗｉｌｂｕｒ，Ｗ．Ｊ．およびＬｉｐｍａｎ，Ｄ．Ｊ．（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．，Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：７２６－７３０。
【００９２】
あるいは、比較のための配列の最適な整列は、ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎ（１９８１）Ａｄｄ．ＡＰＬ．Ｍａｔｈ ２：４８２の局部同定アルゴリズムによって、ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（１９７０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３の同一性整列アルゴリズムによって、ＰｅａｒｓｏｎおよびＬｉｐｍａｎ（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化した実行（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩにおけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＴＦＡＳＴＡ）によって、または検査によって行われ得る。
【００９３】
配列同一性および配列類似性の割合を決定するために適切なアルゴリズムの１つの好ましい例は、ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ２．０アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９７７）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２およびＡｌｔｓｃｈｕｌら（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０に記載される。ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ２．０は、本発明のポリヌクレオチドについての配列同一性の割合を決定するために、例えば、本明細書中に記載のパラメータを用

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

【００９４】

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

【００９５】

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

【００９６】

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

【００９７】

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

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

【００９８】

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

【００９９】

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

【０１００】

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

【０１０１】

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

【０１０２】

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

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

【０１０３】

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

【０１０４】

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

【０１０５】

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

【０１０６】

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

【０１０７】

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

【０１０８】

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

【０１０９】
小さなポリヌクレオチドセグメントまたはフラグメントは、通常は自動オリゴヌクレオチド合成機を使用して行われるので、例えば化学的手段によってフラグメントを直接合成することによって、容易に調製され得る。また、フラグメントは、核酸複製技術（例えば、米国特許第４，６８３，２０２号（本明細書中に参考として援用される）のＰＣＲ^{TM}技術）の適用によって、組換え産生のために選択配列を組換えベクターに導入することによって、および一般に分子生物学の分野の当業者に公知の他の組換えＤＮＡ技術によって、得られ得る。

【０１１０】
本発明のヌクレオチド配列は、目的の完全遺伝子または遺伝子フラグメントの相補的ストレッチを有する二重鎖分子を選択的に形成するその能力のために使用され得る。想定される適用に依存して、代表的には、標的配列に対するプローブの選択性の種々の程度を達成するために、ハイブリダイゼーションの種々の条件を使用することが望ましい。高い選択性を必要とする適用について、代表的には、ハイブリッドを形成するための比較的ストリンジェントな条件（例えば、比較的低濃度の塩、および／または高温の条件（例えば、約５０℃～約７０℃の温度で、約０．０２Ｍ～約０．１５Ｍの塩の塩濃度によって提供されるような）を使用することが望ましい。このような選択条件は、存在する場合、プローブとテンプレートまたは標的鎖との間のミスマッチにわずかに許容性であり、そして関連する配列の単離のために特に適切である。

【０１１１】
当然のことながら、いくつかの適用（例えば、潜在的なテンプレートにハイブリダイズする変異体プライマー鎖を使用する、変異体の調製が望ましい場合）について、低ストリンジェント（減少したストリンジェンシー）のハイブリダイゼーション条件は、ヘテロ二重鎖を形成するために代表的に必要とされる。これらの状況において、約２０℃～約５５℃の温度範囲で約０．１５Ｍ～約０．９Ｍの塩の条件のような塩条件を使用することが望ましくあり得る。これによって、交差ハイブリダイズ種は、コントロールハイブリダイゼーションに関して、陽性ハイブリダイズシグナルとして容易に同定され得る。任意の場合において、ホルムアミド（これは、増加した温度と同じ様式で、ハイブリッド二重鎖を不安定化するように作用する）の増加した量の添加によって、条件がよりストリンジェントになり得ることが一般に理解される。従って、ハイブリダイゼーション条件は、容易に操作され得、従って、一般に、所望の結果に依存する最良の方法である。

【０１１２】
本発明の別の実施形態に従って、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物が、提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質合成の効果的かつ標識化インヒビターであることが実証され、疾患が、疾患に寄与するタンパク質の合成を阻害することによって処置され得る治療的なアプローチを結果的に提供する。タンパク質合成を阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの効力は、よく確立されている。例えば、ポリガラクタウロナーゼ（ｐｏｌｙｇａｌａｃｔａｕｒｏｎａｓｅ）の合成およびムスカリン２型アセチルコリンレセプターは、そのそれぞれのｍＲＮＡ配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される（米国特許第５，７３９，１１９号および米国特許第５，７５９，８２９号）。さらに、アンチセンス阻害の例が、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子（ＭＤＧ１）、ＩＣＡＭ－１、Ｅ－セレクチン、ＳＴＫ－１、線条体$GABA_A$レセプターおよびヒトＥＧＦを用いて示されている（Ｊａｓｋｕｌｓｋｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８８ Ｊｕｎ １０；２４０（４８５８）：１５４４－６；ＶａｓａｎｔｈａｋｕｍａｒおよびＡｈｍｅｄ、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｏｍｍｕｎ．１９８９；１（４）：２２５－３２；Ｐｅｒｉｓら、Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ Ｍｏｌ Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．１９９８ Ｊｕｎ １５；５７（２）３１０－２０；米国特許第５，８０１，１５４号；同第５，７８９，５７３号；同第５，７１８，７０９号および同第５，６１０，２８８号）。種々の異常な細胞増殖（例えば、癌）を阻害しそして処置するために使用され得る、アンチセンス構築物もまた、記載されている（米国特許第５，７４７

，４７０号；同第５，５９１，３１７号および同第５，７８３，６８３号）。

【０１１３】

従って、特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるポリヌクレオチド配列に特異的に結合し得る任意の配列もしくはその相補体のすべてまたは一部を含む、オリゴヌクレオチド配列を提供する。１つの実施形態において、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、そのオリゴヌクレオチドは、ＲＮＡまたはその誘導体を含む。第３の実施形態において、そのオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート改変骨格を含む、改変ＤＮＡである。第４の実施形態において、そのオリゴヌクレオチド配列は、ペプチド核酸またはその誘導体を含む。各場合において、好ましい組成物は、本明細書中に開示されるポリヌクレオチドのうちの１つ以上の部分に相補的な、より好ましくは実質的に相補的な、そしてさらにより好ましくは完全に相補的な、配列領域を含む。所定の遺伝子配列に特異的なアンチセンス組成物の選択は、選択された標的配列の分析に基き、そして二次構造、T_m、結合エネルギー、および相対的安定性の決定に基く。アンチセンス組成物は、二量体、ヘアピン、または宿主細胞において標的ｍＲＮＡへの特異的結合を減少または妨げる他の二次構造をそれらが形成できない相対的能力に基づいて選択され得る。ｍＲＮＡの非常に好ましい標的領域は、ＡＵＧ翻訳開始コドンの領域またはその付近の領域、およびｍＲＮＡの５’領域と実質的に相補的な配列である。これらの二次構造分析および標的部位選択の考慮は、例えば、ＯＬＩＧＯプライマー分析ソフトウェアのｖ．４および／またはＢＬＡＳＴＮ　２．０．５アルゴリズムソフトウェア（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９９７，２５（１７）：３３８９－４０２）を使用して実施され得る。

【０１１４】

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

【０１１５】

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

【０１１６】

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

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

【０１１７】

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

【０１１８】

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

【０１１９】

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

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

【０１２０】

リボザイムの活性は、リボザイムの結合アームの長さを変更することにより、または血清リボヌクレアーゼによる分解を防ぐ改変（例えば、国際特許出願番号ＷＯ　９２／０７０６５；国際特許公開番号ＷＯ　９３／１５１８７；国際特許出願公開番号ＷＯ　９１／０３１６２；欧州特許出願公開番号９２１１０２９８．４；米国特許第５，３３４，７１１号、および国際特許出願公開番号ＷＯ　９４／１３６８８（これには、酵素学的ＲＮＡ分子の糖部分に対して成され得る、種々の化学的修飾が記載される）を参照のこと）、細胞中でのリボザイムの有効性を増強する改変、ならびにＲＮＡの合成時間を短縮および化学的必要性を低下させるための幹（ｓｔｅｍ）ＩＩ塩基を除去して、リボザイムを化学的に合成することによって最適化され得る。

【０１２１】

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

【０１２２】

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

【０１２３】

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

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

【０１２４】

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

【０１２５】

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

【０１２６】

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

【０１２７】

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

ｃｏｒｔｉ－Ｐａｓｓｅｒｉｎｉら、Ｂｌｏｏｄ、１９９６　８月　１５；８８（４）：１４１１～７；Ａｒｍｉｔａｇｅら、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ、１９９７　１１月　１１；９４（２３）：１２３２０～５；Ｓｅｅｇｅｒら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、１９９７　９月；２３（３）：５１２～７）。米国特許第５，７００，９２２号は、ＰＮＡ－ＤＮＡ－ＰＮＡキメラ分子および診断におけるその分子の使用、生物体におけるタンパク質の調節、ならびに治療に対して影響を受け易い状態の処置について議論する。

【０１２８】

ＰＮＡのアンチセンス結合特性を特徴づけする方法は、Ｒｏｓｅ（Ａｎａｌ　Ｃｈｅｍ、１９９３　１２月　１５；６５（２４）：３５４５～９）およびＪｅｎｓｅｎら（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、１９９７　４月　２２；３６（１６）：５０７２～７）において議論される。Ｒｏｓｅは、キャピラリーゲル電気泳動を使用して、相対的な結合速度論および化学量論を測定することで、ＰＮＡのそれらの相補的オリゴヌクレオチドに対する結合を決定する。同様のタイプの測定が、ＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}　技術を使用してＪｅｎｓｅｎらによってなされた。

【０１２９】

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

【０１３０】

（ポリヌクレオチドの同定、特徴づけおよび発現）

本発明のポリヌクレオチド組成物は、種々の十分に確立された技術のいずれかを使用して、同定、調製および／または操作され得る（一般に、Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９、および他の類似の参考文献を参照のこと）。例えば、ポリヌクレオチドは、以下により詳細に記載されるように、ｃＤＮＡのマイクロアレイを腫瘍に関連する発現（すなわち、本明細書中で提供される代表的なアッセイを使用して決定する場合、正常な組織における発現よりも、少なくとも２倍高い腫瘍での発現）についてスクリーニングすることによって、以下により詳細に記載されるように同定され得る。このようなスクリーニングは、例えば、製造者の指示に従って、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ、ＣＡ）のマイクロアレイ技術を使用して、（そして本質的にＳｃｈｅｎａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１０６１４～１０６１９，１９９６およびＨｅｌｌｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４：２１５０～２１５５，１９９７に記載されるように）、行われ得る。あるいは、ポリヌクレオチドは、本明細書中に記載されるタンパク質を発現する細胞（例えば、腫瘍細胞）から調製されるｃＤＮＡから増幅され得る。

【０１３１】

多数のテンプレート依存性プロセスが、サンプル中に存在する目的の標的配列を増幅するために利用可能である。最もよく知られた増幅方法の１つは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ^{TM}）であり、これは、米国特許第４，６８３，１９５号、同第４，６８３，２０２号、および同第４，８００，１５９号に詳細に記載され、これらの各々はその全体が本明細書中に参考として援用される。手短に言えば、ＰＣＲ^{TM}においては、標的配列の向かい合った相補鎖上の領域に対して相補的な２つのプライマー配列が調製される。過剰のデオキシヌクレオシド三リン酸を、ＤＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔａｑポリメラーゼ）とともに反応混合液に添加する。標的配列がサンプル中に存在する場合、プライマーはその標的に結合し、そしてポリメラーゼは、ヌクレオチドを付加することによって標的配列に沿ってプライマーを伸長させる。反応混合液の温度を上昇および下降させることによって、伸長したプライマーは、標的から解離して反応生成物を形成し、過剰のプライマーは標

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

【０１３２】

多くの他のテンプレート依存性プロセスのいずれか（この多くは、ＰＣＲ^{TM}増幅技術のバリエーションである）は、当該分野で容易に知られており、利用可能である。例示として、いくつかのこのような方法としては、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲともいわれる）（例えば、欧州特許出願公開番号３２０，３０８号、米国特許第４，８８３，７５０号において記載される）；Ｑβレプリカーゼ（ＰＣＴ国際特許出願公開番号ＰＣＴ／ＵＳ８７／０８８０に記載される）；鎖置換増幅（Ｓｔｒａｎｄ Ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）（ＳＤＡ）および修復鎖反応（Ｒｅｐａｉｒ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ）（ＲＣＲ）が挙げられる。なお他の増幅法は、英国特許出願番号２ ２０２ ３２８号およびＰＣＴ国際特許出願公開番号ＰＣＴ／ＵＳ８９／０１０２５において記載される。他の核酸増幅手順には、転写に基づく増幅系（ＴＡＳ）（ＰＣＴ国際特許出願公開番号ＷＯ ８８／１０３１５）が挙げられ、これには、核酸配列に基づく増幅（ＮＡＳＢＡ）および３ＳＲが含まれる。欧州特許出願公開番号３２９，８２２は、一本鎖ＲＮＡ（「ｓｓＲＮＡ」）、ｓｓＤＮＡ、および二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）をサイクル的に合成する工程を包含する核酸増殖プロセスを記載する。ＰＣＴ国際特許出願公開番号ＷＯ ８９／０６７００は、プロモーター／プライマー配列の標的一本鎖ＤＮＡ（「ｓｓＤＮＡ」）へのハイブリダイゼーションに基づく核酸配列増幅スキーム、引き続くこの配列の多くのＲＮＡコピーの転写を記載する。「ＲＡＣＥ」（Ｆｒｏｈｍａｎ、１９９０）および「片側（ｏｎｅ－ｓｉｄｅｄ）ＰＣＲ」（Ｏｈａｒａ、１９８９）のような他の増幅方法もまた、当業者に周知である。

【０１３３】

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

【０１３４】

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

【０１３５】

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

【０１３６】

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

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

【０１４０】

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

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

【０１４１】

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

【０１４２】

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

【０１４３】

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

【０１４４】

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

【０１４５】

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

【０１４６】

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

【０１４７】

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

【０１４８】

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

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

【０１４９】

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

【０１５０】

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

【０１５１】

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

【０１５２】

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

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

【０１５３】

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

【０１５４】

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

【０１５５】

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

【０１５６】

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

【０１５７】
ポリヌクレオチドコード化産物に特異的なポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体のいずれかを使用して、ポリヌクレオチドコード化産物の発現を検出および測定するための種々のプロトコルは、当該分野において公知である。例としては、酵素結合免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）および蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）が挙げられる。所定のポリペプチド上の２つの非干渉性エピトープに対して反応性であるモノクローナル抗体を利用する２つの部位の、モノクローナルベースのイムノアッセイが、いくつかの適用のために好まれ得るが、競合的結合アッセイもまた、利用され得る。これらのアッセイおよび他のアッセイは、とりわけＨａｍｐｔｏｎ，Ｒ．ら、（１９９０；Ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＡＰＳ Ｐｒｅｓｓ，Ｓｔ Ｐａｕｌ．Ｍｉｎｎ．）およびＭａｄｄｏｘ，Ｄ．Ｅ．ら、（１９８３；Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１５８：１２１１－１２１６）に記載される。

【０１５８】
広範に種々の標識技術および結合技術は、当業者に公知であり、そして種々の核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにおいて使用され得る。ポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識されたハイブリダイゼーションまたはＰＣＲプローブを作製するための手段としては、オリゴ標識（ｏｌｉｇｏｌａｂｅｌｉｎｇ）、ニックトランスレーション、末端標識または標識されたヌクレオチドを使用するＰＣＲ増幅が挙げられる。あるいは、ｍＲＮＡプローブの産生のために、配列またはその任意の部分が、ベクター内にクローニングされ得る。そのようなベクターは、当該分野において公知であり、市販されており、そして適切なＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ７、Ｔ３、またはＳＰ６）および標識されたヌクレオチドを添加することにより、ＲＮＡプローブをインビトロで合成するために使用され得る。これらの手順は、種々の市販キットを使用して実施され得る。使用され得る適切なレポーター分子または標識としては、放射性核種、酵素、蛍光、化学発光、または色素形成剤ならびに基質、コファクター（補因子）、インヒビター、磁気粒子などが挙げられる。

【０１５９】
目的のポリヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、タンパク質の発現および細胞培養物からの回収に適した条件下において培養され得る。組換え細胞により産生されたタンパク質は、使用された配列および／またはベクターに依存して、細胞内に分泌され得るかまたは含まれ得る。当業者によって理解されるように、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜または真核細胞膜を介して、コードされたポリペプチドの分泌を指向するシグナル配列を含むように設計され得る。他の組換え構築物を使用して、目的のポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に結合させ得る。そのような精製促進ドメインとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：固定された金属上での精製を可能にする金属キレート化ペプチド（例えば、ヒスチジン－トリプトファンモジュール）、固定された免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインＡドメイン、およびＦＬＡＧＳ伸長／アフィニティー精製システム（Ｉｍｍｕｎｅｘ Ｃｏｒｐ．，Ｓｅａｔｔｌｅ，Ｗａｓｈ．）において利用されるドメイン。精製ドメインとコードされるポリペプチドとの間への、切断可能なリンカー配列（例えば、第ＸＡ因子またはエンテロキナーゼに対して特異的な配列（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．））の封入を使用して、精製を促進させ得る。そのような発現ベクターの１つは、目的のポリペプチドを含む融合タンパク質およびチオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位の前に６つのヒスチジン残基をコードする核酸の発現を提供する。ヒスチジン残基は、Ｐｏｒａｔｈ，Ｊ．ら、（１９９２、Ｐｒｏｔ．Ｅｘｐ．Ｐｕｒｉｆ．３：２６３－２８１）に記載されるように、ＩＭＩＡＣ（固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー）上での精製を促進する一方で、エンテロキナーゼ切断部位は、融合タンパク質から所望のポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターの考察は、

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

【０１６０】

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

【０１６１】

（抗体組成物、そのフラグメントおよび他の結合因子）

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

【０１６２】

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

【０１６３】

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

【０１６４】

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

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

【０１６５】

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

【０１６６】

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

【０１６７】

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

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

【０１６８】

抗体分子の免疫学的結合特性を示し得る抗原結合部位を含む多くの治療的に有効な分子が、当該分野で公知である。このタンパク質分解性酵素パパインは、優先的に、ＩｇＧ分子を切断して、いくつかのフラグメントを生じさせ、これら（「Ｆ（ａｂ）フラグメント」）のうちの２つの各々は、インタクトな抗原結合部位を含む共有結合ヘテロダイマーを含む。酵素ペプシンは、ＩｇＧ分子を切断して、いくつかのフラグメント（両方の抗原結合部位を含む「$Ｆ（ａｂ’）_2$」フラグメントを含む）を提供し得る。「Ｆｖ」フラグメントは、ＩｇＭ、および稀有な場合にはＩｇＧまたはＩｇＡ免疫グロブリン分子の優先的なタンパク質分解的切断によって生成され得る。しかし、Ｆｖフラグメントは、当該分野で公知の組換え技術を使用して、より一般的に誘導される。Ｆｖフラグメントは、非共有結合的な$Ｖ_Ｈ$：：$Ｖ_Ｌ$ヘテロダイマーを含み、このヘテロダイマーは、ネイティブな抗体分子の抗原認識および結合能力のほとんどを保持する抗原結合部位を含む。Ｉｎｂａｒら（１９７２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ６９：２６５９－２６６２；Ｈｏｃｈｍａｎら（１９７６）Ｂｉｏｃｈｅｍ １５：２７０６－２７１０；およびＥｈｒｌｉｃｈら（１９８０）Ｂｉｏｃｈｅｍ １９：４０９１－４０９６。

【０１６９】

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

【０１７０】

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

【０１７１】

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

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

【０１７２】

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

【０１７３】

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

【０１７４】

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

。

【０１７５】

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

【０１７６】

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

【０１７７】

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

【０１７８】

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

【０１７９】

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

【０１８０】

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

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

【０１８１】

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

【０１８２】

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

【０１８３】

（Ｔ細胞組成物）

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

【０１８４】

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

【０１８５】

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

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

【０１８６】

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

【０１８７】

（Ｔ細胞レセプター組成物）

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

【０１８８】

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

【０１８９】

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

【０１９０】

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

【０１９１】

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

【０１９２】

（薬学的組成物）

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

【０１９３】

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

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

【０１９４】

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

【０１９５】

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

【０１９６】

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

【０１９７】

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

【０１９８】
さらに、多数の例示的なアデノウイルスに基づく系もまた、記載されている。宿主ゲノムに組込むレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、染色体外に残り、このようにして、挿入変異誘発に関連する危険性を最小化する（Ｈａｊ－ＡｈｍａｄおよびＧｒａｈａｍ（１９８６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５７：２６７－２７４；Ｂｅｔｔら（１９９３）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６７：５９１１－５９２１；Ｍｉｔｔｅｒｅｄｅｒら（１９９４）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７１７－７２９；Ｓｅｔｈら（１９９４）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６８：９３３－９４０；Ｂａｒｒら（１９９４）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：５１－５８；Ｂｅｒｋｎｅｒ，Ｋ．Ｌ．（１９８８）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：６１６－６２９；ならびにＲｉｃｈら（１９９３）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：４６１－４７６）。

【０１９９】
種々のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター系もまた、ポリヌクレオチド送達に関して開発されている。ＡＡＶベクターは、当該分野で周知の技術を用いて容易に構築され得る。例えば、米国特許第５，１７３，４１４号および同第５，１３９，９４１号；国際公開番号ＷＯ ９２／０１０７０およびＷＯ ９３／０３７６９；Ｌｅｂｋｏｗｓｋｉら（１９８８）Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．８：３９８８－３９９６；Ｖｉｎｃｅｎｔら（１９９０）Ｖａｃｃｉｎｅｓ ９０（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）；Ｃａｒｔｅｒ，Ｂ．Ｊ．（１９９２）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３：５３３－５３９；Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｎ．（１９９２）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７－１２９；Ｋｏｔｉｎ，Ｒ．Ｍ．（１９９４）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３－８０１；ＳｈｅｌｌｉｎｇおよびＳｍｉｔｈ（１９９４）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：１６５－１６９；ならびにＺｈｏｕら（１９９４）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７９：１８６７－１８７５を参照のこと。

【０２００】
遺伝子移入による、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを送達するのに有用なさらなるウイルスベクターとしては、ポックスウイルスのファミリー（例えば、ワクシニアウイルスおよび鳥類ポックスウイルス）から誘導されるものが挙げられる。例として、新規分子を発現するワクシニアウイルスの組換え体は、以下のように構築され得る。ポリペプチドをコードするＤＮＡを最初に、ワクシニアプロモーターおよび隣接ワクシニアＤＮＡ配列（例えば、チミジンキナーゼ（ＴＫ）をコードする配列）に隣接するように、適切なベクターに挿入する。次いで、このベクターを使用して、ワクシニアで同時に感染させる細胞にトランスフェクトする。相同組換えによって、ワクシニアプロモーターおよび目的のポリペプチドをコードする遺伝子を、ウイルスゲノムに挿入する。生じるＴＫ．ｓｕｐ．（－）組換え体を、５－ブロモデオキシウリジンの存在下でこの細胞を培養し、そして５－ブロモデオキシウリジンに耐性のウイルスプラークをピックアップすることによって、選択し得る。

【０２０１】
ワクシニアに基づく感染／トランスフェクション系は、生物の宿主細胞における、本明細書中に記載される１つ以上のポリペプチドの誘導可能な一過性発現または同時発現を提供するために、好都合に使用され得る。この特定の系において、細胞を最初に、インビトロで、バクテリオファージＴ７ ＲＮＡポリメラーゼをコードするワクシニアウイルスの組換え体で感染させる。このポリメラーゼは、それがＴ７プロモーターを保有するテンプレートのみを転写する点で、鋭敏な特異性を示す。感染後、細胞を、Ｔ７プロモーターによって駆動される目的のポリヌクレオチドでトランスフェクトさせる。ワクシニアウイルスの組換え体から細胞質中で発現されるポリメラーゼは、トランスフェクトされたＤＮＡをＲＮＡに転写し、このＲＮＡは次いで、宿主翻訳機構によってポリペプチドに翻訳される。この方法は、大量のＲＮＡおよびその翻訳産物の、高レベルで一過性の細胞質産生を提供する。例えば、Ｅｌｒｏｙ－ＳｔｅｉｎおよびＭｏｓｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａ

ｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９０）８７：６７４３－６７４７；Ｆｕｅｒｓｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８６）８３：８１２２－８１２６を参照のこと。

【０２０２】

あるいは、アビポックスウイルス（ａｖｉｐｏｘｖｉｒｕｓ）（例えば、鶏痘ウイルスおよびカナリア痘ウイルス）もまた使用されて、目的のコード配列を送達し得る。哺乳動物病原体由来の免疫原を発現する組換えアビポックスウイルスは、非鳥類種に投与された場合に、防御免疫を与えることが公知である。アビポックスベクターの使用は、ヒトおよび他の哺乳動物種において特に望ましい。なぜなら、アビポックス属のメンバーは、感受性の鳥類種においてのみ生産的に複製し得、故に、哺乳動物細胞において感染性ではないからである。組換えアビポックスウイルスを産生するための方法は、当該分野で公知であり、そしてワクシニアウイルスの産生に関して上記に記載されるように、遺伝子組換えを使用する。例えば、ＷＯ　９１／１２８８２；ＷＯ　８９／０３４２９；およびＷＯ　９２／０３５４５を参照のこと。

【０２０３】

任意の多数のアルファウイルスベクターもまた、本発明のポリヌクレオチド組成物の送達のために使用され得、これらとしては、米国特許第５，８４３，７２３号；同第６，０１５，６８６号；同第６，００８，０３５号および同第６，０１５，６９４号に記載されるベクターが挙げられる。ベネズエラウマ脳脊髄炎（ＶＥＥ）に基づく特定のベクターもまた、使用され得、この例示的な例は、米国特許第５，５０５，９４７号および同第５，６４３，５７６号に見出され得る。

【０２０４】

さらに、分子結合体化ベクター（例えば、Ｍｉｃｈａｅｌら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９９３）２６８：６８６６～６８６９およびＷａｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９２）８９：６０９９～６１０３に記載のアデノウイルスキメラベクター）もまた、本発明における遺伝子送達に用いられ得る。

【０２０５】

これらおよび他の公知のウイルスベースの送達系に対するさらなる例示的情報は、例えば、以下に見出され得る：Ｆｉｓｈｅｒ－Ｈｏｃｈら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：３１７～３２１、１９８９；Ｆｌｅｘｎｅｒら、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．５６９：８６～１０３、１９８９；Ｆｌｅｘｎｅｒら、Ｖａｃｃｉｎｅ　８：１７～２１、１９９０；米国特許第４，６０３，１１２号、同第４，７６９，３３０号および同第５，０１７，４８７号；ＷＯ８９／０１９７３；米国特許第４，７７７，１２７号；ＧＢ　２，２００，６５１：ＥＰ　０，３４５，２４２号；ＷＯ　９１／０２８０５；Ｂｅｒｋｎｅｒ、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　６：６１６～６２７、１９８８；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５２：４３１～４３４、１９９１；Ｋｏｌｌｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９１：２１５～２１９、１９９４；Ｋａｓｓ－Ｅｉｓｌｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：１１４９８～１１５０２、１９９３；Ｇｕｚｍａｎら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　８８：２８３８～２８４８、１９９３；ならびにＧｕｚｍａｎら、Ｃｉｒ．Ｒｅｓ．７３：１２０２～１２０７、１９９３。

【０２０６】

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

【０２０７】
本発明の別の実施形態において、例えば、Ｕｌｍｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：１７４５～１７４９、１９９３に記載され、そしてＣｏｈｅｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：１６９１～１６９２、１９９３によって概説されるように、ポリヌクレオチドは、「裸の」ＤＮＡとして投与／送達される。裸のＤＮＡの取り込みは、生分解性ビーズ（これは、細胞に効率的に輸送される）上にそのＤＮＡをコーティングすることによって増加され得る。

【０２０８】
なお別の実施形態において、本発明の組成物は、微粒子銃アプローチ（その多くが記載されている）を介して送達され得る。１つの代表的な例において、ガス駆動粒子加速（ｇａｓ－ｄｒｉｖｅｎ ａｃｃｅｌｅｒａｔｉｏｎ）は、Ｐｏｗｄｅｒｊｅｃｔ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ ＰＬＣ（Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ）およびＰｏｗｄｅｒｊｅｃｔ Ｖａｃｃｉｎｅｓ Ｉｎｃ．（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）によって製造されたデバイスのようなデバイスで達成され得る。そのいくつかの例は、米国特許第５，８４６，７９６号；同第６，０１０，４７８号；同第５，８６５，７９６号；同第５，５８４，８０７号；および欧州特許番号第０５００７９９号に記載されている。このアプローチは、注射針のない（無注射針）（ニードルフリー）送達アプローチを提供する。ここでは、微視的な粒子（例えば、ポリヌクレオチド粒子、またはポリペプチド粒子）の乾燥粉末処方物を、手持ちデバイスによって生成されたヘリウムガスジェット内で高速に加速し、目的の標的組織内へ粒子を噴射する。

【０２０９】
関連の実施形態において、本発明の組成物のガス駆動注射針なし注入に有用であり得る他のデバイスおよび方法は、Ｂｉｏｊｅｃｔ，Ｉｎｃ．（Ｐｏｒｔｌａｎｄ，ＯＲ）によって提供されるものが挙げられ、そのいくつかの例は、米国特許第４，７９０，８２４号；同第５，０６４，４１３号；同第５，３１２，３３５号；同第５，３８３，８５１号；同第５，３９９，１６３号；同第５，５２０，６３９号；および同第５，９９３，４１２号に記載されている。

【０２１０】
別の実施形態に従って、本明細書に記載される薬学的組成物は、本発明の免疫原性ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、Ｔ細胞、ＴＣＲ、および／またはＡＰＣの組成物に加えて、１つ以上の免疫賦活剤（免疫刺激因子）を含む。免疫賦活剤とは、本質的に、外因性抗原に対する免疫応答（抗体および／または細胞媒介）を増大または増強する任意の物質をいう。免疫賦活剤の１つの好ましい型は、アジュバントを含む。多くのアジュバントは、迅速な異化作用から抗原を保護するように設計された物質（例えば、水酸化アルミニウムまたは鉱油）および免疫応答の刺激物質（例えば、脂質Ａ、Ｂｏｒｔａｄｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｓｉｓまたはＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ誘導化タンパク質）を含む。特定のアジュバント、例えば、フロイント不完全アジュバントおよびフロイント完全アジュバント（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ）；Ｍｅｒｃｋ Ａｄｊｕｖａｎｔ ６５（Ｍｅｒｃｋ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｉｎｃ．，Ｒａｈｗａｙ，ＮＪ）；ＡＳ－２（ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ）；アルミニウム塩（例えば、水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウム）；カルシウム，鉄または亜鉛の塩；アシル化チロシンの不溶性懸濁液；アセチル化糖；カチオンの誘導化多糖またはアニオンの誘導化多糖；ポリフォスファーゼン（ｐｏｌｙｐｈｏｓｐｈａｚｅｎｅ）；生分解性ミクロスフェア：モノホスホリル脂質Ａおよびモノホスホリルクイル（ｑｕｉｌ）Ａとして、市販されている。サイトカイン（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、インターロイキン－２、インターロイキン－７、インターロイキン－１２および成長因子のような他のもの）はまた、アジュバントとして使用され得る。

【０２１１】
本発明の特定の実施形態において、アジュバント組成物は、Ｔｈ１型の免疫応答を優勢に

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

【０２１２】

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

【０２１３】

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

【０２１４】

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

【０２１５】
別の強化されたアジュバント系は、ＣｐＧ含有オリゴヌクレオチドとサポニン誘導体の組み合わせを含み、特にＣｐＧとＱＳ２１の組み合わせがＷＯ００／０９１５９に開示されている。好ましくは、この処方物は、さらに、水中油型エマルジョンおよびトコフェノールを含む。
【０２１６】
本発明の薬学的組成物における使用のためのさらなる代表的アジュバントとしては、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ ＩＳＡ ７２０（Ｓｅｐｐｉｃ，Ｆｒａｎｃｅ）、ＳＡＦ（Ｃｈｉｒｏｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ）、ＩＳＣＯＭＳ（ＣＳＬ）、ＭＦ－５９（Ｃｈｉｒｏｎ）、アジュバントのＳＢＡＳシリーズ（例えば、ＳＢＡＳ－２またはＳＢＡＳ－４（ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ、Ｒｉｘｅｎｓａｒｔ、Ｂｅｌｇｉｕｍから入手可能）、Ｄｅｔｏｘ（Ｅｎｈａｎｚｙｎ（登録商標））（Ｃｏｒｉｘａ，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，ＭＴ）、ＲＣ－５２９（Ｃｏｒｉｘａ，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，ＭＴ）および他のアミノアルキルグルコサミニド４－ホスフェート（ＡＧＰ）（例えば、係属中の米国出願登録番号０８／８５３，８２６および０９／０７４，７２０（これらの開示は、その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されるアジュバント）、ならびにＷＯ ９９／５２５４９Ａ１に記載のポリオキシエチレンエーテルアジュバントのようなアジュバントが挙げられる。
【０２１７】
他の好ましいアジュバントは、一般式：
（Ｉ）ＨＯ（$CH_2CH_2O)_n$－Ａ－Ｒ
のアジュバント分子を含み、
ここで、ｎは、１～５０であり、Ａは、単結合または－Ｃ（Ｏ）－であり、Ｒは、$C_{1\sim50}$アルキルまたはフェニル$C_{1\sim50}$アルキルである。
【０２１８】
本発明の１つの実施形態は、一般式（Ｉ）のポリオキシエチレンエーテルを含むワクチン処方物からなり、ここで、ｎは、１と５０との間、好ましくは４～２４、最も好もしくは９であり、このＲ成分は、$C_{1\sim50}$、好ましくはC_4～C_{20}アルキル、そして最も好ましくはC_{12}アルキルであり、そしてＡは、結合である。ポリオキシエチレンエーテルの濃度は、０．１～２０％の範囲、好ましくは０．１～１０％、そして最も好ましくは０．１～１％の範囲にあるべきである。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群から選択される：ポリオキシエチレン－９－ラウロイルエーテル、ポリオキシエチレン－９－ステアリル（ｓｔｅｏｒｙｌ）エーテル、ポリオキシエチレン－８－ステアリル（ｓｔｅｏｒｙｌ）エーテル、ポリオキシエチレン－４－ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン－３５－ラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン－２３－ラウリルエーテル。ポリオキシエチレンラウリルエーテルのようなポリオキシエチレンエーテルは、Ｍｅｒｃｋインデックス（第１２版、７７１７項目）に記載される。これらのアジュバント分子は、ＷＯ９９／５２５４９に記載される。
【０２１９】
上記の一般式（Ｉ）に従うポリオキシエチレンエーテルは、所望の場合、別のアジュバントと組み合わせられ得る。例えば、好ましいアジュバントの組み合わせは、好ましくは、係属中の英国特許出願第ＧＢ９８２０９５６．２号に記載されるようなＣｐＧとの組み合わせである。
【０２２０】
本発明の別の実施形態に従って、本明細書に記載される免疫原性組成物は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）（例えば、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、単球、および有効なＡＰＣであるように操作され得る他の細胞）を介して宿主に送達される。このような細胞は、抗原を提示する能力を増大するように、Ｔ細胞応答の活性化および／または維持を改良するように、それ自体で抗腫瘍効果を有するように、そして／あるいは受け手と免疫学的に適合性（すなわち、一致するＨＬＡハプロタイプ）であるように遺伝学的に改変されてもよい

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

【０２２１】

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

【０２２２】

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

【０２２３】

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

【０２２４】

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

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

【０２２５】

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

【０２２６】

このような薬学的組成物内での使用のためのキャリアは、生体適合性であり、そしてまた生分解性であり得る。特定の実施形態において、好ましくは、この処方物は比較的一定レベルの活性成分の放出を提供する。しかし、他の実施形態において、投与直後のより迅速な放出速度が所望され得る。このような組成物の処方は十分に、公知の技術を使用する当業者のレベル内である。この点に関して有用な例示的なキャリアとしては、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）、ポリアクリレート、ラテックス、デンプン、セルロース、デキストランなどの微粒子が挙げられる。他の例示的な徐放性キャリアとしては、非液性（ｎｏｎ－ｌｉｑｕｉｄ）親水性コア（例えば、架橋ポリサッカリドまたはオリゴサッカリド）を含む超分子バイオベクター、ならびに必要に応じて、両親媒性化合物を含む外部層（例えば、リン脂質）（例えば、米国特許第５，１５１，２５４号およびＰＣＴ出願ＷＯ９４／２００７８、ＷＯ／９４／２３７０１およびＷＯ９６／０６６３８を参照のこと）を含む超分子バイオベクターが挙げられる。徐放性処方物内に含まれる活性な化合物の量は、移植の部位、放出の速度および予期される持続期間、ならびに処置または予防されるべき状態の性質に依存する。

【０２２７】

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

【０２２８】

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

【０２２９】

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

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

【０２３０】

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

【０２３１】

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

【０２３２】

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

【０２３３】

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

【０２３４】

代表的に、これらの処方物は、少なくとも約０．１％またはそれよりも多い活性化合物を含むが、活性成分の割合は、もちろん、変化し得、そして好都合に、全処方物の重量または体積の約１または２％と、約６０％または７０％以上のとの間であり得る。当然、治療的に有用な組成物の各々の中の活性化合物の量は、適切な投薬量が、化合物の任意の所定の単位用量において得られるような様式で、調製され得る。溶解度、バイオアベイラビリティー、生物学的半減期、投与の経路、製品の有効期限のような因子、および他の薬理学的考慮が、このような薬学的処方物を調製する分野の当業者によって意図され、そして、種々の投薬量および処置レジメンはそれ自体が、所望され得る。

【０２３５】

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

【０２３６】

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

【０２３７】

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

【０２３８】

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

【０２３９】

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

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

【０２４０】

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

【０２４１】

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

【０２４２】

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

【０２４３】

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

【０２４４】

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

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

【０２４５】

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

【０２４６】

あるいは、他の実施形態において、本発明は、本発明の組成物の薬学的に受容可能なナノカプセル処方物を提供する。ナノカプセルは一般に、化合物を安定かつ再現可能な様式で捕獲し得る（例えば、Ｑｕｉｎｔａｎａｒ－Ｇｕｅｒｒｅｒｏら、Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ Ｉｎｄ Ｐｈａｒｍ．１９９８ Ｄｅｃ；２４（１２）：１１１３－２８を参照のこと）。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を回避するために、このような超微粒子（約０．１μｍのサイズ）は、インビボで分解され得るポリマーを使用して設計され得る。このような粒子は、例えば、Ｃｏｕｖｒｅｕｒら、Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｔｈｅｒ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．１９８８；５（１）：１－２０；ｚｕｒ Ｍｕｈｌｅｎら、Ｅｕｒ Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｂｉｏｐｈａｒｍ．１９９８ Ｍａｒ；４５（２）：１４９－５５；Ｚａｍｂａｕｘら、Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ．１９９８ Ｊａｎ ２；５０（１－３）：３１－４０；および米国特許第５，１４５，６８４号に記載されるようにして作製され得る。

【０２４７】

（癌治療法）

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

【０２４８】

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

【０２４９】

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

【０２５０】

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

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

【０２５１】

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

【０２５２】

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

【０２５３】

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

【０２５４】

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

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

【０２５５】

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

【０２５６】

本明細書中に記載される治療的組成物の投与の経路および頻度、ならびに投薬量は、個々人で異なり、そして標準的技術を用いて容易に確立され得る。概して、薬学的組成物およびワクチンは、注射（例えば、皮内、筋肉内、静脈内、または皮下）により、経鼻的に（例えば、吸引により）または経口的に、投与され得る。好ましくは、５２週間にわたって１～１０用量の間が投与され得る。好ましくは、１ヶ月の間隔で６用量が投与され、そしてブースター（追加）ワクチン接種がその後定期的に与えられ得る。交互のプロトコールが個々の患者に適切であり得る。適切な用量は、上記のように投与された場合、抗腫瘍免疫応答を促進し得、そして基底（すなわち、未処置）レベルより少なくとも１０～５０％上である、化合物の量である。このような応答は、患者内の抗腫瘍抗体を測定することによってか、または患者の腫瘍細胞をインビトロで殺傷し得る細胞溶解性エフェクター細胞のワクチン依存性の生成によってモニターされ得る。このようなワクチンはまた、ワクチン接種されていない患者と比較すると、ワクチン接種された患者において、改善された臨床的結果（例えば、より頻繁な寛解、完全もしくは部分的に疾患を有さないか、またはより長く疾患を有さない生存）を導く免疫応答を生じ得るはずである。一般に、１つ以上のポリペプチドを含む薬学的組成物およびワクチンについて、用量中に存在する各ポリペプチドの量は、宿主の体重（ｋｇ）あたり、約２５μｇ～５ｍｇの範囲である。適切な用量サイズは、患者の大きさで変化するが、代表的には約０．１ｍＬ～約５ｍＬの範囲である。

【０２５７】

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

【０２５８】

（癌の検出および診断組成物、方法およびキット）

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

【０２５９】

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

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

【０２６０】

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

【０２６１】

サンプル中のポリペプチドマーカーを検出するために結合剤を使用するための、当業者に公知の種々のアッセイ型式が存在する。例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８を参照のこと。一般的に、患者における癌の存在または非存在は、（ａ）患者から得られた生物学的サンプルを結合剤と接触させる工程；（ｂ）結合剤に結合するポリペプチドのレベルをサンプルにおいて検出する工程；および（ｃ）ポリペプチドのレベルと所定のカットオフ値とを比較する工程によって決定され得る。

【０２６２】

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

【０２６３】

固体支持体は、腫瘍タンパク質が付着され得る当業者に公知の任意の材料であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレートにおける試験ウェルあるいはニトロセルロースまたは他の適切な膜であり得る。あるいは、その支持体は、ビーズまたはディスク（例えば、ガラス）、ファイバーグラス、ラテックス、またはプラスチック物質（例えば、ポリスチレン、またはポリ塩化ビニル）であり得る。その支持体はまた、磁気粒子または光ファイバーセンサー（例えば、米国特許第５，３５９，６８１号に記載のような）であり得る。この結合剤は、当業者に公知の種々の技術を使用して固体支持体上に固定化され得、これらは特許および科学文献に十分に記載されている。本発明の状況において、用語「固定化」とは、非共有結合的な会合（例えば、吸着）および共有結合的な付着（これは、薬剤と支持体上の官能基との間で直接結合され得るかまたは架橋剤を用いる結合であ

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

【０２６４】

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

【０２６５】

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

【０２６６】

より詳細には、一旦抗体が上記のように支持体上に固定化されると、支持体上の残りのタンパク質結合部位は、典型的にはブロックされる。任意の適切なブロック剤（例えば、ウシ血清アルブミンまたはＴｗｅｅｎ２０™（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ））は、当業者に公知である。固定された抗体は次いで、サンプルとインキュベートされ、そしてポリペプチドをこの抗体に結合させる。インキュベーションの前に、このサンプルは適切な希釈液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ））で希釈され得る。概して、適切な接触時間（すなわち、インキュベーション時間）は、結合ポリペプチドと非結合ポリペプチドとの間の平衡で達成されるものの少なくとも約９５％で、結腸癌を有する個体から得られたサンプル内のポリペプチドの存在を検出するのに十分な時間である。当業者は、ある時間にわたって起こる結合レベルをアッセイすることによって、平衡に達するまでに必要な時間が容易に決定され得ることを認識する。室温では、一般に、約３０分間のインキュベーション時間で十分である。

【０２６７】

次いで、非結合サンプルが、適切な緩衝液（例えば、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０™を含むＰＢＳ）を用いて固体支持体を洗浄することによって除去される。レポーター基を含む第２の抗体が次いで、固体支持体に添加され得る。好ましいレポーター基は、上記の基を含む。

【０２６８】

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

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

【０２６９】

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

【０２７０】

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

【０２７１】

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

【０２７２】

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

【０２７３】

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

【０２７４】

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

【０２７５】

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

【０２７６】

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

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

【０２７７】

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

【０２７８】

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

【０２７９】

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

【０２８０】

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

【０２８１】

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

【０２８２】

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

【０２８３】

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

【０２８４】

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

【０２８５】

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

【０２８６】

以下の実施例は、例示のために提供され、そして限定のためではない。

【０２８７】

（実施例１）

（結腸腫瘍タンパク質ｃＤＮＡの同定）

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

【０２８８】

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

【０２８９】

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

【０２９０】

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

【０２９１】

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

【０２９２】

ｐＣＲ２．１腫瘍抗原ｃＤＮＡライブラリー由来の３０００クローンを、無作為に選択して、マイクロアレイ分析およびヌクレオチド配列決定のためのクローンを得るために用いた。各ｐＣＲ２．１クローンからのｃＤＮＡ挿入物を以下のようにＰＣＲ増幅した。要するに、０．５μｌのグリセロールストック溶液を９９．５μｌのＰＣＲ混合液に添加した。このＰＣＲ混合液は、８０μｌ H_2O、１０μｌ １０×ＰＣＲ緩衝液、６μｌ $MgCl_2$、１μｌ １０ｍＭ ｄＮＴＰ、１μｌ １００ｍＭ Ｍ１３順方向プライマー（ＣＡＣＧＡＣＧＴＴＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧ；配列番号２２３６）、１μｌ １００ｍＭ Ｍ１３ 逆方向プライマー（ＣＡＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣ；配列番号２２３７）、および０．５μｌ ５ｕ／ｍｌ Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼを含有する。本明細書において用いられるＭ１３の順方向プライマー、および逆方向プライマーは、Ｏｐｅｒｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ａｌａｍｅｄａ，ＣＡ）から入手した。以下

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

【０２９３】

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

【０２９４】

ＰＣＲ増幅産物をアレイフォーマット中のスライド上にドットしているが、この各産物は、アレイ中で特有の位置を占める。ｍＲＮＡを、試験されるべき組織サンプルから抽出し、そして蛍光ヌクレオチドであるΨ５およびΨ３の存在下で、標準的方法を用いて、逆転写によって、蛍光標識したｃＤＮＡプローブを生成した。例えば、逆転写反応を実施するための例示的反応条件については、Ａｕｓｕｂｅｌら、前出を参照のこと；Ψ５およびΨ３蛍光標識されたヌクレオチドは、例えば、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ（Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）、またはＮＥＮ（登録商標）Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．（Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）から入手可能である。マイクロアレイを、蛍光標識したｃＤＮＡでプローブし、そのスライドをスキャン（走査）し、そして蛍光強度を測定した。ｃＤＮＡマイクロアレイを調製するための、および蛍光強度を測定するためのＧｅｎｅｔｉｃ ＭｉｃｒｏＳｙｓｔｅｍｓ計測器が、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ）から入手可能である。

【０２９５】

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

【０２９６】

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

【０２９７】

（実施例２）

（Ｃ９３１Ｐ結腸腫瘍タンパク質ｃＤＮＡの全長配列）

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

【０２９８】

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

【０２９９】

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

ｏｌｄの「ＬＧｔｅｍｐｌａｔｅｓＳｅｐ２０００」サーチデータベースのＢｌａｓｔＮサーチにおける問合せ配列として使用した。このサーチを、Ｉｎｃｙｔｅによって提供されるＬｉｆｅＳｅｑ ｇｏｌｄ Ｗｅｂインターフェースを使用して行った。単一ＬｉｆｅＳｅｑ Ｇｏｌｄテンプレート配列に対する同一の一致が存在した（番号４７５１１３．７）。次いで、遺伝子ビン４７５１１３（これに４７５１１３．７配列が属する）に関する情報を、ＬｉｆｅＳｅｑ Ｇｏｌｄデータベースから得た。この４７５１１３遺伝子ビンは、５つのテンプレート配列および１７６個のクローンで構成されていた。この５つのテンプレート配列を、ＤＮＡＳｔａｒ Ｓｅｑｍａｎプログラムを使用してＣ９３１Ｐ配列と整列させた。これらの配列の整列は、５つのテンプレート配列の各々が、選択的スプライシング形態を示す（各配列が、他の配列と比較して、独特の複数の塩基対欠失を有した）ことを示した。この複数配列整列を、Ｃ９３１Ｐ遺伝子についての成熟ｍＲＮＡを示すはずである単一配列、ならびに単一オープンリーディングフレームを誘導するために使用した。この推定成熟ｍＲＮＡ配列を、５つのテンプレート配列に存在する全ての複数塩基対欠失を組み込むことによって得た。Ｃ９３１Ｐの本来の単離配列は、推定の完全にプロセスされたｍＲＮＡ配列において欠失した遺伝子部分に対応する。従って、ＬｉｆｅＳｅｑから得た３つの配列を本明細書中で開示する。１つは、推定の遺伝子の部分的にスプライスされた形態（配列番号２２３３）に対応し、これはＣ９３１Ｐの本来の単離体配列と整列する。第２は、推定の、完全にプロセスされたｍＲＮＡ配列（配列番号２２３２）に対応し、これはＣ９３１Ｐの本来の単離体配列とは整列しない。第３の配列は、この配列の推定のコード部分のみ（配列番号２２３４）に対応する。単一タンパク質配列（推定のＣ９３１Ｐ全長タンパク質配列（配列番号２２３５））は、本明細書中に開示される。

【０３００】

（実施例３）

（リアルタイムＰＣＲを使用する、Ｃ９３１Ｐ結腸腫瘍抗原のｍＲＮＡ発現分析）

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

【０３０１】

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

【０３０２】

２．５μｌのＳＹＢＲグリーン緩衝液、２μｌのｃＤＮＡテンプレート、ならびに目的の遺伝子についての順方向プライマーおよび逆方向プライマー各々２．５μｌを含む２５μｌの容量で、ＰＣＲ反応を行った。ＲＴ反応に使用したｃＤＮＡを、目的の各遺伝子について１：１０、そしてβ－アクチンコントロールについて１：１００に希釈した。サンプル中の特定のｃＤＮＡ（従って初期のｍＲＮＡ）の量を定量化するために、目的の遺伝子を含むプラスミドＤＮＡを使用して、実行の各々についての標準曲線を作成する。標準曲線を、リアルタイムＰＣＲにおいて決定したＣｔ値（これは、このアッセイにおいて使用した初期ｃＤＮＡ濃度に関連する）を使用して作成した。目的の遺伝子の２０～２×１０

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

【０３０３】

（実施例４）

（Ｔ－ヘルパー株のペプチドプライミング）

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

１０アミノ酸重複する１５マーのペプチド（腫瘍特異的抗原由来）を、標準的な手順を使用して作製する。樹状細胞（ＤＣ）を、標準的なプロトコルによって、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４を使用して正常なドナーのＰＢＭＣから誘導する。ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞を、ＭＡＣＳビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）およびネガティブ選択を使用して、ＤＣとして同じドナーから作製する。ＤＣを、１５マーのペプチドのプールを用いて一晩パルスする（各ペプチドは、最終濃度０．２５μｇ／ｍｌ）。パルスしたＤＣを洗浄し、そして底がＶ字型の９６ウェルプレートに1×10^{4}細胞／ウェルでプレートし、そして精製したＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞を1×10^{5}／ウェルで添加する。培養物に６０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－６および１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１２を補充し、そして３７℃でインキュベートする。培養物を、抗原提示細胞として上記のように作製およびパルスしたＤＣを使用して、毎週上記のように再刺激し、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－７および１０Ｕ／ｍｌのＩＬ－２を補充する。４回のインビトロ刺激サイクルの後、得られたＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞株（各株は、１つのウェルに対応する）を、コントロールとして使用したペプチドの無関係のプールでのペプチドプールの刺激に応答しての、特定の増殖およびサイトカインの産生について試験する。

【０３０４】

（実施例５）

（インビトロ全遺伝子プライミングを使用する、腫瘍特異的ＣＴＬ株の作製）

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

【０３０５】

（実施例６）

（抗腫瘍抗原モノクローナル抗体の生成および特徴付け）

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

【０３０６】

（実施例７）

（ポリペプチドの合成）

本実施例は、結腸腫瘍タンパク質の調製のための例示的な方法論を開示する。

【０３０７】

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

【０３０８】

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

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96388 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/47

(21) International Application Number: PCT/US01/18557

(22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/210,899 9 June 2000 (09.06.2000) US
60/270,216 20 February 2001 (20.02.2001) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **CORIXA CORPORATION** [US/US]; Suite 200, 1124 Columbia Street, Seattle, WA 98104 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **JIANG, Yuqiu** [CN/US]; 5001 S. 232nd Street, Kent, WA 98032 (US). **HARLOCKER, Susan, L.** [US/US]; 7522 130th Avenue W., Seattle, WA 98117 (US). **SECRIST, Heather** [US/US]; 3844 35th Avenue W., Seattle, WA 98199 (US).

(74) Agents: **POTTER, Jane, K., R.**; Seed Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104-7092 et al. (US).

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

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

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

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

WO 01/96388 A2

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

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

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE THERAPY AND DIAGNOSIS OF COLON CANCER

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

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

BACKGROUND OF THE INVENTION

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

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

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

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

SUMMARY OF THE INVENTION

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

(a) sequences provided in SEQ ID NO:1-2234;

(b) complements of the sequences provided in SEQ ID NO:1-2234;

(c) sequences consisting of at least 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 and 100 contiguous residues of a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234;

(d) sequences that hybridize to a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234, under moderate or highly stringent conditions;

(e) sequences having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to a sequence of SEQ ID NO:1-2234;

(f) degenerate variants of a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

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

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

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

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

POLYPEPTIDE COMPOSITIONS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

In many instances, a variant will contain conservative substitutions. A "conservative substitution" is one in which an amino acid is substituted for another amino acid that has similar properties, such that one skilled in the art of peptide chemistry would expect the secondary structure and hydropathic nature of the polypeptide to be substantially unchanged. As described above, modifications may be made in the structure of the polynucleotides and polypeptides of the present invention and still obtain a functional molecule that encodes a variant or derivative polypeptide with desirable characteristics, *e.g.*, with immunogenic characteristics. When it is desired to alter the amino acid sequence of a polypeptide to create an equivalent, or even an improved, immunogenic variant or portion of a polypeptide of the invention, one skilled in the art will typically change one or more of the codons of the encoding DNA sequence according to Table 1.

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

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

TABLE 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

polynucleotides may comprise a native sequence (*i.e.*, an endogenous sequence that encodes a Ral2 polypeptide or a portion thereof) or may comprise a variant of such a sequence. Ral2 polynucleotide variants may contain one or more substitutions, additions, deletions and/or insertions such that the biological activity of the encoded fusion polypeptide is not substantially diminished, relative to a fusion polypeptide comprising a native Ral2 polypeptide. Variants preferably exhibit at least about 70% identity, more preferably at least about 80% identity and most preferably at least about 90% identity to a polynucleotide sequence that encodes a native Ral2 polypeptide or a portion thereof.

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

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

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

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

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

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

POLYNUCLEOTIDE COMPOSITIONS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

One preferred example of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul et al. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 and Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectively. BLAST and BLAST 2.0 can be used, for example with the parameters described herein, to determine percent sequence identity for the polynucleotides of the invention. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. In one illustrative example, cumulative scores can be calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always >0) and N (penalty score for mismatching residues; always <0). Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alignments, (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

POLYNUCLEOTIDE IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND EXPRESSION

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

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

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

Any of a number of other template dependent processes, many of which are variations of the PCR ™ amplification technique, are readily known and available in the art. Illustratively, some such methods include the ligase chain reaction (referred to as LCR), described, for example, in Eur. Pat. Appl. Publ. No. 320,308 and U.S. Patent No. 4,883,750; Qbeta Replicase, described in PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. PCT/US87/00880; Strand Displacement Amplification (SDA) and Repair Chain Reaction (RCR). Still other amplification methods are described in Great Britain Pat. Appl. No. 2 202 328, and in PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. PCT/US89/01025. Other nucleic acid amplification procedures include transcription-based amplification systems (TAS) (PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. WO 88/10315), including nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and 3SR. Eur. Pat. Appl. Publ. No. 329,822 describes a nucleic acid amplification process involving cyclically synthesizing single-stranded RNA ("ssRNA"), ssDNA, and double-stranded DNA (dsDNA). PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. WO 89/06700 describes a nucleic acid sequence amplification scheme based on the hybridization of a promoter/primer sequence to a target single-stranded DNA ("ssDNA") followed by transcription of many RNA copies of the sequence. Other amplification methods such as "RACE" (Frohman, 1990), and "one-sided PCR" (Ohara, 1989) are also well-known to those of skill in the art.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Antibody Compositions, Fragments Thereof and Other Binding Agents

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

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

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

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

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

blood, sera, sputum, urine and/or tumor biopsies) from patients with and without a cancer (as determined using standard clinical tests) may be assayed as described herein for the presence of polypeptides that bind to the binding agent. Preferably, a statistically significant number of samples with and without the disease will be assayed. Each binding agent should satisfy the above criteria; however, those of ordinary skill in the art will recognize that binding agents may be used in combination to improve sensitivity.

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

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

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

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

A number of therapeutically useful molecules are known in the art which comprise antigen-binding sites that are capable of exhibiting immunological binding properties of an antibody molecule. The proteolytic enzyme papain preferentially cleaves IgG molecules to yield several fragments, two of which (the "F(ab)" fragments) each comprise a covalent heterodimer that includes an intact antigen-binding site. The enzyme pepsin is able to cleave IgG molecules to provide several fragments, including the "$F(ab')_2$" fragment which comprises both antigen-binding sites. An "Fv" fragment can be produced by preferential proteolytic cleavage of an IgM, and on rare occasions IgG or IgA immunoglobulin molecule. Fv fragments are, however, more commonly derived using recombinant techniques known in the art. The Fv fragment includes a non-covalent $V_H::V_L$ heterodimer including an antigen-binding site which retains much

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

In another embodiment of the invention, monoclonal antibodies of the present invention may be coupled to one or more therapeutic agents. Suitable agents in this regard include radionuclides, differentiation inducers, drugs, toxins, and derivatives thereof. Preferred radionuclides include ^{90}Y, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{211}At, and ^{212}Bi. Preferred drugs include methotrexate, and pyrimidine and purine analogs. Preferred differentiation inducers include phorbol esters and butyric acid. Preferred toxins include ricin, abrin, diptheria toxin, cholera toxin, gelonin, Pseudomonas exotoxin, Shigella toxin, and pokeweed antiviral protein.

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

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

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

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

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

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

T CELL COMPOSITIONS

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

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

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

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

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

T CELL RECEPTOR COMPOSITIONS

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

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

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

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

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

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

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Certain preferred adjuvants for eliciting a predominantly Th1-type response include, for example, a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A, together with an aluminum salt. MPL® adjuvants are available from Corixa Corporation (Seattle, WA; *see*, for example, US Patent Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 and 4,912,094). CpG-containing oligonucleotides (in which the CpG dinucleotide is unmethylated) also induce a predominantly Th1 response. Such oligonucleotides are well known and are described, for example, in WO 96/02555, WO 99/33488 and U.S. Patent Nos. 6,008,200 and 5,856,462. Immunostimulatory DNA sequences are also described, for example, by Sato et al., *Science 273*:352, 1996. Another preferred adjuvant comprises a saponin, such as Quil A, or derivatives thereof, including QS21 and QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; Digitonin; or *Gypsophila* or

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

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

In one preferred embodiment, the adjuvant system includes the combination of a monophosphoryl lipid A and a saponin derivative, such as the combination of QS21 and 3D-MPL® adjuvant, as described in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol, as described in WO 96/33739. Other preferred formulations comprise an oil-in-water emulsion and tocopherol. Another particularly preferred adjuvant formulation employing QS21, 3D-MPL® adjuvant and tocopherol in an oil-in-water emulsion is described in WO 95/17210.

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

Additional illustrative adjuvants for use in the pharmaceutical compositions of the invention include Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), the SBAS series

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

Other preferred adjuvants include adjuvant molecules of the general formula

(I): $HO(CH_2CH_2O)_n$-A-R,

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

One embodiment of the present invention consists of a vaccine formulation comprising a polyoxyethylene ether of general formula (I), wherein *n* is between 1 and 50, preferably 4-24, most preferably 9; the *R* component is C_{1-50}, preferably C_4-C_{20} alkyl and most preferably C_{12} alkyl, and *A* is a bond. The concentration of the polyoxyethylene ethers should be in the range 0.1-20%, preferably from 0.1-10%, and most preferably in the range 0.1-1%. Preferred polyoxyethylene ethers are selected from the following group: polyoxyethylene-9-lauryl ether, polyoxyethylene-9-steoryl ether, polyoxyethylene-8-steoryl ether, polyoxyethylene-4-lauryl ether, polyoxyethylene-35-lauryl ether, and polyoxyethylene-23-lauryl ether. Polyoxyethylene ethers such as polyoxyethylene lauryl ether are described in the Merck index (12th edition: entry 7717). These adjuvant molecules are described in WO 99/52549.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

In another illustrative embodiment, biodegradable microspheres (*e.g.*, polylactate polyglycolate) are employed as carriers for the compositions of this invention. Suitable biodegradable microspheres are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344, 5,407,609 and 5,942,252. Modified hepatitis B core protein carrier systems. such as described in WO/99 40934, and references cited therein, will also be useful for many applications. Another illustrative carrier/delivery system employs a carrier comprising particulate-protein complexes, such as those described in U.S. Patent No. 5,928,647, which are capable of inducing a class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses in a host.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CANCER THERAPEUTIC METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CANCER DETECTION AND DIAGNOSTIC COMPOSITIONS, METHODS AND KITS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EXAMPLES

EXAMPLE 1

IDENTIFICATION OF COLON TUMOR PROTEIN cDNAs

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

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

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

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

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

Three thousand clones from the pCR2.1 tumor antigen cDNA libraries were randomly selected and used to obtain clones for microarray analysis and nucleotide sequencing. The cDNA insert from each pCR2.1 clone was PCR amplified as follows. Briefly, 0.5 µl of glycerol stock solution was added to 99.5 µl of PCR mix containing 80 µl H_2O, 10 µl 10X PCR Buffer, 6 µl $MgCl_2$, 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 100 mM M13 forward primer (CACGACGTTGTAAAACGACGG; SEQ ID NO:2236), 1 µl 100 mM M13 reverse primer (CACAGGAAACAGCTATGACC; SEQ ID NO:2237), and 0.5 µl 5 u/ml Taq DNA polymerase. The M13 forward and reverse primers used herein were obtained from Operon Technologies (Alameda, CA). The PCR amplification was performed for thirty cycles under the following conditions: 95°C for 5 minutes, 92°C for 30 seconds, 57°C for 40 seconds, 75°C for 2 minutes and 75°C for 5 minutes.

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

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

extracted from the tissue sample to be tested, and fluorescent-labeled cDNA probes were generated by reverse transcription, according to standard methodology, in the presence of fluorescent nucleotides ψ5 and ψ3. *See, e.g.*, Ausubel, et al., *supra* for exemplary reaction conditions for performing the reverse transcription reaction; ψ5 and ψ3 fluorescent labeled nucleotides may be obtained, *e.g.*, from Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden) or NEN® Life Science Products, Inc. (Boston, MA). The microarrays were probed with the fluorescent-labeled cDNAs, the slides were scanned and fluorescence intensity was measured. Genetic MicroSystems instrumentation for preparing the cDNA microarrays and for measuring fluorescence intensity is available from Affymetrix (Santa Clara, CA).

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

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

EXAMPLE 2

Full-Length Sequence of C931P Colon Tumor Protein cDNA

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

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

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

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

EXAMPLE 3

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

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

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

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

The PCR reaction was performed in 25μl volumes that include 2.5μl of SYBR green buffer, 2μl of cDNA template and 2.5μl each of the forward and reverse primers for the gene of interest. The cDNAs used for RT reactions were diluted 1:10 for each gene of interest and 1:100 for the β-actin control. In order to quantitate the amount of specific cDNA (and hence initial mRNA) in the sample, a standard curve is generated for each run using the plasmid DNA containing the gene of interest. Standard curves were generated using the Ct values determined in the real-time PCR which were related to the initial cDNA concentration used in the assay. Standard dilution ranging from 20-$2x10^6$ copies of the gene of interest was used for this purpose. In addition, a standard curve was generated for β-actin ranging from 200fg-2000fg. This enabled standardization of the initial RNA content of a tissue sample to the amount of β-actin for comparison purposes. The mean copy number for each group of tissues tested was normalized to a constant amount of β-actin, allowing the evaluation of the over-expression levels seen with each of the genes.

EXAMPLE 4

PEPTIDE PRIMING OF T-HELPER LINES

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

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

EXAMPLE 5

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

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

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

EXAMPLE 6

GENERATION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-TUMOR ANTIGEN MONOCLONAL ANTIBODIES

Mouse monoclonal antibodies are raised against *E. coli* derived tumor antigen proteins as follows: Mice are immunized with Complete Freund's Adjuvant (CFA) containing 50 μg recombinant tumor protein, followed by a subsequent intraperitoneal boost with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) containing 10μg recombinant protein. Three days prior to removal of the spleens, the mice are immunized intravenously with approximately 50μg of soluble recombinant protein. The spleen of a mouse with a positive titer to the tumor antigen is removed, and a single-cell suspension made and used for fusion to SP2/0 myeloma cells to generate B cell hybridomas. The supernatants from the hybrid clones are tested by ELISA for specificity to recombinant tumor protein, and epitope mapped using peptides that spanned the entire tumor protein sequence. The mAbs are also tested by flow cytometry for their ability to detect tumor protein on the surface of cells stably transfected with the cDNA encoding the tumor protein.

EXAMPLE 7

SYNTHESIS OF POLYPEPTIDES

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

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

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

CLAIMS

What is claimed is:

1. An isolated polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of:

(a) sequences provided in SEQ ID NO:1-2234;

(b) complements of the sequences provided in SEQ ID NO:1-2234;

(c) sequences consisting of at least 20 contiguous residues of a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234;

(d) sequences that hybridize to a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234, under moderately stringent conditions;

(e) sequences having at least 75% identity to a sequence of SEQ ID NO:1-2234;

(f) sequences having at least 90% identity to a sequence of SEQ ID NO:1-2234; and

(g) degenerate variants of a sequence provided in SEQ ID NO:1-2234.

2. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) sequences encoded by a polynucleotide of claim 1; and

(b) sequences having at least 70% identity to a sequence encoded by a polynucleotide of claim 1; and

(c) sequences having at least 90% identity to a sequence encoded by a polynucleotide of claim 1; and

(d) sequences provided in SEQ ID NO:2235.

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

4. A host cell transformed or transfected with an expression vector according to claim 3.

5. An isolated antibody, or antigen-binding fragment thereof, that specifically binds to a polypeptide of claim 2.

6. A method for detecting the presence of a cancer in a patient, comprising the steps of:

(a) obtaining a biological sample from the patient;

(b) contacting the biological sample with a binding agent that binds to a polypeptide of claim 2;

(c) detecting in the sample an amount of polypeptide that binds to the binding agent; and

(d) comparing the amount of polypeptide to a predetermined cut-off value and therefrom determining the presence of a cancer in the patient.

7. A fusion protein comprising at least one polypeptide according to claim 2.

8. An oligonucleotide that hybridizes to a sequence recited in SEQ ID NO:1-2234 under moderately stringent conditions.

9. A method for stimulating and/or expanding T cells specific for a tumor protein, comprising contacting T cells with at least one component selected from the group consisting of:

(a) polypeptides according to claim 2;

(b) polynucleotides according to claim 1; and

(c) antigen-presenting cells that express a polynucleotide according to claim 1,

under conditions and for a time sufficient to permit the stimulation and/or expansion of T cells.

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

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

(a) polypeptides according to claim 2;

(b) polynucleotides according to claim 1;

(c) antibodies according to claim 5;

(d) fusion proteins according to claim 7;

(e) T cell populations according to claim 10; and

(f) antigen presenting cells that express a polypeptide according to claim 2.

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

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

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

(a) obtaining a biological sample from the patient;

(b) contacting the biological sample with an oligonucleotide according to claim 8;

(c) detecting in the sample an amount of a polynucleotide that hybridizes to the oligonucleotide; and

(d) compare the amount of polynucleotide that hybridizes to the oligonucleotide to a predetermined cut-off value, and therefrom determining the presence of the cancer in the patient.

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

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

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

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

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

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

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

[CORRECTED VERSION]

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96388 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/47

(21) International Application Number: PCT/US01/18557

(22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/210,899 9 June 2000 (09.06.2000) US
60/270,216 20 February 2001 (20.02.2001) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: CORIXA CORPORATION [US/US]; Suite 200, 1124 Columbia Street, Seattle, WA 98104 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: JIANG, Yuqiu [CN/US]; 5001 S. 232nd Street, Kent, WA 98032 (US). HARLOCKER, Susan, L. [US/US]; 7522 15th Avenue W., Seattle, WA 98117 (US). SECRIST, Heather [US/US]; 3844 35th Avenue W., Seattle, WA 98199 (US).

(74) Agents: POTTER, Jane, E., R.; Seed Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104-7092 et al. (US).

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

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

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

(48) Date of publication of this corrected version:
21 March 2002

(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 12/2002 of 21 March 2002, Section II

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

WO 01/96388 A2

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

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

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/096388 A3

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/47, 14/82, C12N 15/12, 15/62

(21) International Application Number: PCT/US01/18557

(22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/210,899 9 June 2000 (09.06.2000) US
60/270,218 20 February 2001 (20.02.2001) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **CORIXA CORPORATION** [US/US]; Suite 200, 1124 Columbia Street, Seattle, WA 98104 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **JIANG, Yuqiu** [CN/US]; 5001 S. 252nd Street, Kent, WA 98032 (US). **HARLOCKER, Susan, L.** [US/US]; 7522 13th Avenue W., Seattle, WA 98117 (US). **SECRIST, Heather** [US/US]; 3844 35th Avenue W., Seattle, WA 98199 (US).

(74) Agents: **POTTER, Jane, E., R.**; Seed Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104-7092 et al. (US).

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

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

Published:
— *with international search report*
with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
3 October 2002

(15) Information about Correction:
Previous Correction:
see PCT Gazette No. 12/2002 of 21 March 2002, Section II

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

WO 01/096388 A3

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

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

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/18557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/47 C07K14/82 C12N15/12 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBL, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIMON B ET AL: "EPITHELIAL GLYCOPROTEIN IS A MEMBER OF A FAMILY OF EPITHELIAL CELL SURFACE ANTIGENS HOMOLOGOUS TO NIDOGEN, A MATRIX ADHESION PROTEIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 87, no. 7, 1 April 1990 (1990-04-01), pages 2755-2759, XP000651084 ISSN: 0027-8424 figure 3 --- -/--	1-9, 11-17

[X] Further documents are listed in the continuation of box C [X] Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority 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 is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 January 2002	13. 05. 02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340 2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Grosskopf, R

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/18557

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PEREZ M S ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A CDNA ENCODING THE KS1/4 EPITHELIAL CARCINOMA MARKER" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 142, no. 10, 15 May 1989 (1989-05-15), pages 3662-3667, XP000651096 ISSN: 0022-1767 figure 2 ---	1-9, 11-17
X	EP 0 326 423 A (LILLY CO ELI) 2 August 1989 (1989-08-02) page 9 page 16, line 27 -page 17, line 18 ---	1-9, 11-17
X	SZALA S ET AL: "MOLECULAR CLONING OF CDNA FOR THE CARCINOMA-ASSOCIATED ANTIGEN GA 733-2" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 87, no. 9, 1 May 1990 (1990-05-01), pages 3542-3546, XP000566331 ISSN: 0027-8424 see the whole document ----	1-9, 11-17

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/18557

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 9, 12, 13 and 17 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
Because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim's Nos.:

1-9, 11-17 (all partially)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/US 01 48557

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-9, 11-17 (all partially)

The claims insofar as they relate to SEQ ID NO: 1

2. Claims: 1-9, 11-17 (all partially)

Inventions 2 to 2235; Claims insofar as they relate to SEQ ID NO:s 2 to 2235

3. Claims: 10 and 11-13 (partially)

Invention 2236: A T-cell population and the use thereof

International Application No. PCT/US 01 18557

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Items (d) to (g) of Claim 1 are directed to a multitude of undefined nucleotide fragments which are neither defined by their function nor by their length. Thus, the scope of Claim 1 in this resepct (and consequently the scope of all other claims relating to these items) is totally unclear and unlimited and renders a meaningful or complete research impossible.
The same applies for the oligonucleotides according to Claim 8 (and consequently the method and the diagnostic kit according to Claims 14 and 15).

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/18557

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 0326423	A	02-08-1989	CA	1340221	A1	15-12-1998
			DE	68922757	D1	29-06-1995
			DE	68922757	T2	16-11-1995
			DK	35189	A	31-07-1989
			EP	0326423	A2	02-08-1989
			JP	2005867	A	10-01-1990
			JP	2774298	B2	09-07-1998
			US	5348887	A	20-09-1994

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 39/39	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｐ 35/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 37/04		
Ａ６１Ｐ 37/04	Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	
Ａ６１Ｐ 43/00	Ｃ０７Ｋ 16/30		
Ｃ０７Ｋ 16/30	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｃ１２Ｎ 5/06	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｇ０１Ｎ 33/574	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｅ	
Ｇ０１Ｎ 33/574	Ａ６１Ｋ 37/02		

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

(72)発明者 セクリスト, ヘザー
アメリカ合衆国 ワシントン ９８１９９, シアトル, ３５ティーエイチ アベニュー ダブリュー. ３８４４

Ｆターム(参考)
4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 BA61 CA04 CA12 DA01 DA02 DA05 DA11 EA02 GA01 GA11 HA08 HA12
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 AC20 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA19 BA01 BA02 BA35 BA41 BA44 CA26 CA53 CA56 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA31 MA35 MA36 MA37 MA41 MA44 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA65 MA66 NA14 ZB01 ZB09 ZB26 ZC41
4C085 AA03 AA38 BB01 CC03 DD62 EE03 EE06 FF01 FF02 FF03 FF12 FF13 FF14 FF17 FF18 FF20 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA31 MA35 MA36 MA37 MA41 MA44 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA65 MA66 NA14 ZB01 ZB09 ZB26 ZC41
4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 CA05 DA32 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA31 MA35 MA36 MA37 MA41 MA44 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA65 MA66 NA14 ZB01 ZB09 ZB26 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA41 CA40 CA41 DA75 DA76 DA86 EA31 EA51 FA34 FA74

专利名称(译)	用于治疗和诊断结肠癌的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2004512022A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2002510525	申请日	2001-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	科里克萨有限公司		
申请(专利权)人(译)	Corixa公司公司		
[标]发明人	ジアンユーキュー ハーロッカースーザンエル セクリストヘザー		
发明人	ジアン, ユーキュー ハーロッカー, スーザン エル. セクリスト, ヘザー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K35/12 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K48/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/30 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	C07K14/4748 A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/505 C07K2319/00 C12Q1/6886 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/12 A61K39/00.H A61K39/39 A61K48/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00.111 C07K16/30 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/574.Z C12N5/00.A C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC20 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA35 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/CA26 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/MA02 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA36 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA44 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB01 4C084/ZB09 4C084/ZB26 4C084/ZC41 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF01 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF12 4C085/FF13 4C085/FF14 4C085/FF17 4C085/FF18 4C085/FF20 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/MA13 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA24 4C086/MA31 4C086/MA35 4C086/MA36 4C086/MA37 4C086/MA41 4C086/MA44 4C086/MA52 4C086/MA56 4C086/MA57 4C086/MA59 4C086/MA60 4C086/MA65 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB01 4C086/ZB09 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB64 4C087/CA04 4C087/CA05 4C087/DA32 4C087/MA02 4C087/MA13 4C087/MA17 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA24 4C087/MA31 4C087/MA35 4C087/MA36 4C087/MA37 4C087/MA41 4C087/MA44 4C087/MA52 4C087/MA56 4C087/MA57 4C087/MA59 4C087/MA60 4C087/MA65 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB01 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA51 4H045/FA34 4H045/FA74		
优先权	60/210899 2000-06-09 US 60/270216 2001-02-20 US		
其他公开文献	JP2004512022A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

披露了用于治疗和诊断癌症（例如结肠癌）的组合物和方法。该组合物可以包含一种或多种结肠肿瘤的蛋白质，编码该免疫原性蛋白质或这样的蛋白质的多核苷酸。或者，治疗组合物可包含表达结肠肿瘤蛋白的抗原呈递细胞，或对表达此类蛋白的细胞特异的T细胞。这种组合物可用于预防和治疗疾病，例如结肠癌。还提供了基于结肠肿瘤蛋白样品或编码这种蛋白质的mRNA的检测的诊断方法。

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