

(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2004-535780

(P2004-535780A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 128 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-569875 (P2002-569875)	(71) 出願人	503180247 イムゲニクス・アーゲー
(86) (22) 出願日	平成14年2月28日 (2002. 2. 28)		ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・ランゲン
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月1日 (2003. 9. 1)		ベックシュトラッセ・1・ウニクリニケン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/002186	(74) 代理人	100098682
(87) 国際公開番号	W02002/070556		弁理士 赤塚 賢次
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002. 9. 12)	(74) 代理人	100071663
(31) 優先権主張番号	101 09 855.3		弁理士 福田 保夫
(32) 優先日	平成13年3月1日 (2001. 3. 1)	(72) 発明者	シュタニスラフスキー トーマス
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ連邦共和国 6 5 1 9 3 ビースバ
			ーデン シュラクシュトラッセ 4
		(72) 発明者	シュミッツ フランク
			ドイツ連邦共和国 5 4 2 1 8 ビットブ
			ルク ラータウスプラッツ 2
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 p 5 3 タンパク質特異的マウス α/β - T細胞受容体のポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸およびそれらの使用法

(57) 【要約】

【解決手段】 p 5 3 タンパク質特異的 T細胞応答を媒介するマウス / - T細胞受容体のポリペプチド、または機能的変異体またはその部分、または、これをコードする核酸、機能的変異体またはその部分。

【効果】 p 5 3 タンパク質発現細胞が遺伝子を誘発する T細胞によって認識され、サイトカインが発現され、腫瘍あるいは白血病細胞の溶解および/またはアポトーシスが誘導されるというものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 ~ 配列番号 5 による p 5 3 タンパク質特異的 T 細胞応答を媒介するマウス /
- T 細胞受容体のポリペプチド、または機能的変異体またはその部分、または、これを
コードする核酸、機能的変異体またはその部分。

【請求項 2】

請求項 1 に記載されているポリペプチド含む融合タンパク質、または機能的変異体または
その部分、またはこれをコードする核酸、機能的変異体またはその部分。

【請求項 3】

C D 3 および / または C D 8、C D 1 6 またはその部分の - 領域、特にヒト C D 3 およ
び / または C D 8、C D 1 6 またはその部分の - 領域を含むことを特徴とする請求項 2
に記載されている前記融合タンパク質。 10

【請求項 4】

可動リンカー、特に、前記アミノ酸配列 (G G G G S)₃ のリンカーを更に含む請求項 2
または 3 に記載されている前記融合タンパク質。

【請求項 5】

キメラの、少なくとも部分的にヒト化融合タンパク質であることを特徴とする、請求項 2
に記載されている前記融合タンパク質。

【請求項 6】

一本鎖または二本鎖 T 細胞受容体であることを特徴とする、請求項 2 ~ 5 のうちの 1 つに 20
記載されている前記融合タンパク質。

【請求項 7】

前記タンパク質 p 5 3 の前記アミノ酸 2 6 4 - 2 7 2 に対して特異的な抗体の抗原認識配
列、または、p 5 3 2 6 4 - 2 7 2 と H L A - A 2 の複合体の抗原認識配列を含む T 細
胞受容体の - または - 鎖。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが合成により作成されたことを特徴とする、請求 1 ~ 7 のうちの 1 つに
記載されている前記ポリペプチド。

【請求項 9】

D N A または R N A であり、好適には、特に、少なくとも 8 個のヌクレオチドの長さを有 30
する二本鎖 D N A であり、好適には、少なくとも 1 8 個のヌクレオチドを有する二本鎖 D
N A であり、特に少なくとも 2 4 個のヌクレオチドを有する二本鎖 D N A であることを特
徴とする請求項 1 または 2 に記載されている前記核酸。

【請求項 10】

前記核酸の前記配列には、少なくとも 1 つのイントロンおよび / または 1 つのポリ A 配列
が含まれることを特徴とする、請求項 1、2 または 9 のうちの 1 つに記載されている前記
核酸。

【請求項 11】

その相補的な「アンチセンス」配列の形態である、請求項 1、2、9 または 1 0 のうちの 40
1 つに記載されている前記核酸。

【請求項 12】

前記核酸が合成により作成されることを特徴とする請求項 1、2 または 9 ~ 1 1 のうちの
1 つに記載されている前記核酸。

【請求項 13】

請求項 1、2 または 9 ~ 1 2 のうちの 1 つに記載されている核酸を含む、好適には、プラ
スミド、シャトルベクター、ファージミド、コスミド、発現ベクター、レトロウイルスベ
クター、アデノウイルスベクター、または粒子、および / または遺伝子治療において活性
なベクターの形態のベクター。

【請求項 14】

請求項 1 3 に記載されている、ベクターによりトランスフェクションされた、または、粒 50

子により感染、または形質導入された宿主細胞。

【請求項 15】

T細胞または、T前駆体細胞または幹細胞であることを特徴とする請求項 14 に記載されている前記宿主細胞。

【請求項 16】

その表面上に、請求項 1～8 のうちの 1 つにより、ポリペプチドまたは融合タンパク質を発現させることを特徴とする、請求 14 または 15 に記載されている前記宿主細胞。

【請求項 17】

p53 提示腫瘍細胞またはその部分が、前記提示されたポリペプチドまたは融合タンパク質が特異的である前記 p53 タンパク質特異的抗原を前記腫瘍が提示する場合には、前記腫瘍細胞またはその部分だけが溶解される条件下で請求項 16 に記載されている宿主細胞と組み合わせることを特徴とする p53 タンパク質特異的抗原の同定のためのプロセス。

10

【請求項 18】

p53 タンパク質と関連している諸疾患の診断、治療および/または治療のモニタリングおよび/または薬理的に活性な物質の同定のための、請求項 1～12 のうちの 1 つに記載されており、抗体産生生物が、請求項 1～8 のうちの 1 つに記載されている少なくとも 6 個のアミノ酸を有する、好適には、少なくとも 8 個のアミノ酸を有する、特に、少なくとも 12 個のアミノ酸を有するポリペプチドまたはその機能的等価物、またはその部分、または、これをコードする核酸を伴うポリペプチド、またはその機能的な等価物、またはその部分により、免疫化されることを特徴とするポリペプチド、融合タンパク質または核酸に対して定方向に方向付けられている抗体、好適には、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作成するためのプロセス。

20

【請求項 19】

請求項 1～8 のうちの 1 つに記載されているポリペプチドに対して定方向に方向付けられることを特徴とする、請求項 18 に記載されているとおりに作成された抗体。

【請求項 20】

前記タンパク質 p53 の前記アミノ酸 264 - 272 に対して特異的な T細胞受容体の前記 - または - 鎖の前記抗原認識配列、または p53 264 - 272 と HLA - A2 の複合体の前記抗原認識配列から成ることを特徴とする組換え抗体。

【請求項 21】

前出の請求項のうちの 1 つに記載されている少なくとも 1 つの核酸、少なくとも 1 つのポリペプチド、少なくとも 1 つの宿主細胞、または、少なくとも 1 つの抗体が、適当な添加剤と賦形剤と一緒に組み合わせられることを特徴とする、p53 タンパク質と関連している諸疾患の治療用薬物の生産のためのプロセス。

30

【請求項 22】

適当な添加剤と賦形剤と一緒にして適切なものとなる場合は、前出の請求項のうちの 1 つに記載されている少なくとも 1 個の核酸、少なくとも 1 個のポリヌクレオチド、少なくとも 1 個の宿主細胞、または、少なくとも 1 個の抗体を含むことを特徴とする、p53 タンパク質に関連している諸疾患の前記治療のための薬物。

【請求項 23】

p53 タンパク質と関連している諸疾患の前記治療のための、請求項 22 に記載されている薬物の使用法。

40

【請求項 24】

前出の請求項のうちの 1 つに記載されている、少なくとも 1 個の核酸、少なくとも 1 個のポリペプチド、または少なくとも 1 個の抗体は、適当な添加剤と賦形剤と一緒に組み合わせられることを特徴とする、p53 タンパク質と関連している諸疾患と関係がある機能的相互作用因子の発見用テストの創出のためのプロセス。

【請求項 25】

適当な添加剤と賦形剤と一緒にして適切なものである場合は、前出の請求項のうちの 1 つに記載されている少なくとも 1 個の核酸、少なくとも 1 個のポリペプチド、または少なく

50

とも1個の抗体を含むことを特徴とする、p53タンパク質と関連している諸疾患と関係がある機能的相互作用因子の前記同定のためのテスト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、p53特異的T細胞応答を媒介するマウス / - T細胞受容体のポリペプチドと、これらポリペプチドをコードする核酸と、前記p53タンパク質と関連している疾患の治療、診断および/または予防におけるそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

Tリンパ球(CTL)による抗原認識は、効果的な免疫反応の発生と調節にとっては非常に重要である。その特徴的なT細胞系統マーカーはT細胞抗原受容体(TCR)である。T細胞抗原受容体(TCR)には、定義されている2つのタイプがある。すなわち、1つは、2つのジスルフィド結合ポリペプチド(および)のヘテロ二量体であり、もう1つは、確かに構造的に類似しているが、しかし、-および-ポリペプチドから成るものである。両方の受容体とも、5つのポリペプチドのセット、そのCD3複合体と関連しており、したがって一緒になって、前記T細胞抗原受容体複合体(TCR-CD3複合体)を形成する。/ - T細胞抗原受容体(/ - TCR)は全てのT細胞の95%を超えるものにおいてT細胞抗原受容体が発現されるため、機能的にもっとも重要なものである。

10

20

【0003】

/ - T細胞は、2つの異なる重複する集団にさらに細かく分けることができる。すなわち、CD4マーカーを担体し、また、主に前記免疫反応(T_H)を補助するサブグループと、CD8マーカーを担体し、また、主として、細胞傷害性(T_C)のものであるサブグループである。CD8⁺T細胞はMHC(Major Histocompatibility Complex; 主要組織適合複合体あるいは主要組織適合性抗原)クラスI分子と関連している抗原を認識する。こうした抗原は、中でも、腫瘍特異的あるいは腫瘍関連ペプチド抗原でありうる。前記ペプチド抗原の認識後は、前記関与している細胞は標的細胞を溶解する、および/またはこうした標的細胞のアポトーシスを誘導する、またはサイトカイン(例えば、IL-2, IFN-)を放出する前記T細胞により破壊される。

30

30

【0004】

MHCクラスI分子の文脈の中で、腫瘍細胞の表面上に存在としている前記腫瘍関連ペプチド抗原(TAA)の中でも、「普遍的な」TAAは、特に興味の対象となっている。こうした腫瘍関連ペプチド抗原(TAA)は、正常細胞では弱く発現され、また、腫瘍細胞では過剰発現される、細胞質タンパク質から主に誘導される。こうしたタンパク質には、中でも、全てのヒト悪性腫瘍疾病のおよそ50%で、その発現が増加し、特に、固形腫瘍の数において増加しており、また、プロテアソーム媒介減成およびその後のMHCクラスI分子関連提示による発現率が増加している前記「p53」タンパク質が含まれている。

【0005】

前記p53タンパク質のオリゴペプチドは、MHCクラスI分子の文脈においては前記細胞表面に対して提示され、また、CD8陽性T細胞に対して魅力的な標的構造を提示することができる。

40

【0006】

悪性腫瘍の治療のための免疫治療方法を開発する1つのアプローチは、タンパク質特異的T細胞抗原受容体(TCR)の同定である。こうしたT細胞抗原受容体(TCR)は、ある一定の条件下では、T細胞がある種の腫瘍の緩解ならびに根絶をもたらすという目的を携え、一般的には抗原特異性を有し、また、特に腫瘍の反応性を備えた前記T細胞を供給することが可能である。

【0007】

50

Weijtensら(「1つのレトロウイルスベクターシステムである「STITCH」、すなわち、適正化された一本鎖抗体との組合せにより、キメラ受容体遺伝子構造では、ヒトTリンパ球における効果的な遺伝子形質導入および発現が可能となる」、Gene Therapy 5:1995-1203, 1998)は、活性化Tリンパ球の中に遺伝子の形質導入のためのレトロウイルスベクターシステムを記載している。このシステムは、T細胞の膜の中にある抗体をベースとしたキメラ受容体の発現をもたらすために使用される。これらT細胞はその後、例えば、腎癌細胞に対して用いることができる。タンパク質の発現および、そのように成功裡に行われるベクター移入は、FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter; 蛍光標示式細胞分取器)分析という手段により判定され、一方、細胞傷害性アッセイは、成功裡に行われた発現および前記キメラ受容体の機能に関する証拠を提供する。同様に、Eshharら(「免疫グロブリンおよびT細胞受容体の抗体結合ドメインおよびあるいはサブユニットから成るキメラ一本鎖による細胞傷害性リンパ球の特異的活性化と標的化」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:720-724, 1993)は、T細胞抗原受容体(TCR)の定常領域を有する1つの抗体の可変領域から成る、キメラをベースにしている免疫療法における腫瘍特異的リンパ球の作成とその使用法を記載している。これらキメラ遺伝子は、細胞溶解性T細胞ハイブリドーマの表面上で発現することが可能であったし、また、それにより、前記抗原と接触した後に、インターロイキン-2の分泌をもたらしたのである。

10

20

【0008】

Clayら(「ヒト末梢血リンパ球に対する腫瘍抗原反応性T細胞抗原受容体(TCR)の効率的な移入は抗腫瘍反応性をもたらす」、J. Immunology, 163:507-513, 1999)は、MART-1(25-35)特異的T細胞抗原受容体(TCR)の-TCRおよび-TCR鎖の遺伝子の分離と、ヒト末梢血リンパ球(PBL)におけるその発現を記載している。さまざまなメラノーマ細胞系統の溶解が記載されている。

【0009】

Darcyら(「エキソピボ遺伝子工学的に処理されたTリンパ球(CTL)による大腸がんの再定方向パーフォリン依存性溶解」、J. Immunol., 164:3705-3712, 2000)は、scFv抗CEA受容体形質導入Tリンパ球(CTL)と、パーフォリンと、-インターフェロン(IFN)を使用して、大腸がんのための免疫治療手順を記載している。キメラ特異的受容体構築は、レトロウイルスベクターという手段により、初代マウスTリンパ球の中に形質導入される。こうした細胞は、大腸がん細胞系統とともに前もって接種されたマウス(養子T細胞移入として知られているもの)の中に注入された。

30

【0010】

Theobaldら(「全身性腫瘍抗原としてp53を標的化」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11993-11997, 1995)からは、p53野生型配列由来ペプチド注入後のp53特異的細胞傷害性T細胞の作成が公知のものとなっている。これらのT細胞系統という手段により、ヒト腫瘍細胞の選択{培地}を溶解することが結果的に可能となった。p53に対して定方向に方向付けられた前記溶解T細胞の特異的T細胞抗原受容体(TCR)の遺伝子の分離は記載されていない。国際公開第WO97/32603号は腫瘍組織に対して定方向に方向付けられた特異的T細胞抗原受容体(TCR)を発現させる、組換えTリンパ球の作成のためのプロセスを一般的に記載している。このプロセスの中で、HLAトランスジェニックマウス(この事例では、HLA-A2.1)が、その表面上で特異的T細胞抗原受容体(TCR)を発現させる細胞傷害性Tリンパ球の産生をこのようにもたらすために、腫瘍関連抗原により免疫化される。腫瘍関連抗原としては、Her-2/neu、Ras、p53、チロシナーゼ、MART、gp100、MAGE、BAGE、MUC-1などのさまざまな遺伝子のペプチドが記載されている。前記Her-2/neu特異的Tリンパ球から、相当する非ヒトT細胞抗原

40

50

受容体 (TCR) の前記 - および - 鎖の少なくとも 1 つの可変領域を含むヌクレオチド配列が分離され、また、さまざまな遺伝子 (中でも「ヒト化」) T 細胞抗原受容体 (TCR) 構築物において使用されている。このように、国際公開第 WO 97 / 32603 号は、CD3、CD8 あるいは CD16 の前記 領域とともに T 細胞抗原受容体 (TCR) の可変領域の融合タンパク質、ならびに、アミノ酸配列 (GGGGS)₃ の可動リンカーの使用法も記載している。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、p53 のアミノ酸 264 - 272 の前記オリゴヌクレオチドに対して特異的に定方向に方向付けられた T 細胞抗原受容体 (TCR) およびその使用法は、上述されている公表物によっては、また、他の文献の中では、言及も示唆もされてはいない。

10

【0012】

したがって、本発明は、前記 p53 タンパク質に対して定方向に効果的に方向付けられている 1 つの新規な T 細胞抗原受容体 (TCR) の前記鎖 (- TCR および - TCR) の前記マウス遺伝子を有用にするという目的に基づいている。これらにより、p53 タンパク質発現細胞は、前記遺伝子を供給された T 細胞により認識され、サイトカインが分泌され、また、T 細胞導入溶解および / または腫瘍あるいは白血病細胞のアポトーシスがもたらされる。

【課題を解決するための手段】

20

【0013】

本発明により、この目的は、配列番号 1 から配列番号 5 による p53 タンパク質特異的 T 細胞応答を媒介する前記マウス / T 細胞抗原受容体 (TCR) の前記ポリペプチド、あるいは機能的変異体あるいはその部分あるいはそれらをコードする核酸、機能的変異体あるいはその部分、特に置換、欠損、挿入、付加、転化および / または、1 つあるいはそれ以上のアミノ酸あるいはそれらをコードする核酸の 1 つ化学的あるいは物理的修飾によって達成される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

シングル - A2 . 1 トランスジェニックマウス (([A2 . 1 x C57BL / 6] x C57BL / 6)_{F1}) から、HLA - A2 . 1 - 制限されていて、また、前記 p53 タンパク質の前記アミノ酸 264 - 272 の前記ペプチドに対して定方向に方向付けられている、p53 タンパク質特異的 T 細胞応答を媒介する前記マウス あるいは - T 細胞抗原受容体 (TCR) 鎖の遺伝子が分離された。この T 細胞受容体 (TCR) のポリペプチドは未知であった。前記遺伝子はヒト末梢血リンパ球 (PBL) の中に野生型 (WT) として、レトロウイルスにより挿入され、また、前記 HLA - 制限抗原認識が、⁵¹ クロム放出試験におけるさまざまな細胞系統の T 細胞抗原受容体 (TCR) 媒介細胞傷害性溶解という手段により機能的に検討された。本発明の前記「定常」 - T 細胞抗原受容体 (TCR) 鎖に加えて、代替的 mRNA 成熟のために生み出された - T 細胞抗原受容体 (- TCR) 鎖変異体 (Behlke と Loh 「マウス T 細胞受容体 鎖転写 (体) の代替的スプライシング」、Nature 322 : 379 - 382, 1986 の中に記載されている) を分離することが可能となった。得られた前記 T 細胞集団は、ナノモル濃度でペプチドを認識し、また、p53 トランスフェクタント (形質移入体) およびさまざまな A2 . 1 陽性悪性腫瘍細胞を効果的に破壊することが可能となった。本発明による前記 p53 特異的 T 細胞抗原受容体 (TCR) は、例えば、指標などの診断用に、および / または例えば、p53 タンパク質と結びついている諸疾患の変調などの治療、あるいは完全に新規な治療上のアプローチが本発明から結果的に生じているなどといった薬学的に活性な物質同定用の適当な以前から公知の材料に含められることはない。

30

40

【0015】

Liura (「ジャーカット T 細胞において発現した HLA A*0201 制限マウス T 細胞

50

胞受容体によるヒト p 5 3 過剰発現腫瘍細胞の標的化」、Cancer Res. 60 : 693 - 701, 2000) は、注入したペプチドをベースにした p 5 3 特異的 T 細胞抗原受容体 (TCR) の作成を記載している。得られた T 細胞はがんの免疫療法に適当なものであると説明している。しかしながら、Liuらにより記載されている前記 T 細胞抗原受容体 (TCR) は、p 5 3 のアミノ酸 149 - 157 のペプチドに対して定方向に方向付けられている。前記 T 細胞抗原受容体 (TCR) により認識される前記腫瘍関連ペプチド抗原 (TAA) エピトープは、治療行為および副作用にとっては非常に重要なものであるため、さらに効果的な、また、p 5 3 のその他のペプチド / エピトープに対して定方向に方向付けられている現在までのところ未知の T 細胞抗原受容体 (TCR) の存在は、ますます驚くべきものとなっている。

10

【0016】

本発明のもう 1 つのさらなる形態は、本発明による前記ポリペプチド、あるいは機能的変異体あるいはその部分、あるいはこれらポリペプチドをコードする核酸、機能的変異体あるいはその部分を含む 1 つの融合タンパク質に関する。

【0017】

前記融合タンパク質は、CD3 あるいは CD8 あるいは CD16 あるいはその部分の前記領域、特に、ヒト CD3 あるいは CD8 あるいは CD16 あるいはその部分の前記領域を含むことにより特徴付けることができる。可動リンカー (Whitlowら「凝集の減少およびタンパク質分解安定性の向上を伴う一本鎖 Fv 用の 1 つの改善されたリンカー」、Prot. Engin. 6 (8) : 989 - 995, 1993)、特に、アミノ酸配列 (GGGS)₃ のリンカーを含む本発明による 1 つの融合タンパク質が好適である。特に、本発明による前記融合タンパク質は、前記 CD3 複合体の前記鎖あるいは前記鎖あるいはその部分の ITAM モチーフ (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif; 免疫受容体チロシンをベースにした活性化モチーフ)、特に、ヒト CD3 あるいはその部分の前記鎖から成ることが可能である。前記融合タンパク質は、さらに、それが、CD8、あるいは CD8、あるいはその部分の Lck 結合モチーフ、特にヒト CD8 のものから成ることにより特徴付けることができる。

20

【0018】

本発明による前記融合タンパク質は、さらに、部分的にキメラあるいは完全にヒト化された および / または - T 細胞抗原受容体 (TCR) 鎖でありうる。本発明のさらに 1 つのアスペクトは、一本鎖 T 細胞抗原受容体 (TCR) である 1 つの融合タンパク質に関する。本発明による 1 つの融合タンパク質は、可動リンカー、特に、前記アミノ酸配列 (GGGS)₃ のリンカーを含むものが好適である。本発明による前記融合タンパク質は、しかしながら、また、それが / - T 細胞抗原受容体 (TCR) であることにより特徴付けることもできる。

30

【0019】

本発明の 1 つのさらなる主題は、p 5 3 タンパク質に結び付けられる諸疾患の診断および / または治療用の、あるいは例えば、本発明による 1 つの核酸が使用されている 1 つの適当な宿主細胞における薬学的に活性な物質の同定用の 1 つの融合タンパク質の作成のための 1 つのプロセスである。

40

【0020】

上述されている本発明による前記ポリペプチドを含む融合タンパク質が作成され、ここでは、前記融合タンパク質自体がすでに、本発明の 1 つのポリペプチドの機能を有しているか、あるいは、前記特定機能は前記融合部分の除去後にはじめて機能的に活性なものとなる。これらには特に、外来アミノ酸を約 1 ~ 200、好適には、約 1 ~ 150、特に約 1 ~ 100、特に 1 ~ 50 という割合で有する融合タンパク質が含まれる。こうしたペプチド配列の実施例は、例えば、大腸菌 (E. coli) のガラクトシダーゼから誘導することができる原核生物のペプチド配列である。さらに、例えば、バクテリオファージ M13 などのウイルスのペプチド配列もまた、当業者には公知のものである「ファージ提示」ブ

50

ロセス用の融合タンパク質をこのように産生するために、使用することもできる。

【0021】

本発明による前記タンパク質の精製に関しては、1つのさらなるポリペプチド(「タグ」)を付加することができる。本発明によるタンパク質タグは、顕著な程度まで複合体を溶離することなく適当な緩衝液による緊縮洗浄によって、マトリックス上で例えば、高親和性吸収を可能にし、また、その後には、制御されたやり方で吸収された複合体の溶離を可能とする。当業者には公知のものである前記タンパク質タグの実施例は、(His)。タグ、Mycタグ、FLAGタグ、Streptタグ、StreptタグII、ヘマグルチニンタグ、グルタチオントランスフェラーゼ(GST)タグ、親和性キチン結合タグを有するインテイン、あるいはマルトース結合タンパク質(MBP)タグである。これらタンパク質タグは、N-、C-末端側および/またはその内側に位置することが可能である。細胞から分離された自然なポリペプチドの他に、本発明による全てのポリペプチドあるいはその部分は、無細胞状態下で、例えば、合成により、あるいはインビトロ翻訳により作成することが出来た。このように、例えば、伝統的な合成の助けを得て、ポリペプチド全体あるいはその部分は合成することができる(メリフィールド法)。本発明による前記ポリペプチドの部分(Parts)は、本発明による前記ポリペプチドのさらなる機能的変異体をこのように得るために適当な遺伝子発現バンクを検索することができるという助けを得て、特に、抗血清の入手には適当なものとなる。

10

【0022】

本発明はまた、前記p53ペプチド抗原(AA 264-272)に対する特異性を有し、好適には、HLA-A2.1の文脈において提示される抗体の誘導体であるポリペプチドに関する。

20

【0023】

本発明はさらに、配列番号：1から配列番号：5までの前記ポリペプチド配列、あるいは機能的変異体あるいはその部分による、レトロインバースペプチド、あるいは擬似ペプチドから成る。前記-CO-NH-ペプチド結合の代わりに、これらペプチドは-NH-CO結合を有する。

【0024】

本発明の目的は、さらに、DNA、RNA、PNA(ペプチド核酸)あるいはp-NA(ピラノシル核酸)である本発明による1つの核酸によって達成され、好適には、1つのDNAは特に、少なくとも8個のヌクレオチドの長さを有する1本の二本鎖DNAであり、好適には、少なくとも12個のヌクレオチドを有し、特に、少なくとも24個のヌクレオチドを有する二本鎖DNAである。前記核酸は、前記核酸の前記配列が、少なくとも1つのイントロンおよび/または1つのポリA配列を有することにより特徴付けることができる。それはまた、そのアンチセンス配列という形態で存在することができる。

30

【0025】

関与している前記遺伝子の発現に関しては、一般的には、1本の二本鎖DNAが好適なものであり、前記ポリペプチドをコードする前記DNA領域が特に好ましいものである。この領域は、ATGに対して同じ読み枠内にある、Kozak共通配列(Kozak, Nucleic Acids Res. 15: 8125-48, 1987)中にある第1開始コドン(ATG)から次の停止コドン(TAG, TGA bzw. TAA)によりはじまる。本発明による前記核酸配列のさらなる1つの使用法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ZhengとKemeny, Clin. Exp. Immunol. 100: 380-382, 1995; NellenとLichtenstein, Trends Biochem. Sci. 18: 419-23, 1993)および/またはリボザイム(Amarzguiouら, Cell. Mol. Life Sci. 54: 1175-202, 1998; Vaishtil, Nucleic Acids Res. 26: 5237-42, 1998; Persidis, Nat. Biotechnol. 15: 921-2, 1997; CoutureとStinchcomb, Trends Genet. 12: 510-5, 1996)の構築である。「アンチセンス」オリゴヌクレオチドを使用して、

40

50

本発明による前記核酸の安定性を減少させる、および/または本発明による前記核酸の翻訳を阻害することが可能である。このように、例えば、インビボおよびインビトロの両方で細胞における相当する遺伝子の発現を減少させることは可能である。したがって、オリゴヌクレオチドは1つの治療法として適当なものになりうる。この方策は、特に、前記「アンチセンス」オリゴヌクレオチドがリポソームにより複合化される場合には(Smythら、J. Invest. Dermatol. 108:523-6, 1997; Whiteら、J. Invest. Dermatol. 112:699-705, 1999; Whiteら、J. Invest. Dermatol. 112:887-92, 1999)、例えば、皮膚、すなわち、表皮および真皮細胞に対して適当なものである。プローブとして、あるいは「アンチセンス」オリゴヌクレオチドとして使用する場合には、一本鎖DNAあるいはRNAが好ましい。

10

【0026】

細胞から分離された天然核酸のほかに、本発明による全ての核酸あるいはその部分もまた、合成により作成することができる。さらに、本発明を実施するために、合成により作成された核酸を使用することができる。このように、本発明による前記核酸は、例えば、ホストリエステル法(例えば、UhlmannとPeyman, Chemical Reviews 90:543-584, 1990を参照)による、遺伝子コード、を利用する配列番号:1~配列番号:5に記載されている前記タンパク質配列の助けを得て、化学的に合成することができる。

【0027】

オリゴヌクレオチドは、概して、エンドヌクレアーゼあるいはエキソヌクレアーゼにより、特に、前記細胞内に発生するDNAアーゼおよびRNAアーゼにより、急速に減成される。したがって、減成に対してそれを安定化させるために、前記核酸を修飾することが利得的なことであり、そのため、前記核酸の高濃度は、長い期間にわたって、前記細胞中に維持される(Beigelmanら、Nucleic Acids Res. 23:3989-94, 1995; Dudycz, WO95/11910, 1995; Macadamら、WO98/37240, 1998; Reeseら、WO97/29116, 1997)。典型的には、こうした安定化は、1つあるいはそれ以上のインターヌクレオチドリソ基の導入により、あるいは、1つあるいはそれ以上の非リンインターヌクレオチドの導入により得ることができる。

20

30

【0028】

適当な修飾インターヌクレオチドは、UhlmannとPeymannの中で概要されている(Chem. Rev. 90:544, 1990)(Beigelmanら、Nucleic Acids Res. 23:3989-94, 1995; Dudycz, WO95/11910, 1995; Macadamら、WO98/37240, 1998; Reeseら、WO97/29116, 1997)。修飾インターヌクレオチドリソラジカルおよび/または本発明による使用法の1つの中で採用することができる核酸における非リンエステル結合には、例えば、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、ホスホロジチオエート、リン酸エステルが含まれるが、一方、非リンインターヌクレオチドアナログには、例えば、シロキサンプリッジ、炭酸ブリッジ、カルボキシ-メチルエステル、アセトアミデートブリッジ、および/またはチオブリッジが含まれる。この修飾により、本発明による前記使用法の1つにおいて採用することができる製薬的組成の安定性が改善されることもまた企図されている。

40

【0029】

本発明のさらなる1つの形態は、ベクター、好適には、プラスミドの形態にあるもの、シャトルベクター、ファージミド、コスミド、発現ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター(Millerら、「遺伝子移入と発現のための改善レトロウイルスベクター」、BioTechniques第7巻、第9号、980ページ、1989)、および/または本発明による核酸を含む、遺伝子治療活性を有するベクターに関する。

【0030】

50

このように、本発明による前記核酸は、ベクター、好適には、発現ベクター、あるいは遺伝子治療において活性となるベクターの中に含めることができる。好適には、前記遺伝子治療において活性となるベクターには、本発明による前記核酸に機能的に結合されるT細胞特異的調節塩基配列が含まれる。前記発現ベクターは原核細胞あるいは真核細胞発現ベクターでありうる。原核細胞発現ベクターの実施例は、大腸菌(E. coli)における発現に関しては、例えば、ベクターpGEMあるいはpUC誘導体であり、また、酵母菌(Saccharomyces Cerevisiae)における発現に対する真核細胞発現ベクターに関しては、例えば、ベクターp426Met25あるいはp426GAL1(Mumbergら、Nucleic Acids Res. 22: 5767-5768, 1994)であり、挿入細胞における発現に関しては、例えば、EP-B1-0127839あるいはEP-B1-0549721に開示されているようなバキュロウイルスベクターであり、また、哺乳動物細胞における発現に関しては、例えば、これらは全て一般的には入手可能である、ベクターRc/CMVおよびRc/R5VあるいはSV40ベクターである。

【0031】

一般的には、前記発現ベクターにはまた、例えば、大腸菌(E. coli)における発現用のtrpプロモーター(例えば、EP-B1-0154133を参照)、酵母菌における発現用のMet25、GAL1、あるいはADH2プロモーター(Russellら、J. Biol. Chem. 258: 2674-2682, 1983; Mumberg, 同上)、昆虫細胞における発現用のバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター(例えば、13.EP-B1-0127839)などのそれぞれの宿主細胞に適しているプロモーターが含まれる。哺乳動物細胞における発現に関しては、適当なプロモーターは、例えば、真核細胞における構成的で、調節可能な組織特異的、細胞サイクル特異的あるいは代謝的に特異的な発現を可能にするものである。本発明による調節可能なエレメントは、プロモーター、アクチベーター配列、エンハンサー、サイレンサーおよび/またはレプレッサー配列である。真核細胞における構成的発現を可能にする適当な調節可能なエレメントの実施例は、RNAポリメラーゼIIIあるいはウイルスプロモーター、CMVエンハンサー、CMVプロモーター、SV40プロモーターあるいは例えば、MMTV(マウス乳腺腫瘍ウイルス; Leeら、Nature, 214: 228-232, 1981)のLTRプロモーター、またさらには、例えば、HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLVあるいはHIVに由来するウイルスプロモーターおよびアクチベーター配列により認識されるプロモーターである。前記真核細胞における調節可能な発現を可能にする調節可能なエレメントの実施例は、適切なレプレッサーと組み合わせたテトラサイクリンオペレーターである(Gossenら、Curr. Opin. Biotechnol. 5: 516-20, 1994)。

【0032】

真核細胞におけるT細胞特異的発現を可能にする調節可能なエレメントの実施例は、これら細胞型においてのみ発現されるタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターあるいはエンハンサーのプロモーターあるいはアクチベーター-配列である。

【0033】

真核細胞における細胞サイクル特異的発現を可能にする調節可能なエレメントの実施例は、以下の遺伝子のプロモーターである。すなわち、cdc25, サイクリンA, サイクリンE, cdc2, E2F, B-mybあるいはDHF(R ZwicklerとMuller, Trends Genet. 13: 3-6, 1997)。真核細胞における代謝的に特異的な発現を可能にする調節可能なエレメントの実施例は、低酸素症により、グルコース欠乏症により、リン酸濃度により、あるいは熱ショックにより調節されるプロモーターである。

【0034】

本発明による前記ベクターは、好適にはT細胞である宿主細胞のトランスフェクションのために使用することができる。特に好ましいものは、それが、その表面上で本発明による

ポリペプチドあるいは融合タンパク質を発現するということにより特徴付けられる宿主細胞である。

【0035】

本発明による前記核酸の導入、また、したがって、トランスフェクション、形質転換あるいは感染による真核細胞あるいは原核細胞における前記ポリペプチドの発現を可能にするためには、前記核酸は、プラスミドとして、ウイルスあるいは非ウイルスベクターの一部として、提供することができる。このケースにおける適当なウイルスベクターは特に、レトロウイルス、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、およびヘルペスウイルスである。このケースにおける適当な非ウイルスキャリアは、特に、ピロソーム、リポソーム、カチオン脂質、あるいはポリリジン抱合型DNA

10

【0036】

遺伝子治療において活性となるベクターの実施例は、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターあるいはレトロウイルスベクターである (Lindemannら、Mol. Med. 3: 466-76, 1997; Springerら、Mol. Cell. 2: 549-58, 1998)。

【0037】

インビボにて本発明によるポリペプチドを発現させるための1つの好適なメカニズムは、特にレトロウイルス粒子の助けを得たウイルス遺伝子移入である。これらは、適切な標的細胞、好ましくは、形質導入による本発明による遺伝子あるいはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する患者のエキソビボのTリンパ球を提供するために好適に利用される。前記標的細胞はその後に、デノボ挿入特異性を用いて、腫瘍殺傷性および/または免疫調節エフェクター機能を模倣するために、養子細胞移入の意味でその患者に再注入することができる。最近、このように、非常に良好な遺伝子治療結果が、順応性免疫システム (Cavazzana-Calvoら、2000) のさまざまなエフェクター細胞への分化にとっては必要不可欠である、小児において発生する鎖遺伝子の非機能的変異体の類似して無傷の導入遺伝子を血液学的前駆体細胞にレトロウイルスにより供給された新生児における免疫不適格性により特徴付けられるSCID-X1疾患の治療において達成されている。

20

【0038】

さらに、インビボにて遺伝子移入を一方では、感染粒子の好適に定位的な注入により、他方では、ウイルス産生細胞の直接的な投与により実施するという可能性を挙げることができる (Oldfieldら、Hum. Gen. Ther. 4: 39-69, 1993)。

30

【0039】

遺伝子の移入のために多くの場合に採用された前記ウイルスベクターは、主に、現在の最新技術による、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスベクターである。これらは、少なくとも前記ウイルス構造タンパク質コード遺伝子が移入されるべき構築物によって置換される、天然ウイルス由来のサイクリックヌクレオチド配列である。

【0040】

レトロウイルスベクターシステムは、安定しているが、しかし、宿主ゲノムの中への定位方向には方向付けられていない組込みにより導入遺伝子の長続きする発現のために必要不可欠なものを作り出す。若年世代のベクターは、まったく関連性のないわけではなく、また、潜在的には免疫原性タンパク質を所持しており、加えて、そこには、前記ベクターに対するレシピエントの以前に存在していた免疫性はない。レトロウイルスには、宿主細胞膜およびウイルスタンパク質の部分 (Parts) から成る脂質被膜の中にパッケージされているRNAゲノムが含まれている。ウイルス遺伝子の発現に関しては、前記RNAゲノムは逆転写され、また、その酵素インテグラーゼにより前記標的細胞DNAの中に組み込まれる。これにより、その後、前記感染細胞により転写し、また、翻訳することができ、それによって、ウイルス構成物が組み合わさってレトロウイルスを生じるという結果をも

40

50

ちらした。RNAはもっぱらその後、前記新たに形成されたウイルスの中に挿入される。レトロウイルスの前記ゲノムは3つの必要不可欠の遺伝子を有する。すなわち、ウイルス構造タンパク質をコードするgag、「グループ特異的抗原」、逆転写酵素やインテグラーゼなどの酵素用のpol、また、宿主特異的受容体の結合を司っている被膜タンパク質（「エンベロープ」）用のenvである。複製形質転換受容性ウイルスの産生が、gag/polコード遺伝子を付加的に備え、また、これらを「トランス形に」発現させ、また、したがって複製形質転換受容性（例えば、gag/pol欠失）トランスジェニックウイルス粒子の形成を補完する、「パッキング細胞系統」におけるトランスフェクション後に生じる。1つの代替物は、必要不可欠なウイルス遺伝子のコトランスフェクションであり、パッケージングシグナルを担体する導入遺伝子を含む前記ベクターのみである。

10

【0041】

一方では、こうした遺伝子の分離は、さまざまな株から得られたenv読み枠とのgal/pol読み枠の任意の組合せを可能にし、それによって、修飾された宿主向性を有するブソイドタイプが生じ、一方、パッケージング細胞内にある複製形質転換受容性ウイルスの形成を、それによって劇的に減少させることができる。本ケースにおいて使用される「テナガザル白血病ウイルス」（GALV）由来の被膜タンパク質は、ヒト細胞を形質導入することができ、また、両向性宿主範囲（Millerら、1991）を備えた前記パッケージ細胞系統PG13において確立される。付加的には、その安全性は、相同的組換えの防止、またしたがって、複製・形質転換受容性粒子の産生のための非必須ウイルス配列の選択的な欠失により増大される。

20

【0042】

新規な、非ウイルスベクターは、例えば、リポソームトランスフェクションにより宿主細胞の中に挿入される自律的な自己組込みDNA配列、トランスポゾンで構成され、また、哺乳動物細胞におけるヒト導入遺伝子の発現に対して初めて成功裡に用いられた（Yantら、2000）。

【0043】

遺伝子治療において活性化ベクターはまた、それによって特に皮膚細胞の非常に高いトランスフェクション効率を達成することができるので、リポソームによる本発明の前記核酸を複合化することにより得ることができる（AlexanderとAkhurst, Hum. Mol. Genet. 4: 2279-85, 1995）。リポフェクションは、リポソーム懸濁液の超音波処理により、カチオン脂質からの小さな単層小胞を作成することから成る。そのDNAは前記リポソーム表面にイオンの結合され、また、正の正味電荷が残り、また、プラスミドDNAは前記リポソームにより100%複合化されるというそういった割合で結合される。Felgnerら（1987、同上）により用いられた脂質混合物DOTMA（1,2-ジオレイルオクスプロピル-3-トリメチルアンモニウムブロマイド）およびDPOE（ジオレイルホスファチジルエタノールアミン）に加えて、数え切れないほどの数の新しい脂質組成がその後、合成され、また、さまざまな細胞系統をトランスフェクトするその効率に関して測定された（Behrら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986, 1989; Felgnerら、J. Biol. Chem. 269: 2550-2556, 1994; GaoとHuang, Biochem. Biophys. Acta 1189: 195-203, 1991）。前記新しい脂質組成の実施例は、DOTAP-N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムエチルスリフェートあるいはDOG5（TRASFECTAM; ジオクタデシル-アミドグリシルスペルミン）である。前記細胞への核酸の移入を増加させる賦形剤は、例えば、前記細胞の核の中に前記核酸の移送を可能にするDNAあるいは合成ペプチドDNA分子に結合されるタンパク質あるいはペプチドでありうる（Schwartzら、Gene Therapy 6: 282, 1999; Brandenら、Nature Biotech. 17: 784, 1999）。賦形剤にはまた、前記細胞の細胞質の中へ核酸の放出を可能にする分子（Kiehlら、Bioconj. Chem. 8: 213, 1997）あるいは、例えば、リポ

30

40

50

ソーム (Uhlmann と Peymann, 1990, 同上) が含まれる。遺伝子治療ベクターのもう1つの特に好適な形態は、本発明の前記核酸を、金粒子に適用することにより、また、「遺伝子銃」の助けを借りて、これらを組織の中に打ち込むことにより、好適には皮膚あるいは細胞の中に打ち込むことにより、得ることができる (Wangら、J. Invest. Dermatol. 112: 775 - 81, 1999)。

【0044】

本発明の前記核酸の遺伝子治療適用に関しては、前記ポリペプチドをコードする前記核酸の一部が、イントロン配列、好適には、プロモーターと前記ポリペプチドの開始コドンとの間の配列、および/またはポリA配列、特に、天然に生じるポリA配列、あるいはSV40ウイルスポリA配列、特に前記遺伝子の3'末端にある配列を含む1つあるいはそれ以上の非コード配列を含む場合にも利得的である。これによってmRNAの安定性を達成することができるということが意図されているからである (Jackson, Cell 74: 9 - 14, 1993; Palminterら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 478 - 482, 1991)。

10

【0045】

本発明のさらなる1つの目的は、宿主細胞であって、特に、本発明のベクターあるいは本発明の別の遺伝子構築物を使用して形質転換されるT細胞である。宿主細胞は、原核細胞あるいは真核細胞のいずれでもありうるものであり、原核細胞の宿主細胞の実施例は大腸菌 (E. coli)、真核細胞の実施例は、酵母菌 (Saccharomyces cerevisiae) あるいは昆虫細胞である。

20

【0046】

1つの特に好適な形質転換宿主細胞は、それが本発明の遺伝子構築物あるいは本発明の発現カセットから成るトランスジェニックT前駆体細胞あるいは幹細胞である。宿主細胞および/または幹細胞の形質転換のためのプロセスは、当業者には周知のものであり、また、それらには、例えば、電気穿孔 (エレクトロポレーション) 法、マイクロインジェクション法、あるいは形質導入法が含まれる。特に好適な1つの形質転換宿主細胞は、本発明の遺伝子構築物を使用して取り出した後にトランスフェクションされる、あるいは形質転換される患者自身のT細胞である。本発明の宿主細胞は、前記患者から1つあるいはそれ以上の細胞、好適には、T細胞、特に、本発明による宿主細胞をこのように得るために、本発明の1つあるいはそれ以上の遺伝子構築物を使用してエキソピボにてトランスフェクションされるあるいは形質導入されるCD8⁺T細胞を取り出すことにより、特に得ることができる。エキソピボにて生じた特異的T細胞はその後引き続き、前記患者に再移植することができる。そのプロセスはしたがって、scFv抗CEA受容体、パーフォリン、およびIFNにより形質導入されたTリンパ球 (CTL) を使用してDarcyら (「エキソピボにて遺伝子工学的に処理されたTリンパ球 (CTL) による大腸がんの再定方向パーフォリン依存性溶解」、J. Immunol. 164: 3705 - 3712, 2000) の中に記載されているプロセスに類似している。

30

【0047】

p53タンパク質特異的抗原の同定用の本発明によるさらなる好適な1つのプロセスは、p53提示腫瘍細胞あるいはその部分が、発現されたポリペプチドあるいは融合タンパク質がそれに対して特異的であるp53タンパク質特異的抗原を前記腫瘍が提示している場合は、前記腫瘍細胞あるいはその部分が単に溶解される条件下で本発明による宿主細胞との組合せられるということにより特徴付けられる。

40

【0048】

本発明のさらなる1つの形態は、抗体の作成のための1つのプロセスであって、好適には、p53タンパク質に関連している諸疾患の診断および/または治療、あるいは、薬学的に活性な物質の同定のためのポリクローナルあるいはモノクローナル抗体の作成のための1つのプロセスであって、抗体産生組織が、本発明による1つのポリペプチド、あるいはその機能的な等価物、あるいは少なくとも6個のアミノ酸を有する、好適には、少なくとも8個のアミノ酸を有する、特に少なくとも12個のアミノ酸を有するあるいは本発明

50

による核酸を伴うその一部分により免疫化されることにより特徴付けられる1つのプロセスに関する。

【0049】

前記プロセスは、例えば、不完全なフロイントのアジュバントおよび/または水酸化アルミニウムゲル（例えば、Diamondら、The New England Journal of Medicine, 1344-1349, 1981を参照）の存在下で適切である場合は、本発明の前記ポリペプチドあるいは上述のその一部分、あるいはこれ（これら）をコードする核酸により、哺乳動物、例えば、ウサギを免疫化することにより当業者には一般的に公知のものである諸方法により実施される。免疫学的反応に関わる前記動物の中に形成される前記ポリクローナル抗体は、その後、例えば、カラムクロマトグラフィーという手段により、一般的に知られている諸方法によりその血液から容易に分離し、また、精製することができる。モノクローナル抗体は、例えば、WinterとMilsteinの公知のものである方法（Nature 349:293-299, 1991）により、作成することができる。

10

【0050】

本発明のさらなる1つの目的とするものは、例えば、ウシ血清アルブミンなどの適当なキャリアに結合させることにより、前記ポリペプチドの上述の部分をもそれ自体免疫原性とするか、あるいは免疫原性とすることができるか、あるいはその免疫原性において増加させることができるかのいずれかである場合は、本発明による1つのポリペプチドに対して定方向に方向付けられ、また、本発明による前記ポリペプチドと特異的に反応する、p53タンパク質と関連している諸疾患の診断、予後および治療最適化のための、あるいは薬理的に活性である物質の同定のための1つの抗体である。この抗体は、ポリクローナルあるいはモノクローナル抗体のいずれかが好ましい。抗体という用語は、本発明によると、遺伝子工学的により作成されたという意味としても理解されており、また、任意に修飾された抗体、あるいは、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、多機能抗体、両特異的抗体あるいはオリゴ特異的抗体、一本鎖抗体、F(ab)あるいはF(ab)₂断片（例えば、EP-B1-0368684, 米国特許第4,816,567号、米国特許第4,816,397号、国際公開第WO88/01649号、国際公開第WO9306213号、国際公開第WO98/24884号を参照）などのその抗原結合部分として理解される。本発明による前記抗体は、p53タンパク質に関連している諸疾患の診断、治療モニタリング、および/または治療用に、あるいは、薬理的に活性である物質の同定用に使用することができる。

20

30

本発明はさらに、p53タンパク質に関連している諸疾患の治療に対する薬物の産生のための1つのプロセスに関し、上述の請求項の1つに記載されている少なくとも1つの核酸、少なくとも1つのポリペプチド、少なくとも1つの宿主細胞、あるいは少なくとも1つの抗体が、適当な添加剤、および賦形剤と一緒に組み合わせられるということにより特徴付けられる1つのプロセスに関する。

【0051】

本発明はさらに、適当な添加剤および賦形剤と一緒に適切なものである場合は、本発明による少なくとも1つの核酸、少なくとも1つのポリペプチドあるいは少なくとも1つの抗体を含むp53タンパク質に関連している諸疾患の治療のためのこのプロセスにより作成される1つの薬物に関する。本発明はさらに、p53タンパク質に関連している諸疾患の治療のためのこの薬物の使用法に関する。

40

【0052】

p53タンパク質に関連している諸疾患の前記治療は、例えば、本発明による前記薬物を含む注入あるいは注射という手段により、通常のやり方で実施することができる。本発明による前記薬物の投与は、さらに、リポソーム複合体あるいは金粒子複合体という形態で任意に実施することができる。しかしながら、本発明による前記薬物という手段による治療はまた、例えば、錠剤あるいはカプセルといった経口投与形態により、例えば、鼻あるいは口腔といった粘膜を経て、あるいは、皮膚の下に移植されたデポジトリ（保管）とい

50

う形態で、実施することもできる。経皮的な治療システムは、例えば、EP 0 9 4 4 3 9 8 A 1, EP 0 9 1 6 3 3 6 A 1, EP 0 8 8 9 7 2 3 A 1, あるいは、EP 0 8 5 2 4 9 3 A 1 から公知のものである。本発明による前記（ポリ）ペプチドとその誘導体はまた、p 5 3 . 2 6 4 - 2 7 2 - 特異的細胞傷害性Tリンパ球の誘導、産生および拡大を達成するために、また、関わっている患者の腫瘍および白血病細胞を破壊するために標的化されるやり方で、p 5 3 と関連している諸疾患、特に腫瘍に罹患している患者を免疫適格性にするために用いることもできる。こうした諸疾患には、例えば、固形腫瘍、リンパ血行性産生新生物、悪性血液学的疾患あるいは骨髄芽球クリーゼが含まれる。

【0053】

治療の特に好適なタイプでは、1つあるいはそれ以上の細胞、好適にはT細胞、特にCD8⁺T細胞が患者から採取され、それがその後、本発明による1つあるいはそれ以上の遺伝子構築物によりエキソピボにてトランスフェクションされるか、あるいは形質導入される。エキソピボにて生じた特異的T細胞はその後引き続いて、前記患者に再注入あるいは移植することができる。そのプロセスはしたがって、scFv抗CEA受容体、パーフォリン、およびIFNにより形質導入されたTリンパ球（CTL）を使用してDarcyら（「エキソピボにて遺伝子工学的に処理されたTリンパ球（CTL）による大腸がんの再定方向パーフォリン依存性溶解」、J. Immunol. 164: 3705-3712, 2000）の中に記載されている免疫学的治療プロセスに類似している。

【0054】

本発明のさらなる1つの形態は、本発明による少なくとも1つの核酸、少なくとも1つのポリペプチド、あるいは少なくとも1つの抗体が適当な添加剤および賦形剤と一緒に組み合わせることにより特徴付けられる、p 5 3 タンパク質関連諸疾患に関連している機能的相互作用因子発見用テストの創出のための1つのプロセスに関する。

【0055】

本発明の意味の範囲内では「機能的相互作用因子」という用語は、適当な条件下で適当な添加剤および賦形剤と一緒にして適切である場合は、本発明による前記核酸、ポリペプチド、あるいは抗体と相互作用することができる全てのそうした分子、化合物および/または組成物および物質混合物を意味するものとして理解されるべきものである。可能な相互作用因子は簡単な有機化学あるいは無機化学分子あるいは化合物であるが、しかしまた、ペプチド、タンパク質、あるいはそれらの複合体も含めることができる。それらの相互作用のため、前記機能的相互作用因子は、インピボ、あるいはインピトロの前記核酸、ポリペプチド、あるいは抗体の機能に影響を及ぼすことができ、あるいは、その代わりになるものとして、本発明による前記核酸、ポリペプチド、あるいは抗体に単に結合することができ、あるいは、それらと、共有結合、あるいは非共有結合のやり方の他の相互作用を開始することができる。

【0056】

本発明はさらに、適当な添加剤および賦形剤と一緒にして適切なものである場合は、本発明による少なくとも1つの核酸、少なくとも1つのポリペプチド、少なくとも1つの抗体を含むp 5 3 タンパク質と関連している諸疾患に関連している機能的相互作用因子の同定のための、本発明により創出されるテストから成る。多くの場合は、インピトロの前記細胞の病理学的挙動は、したがって、模倣することができ、また、前記細胞の正常挙動を回復させ、また、治療上の潜在能力を所持している物質は探し求めることができる。さらに、このテストシステムは本発明の前記ポリペプチドと機能的相互作用因子との間の相互作用を阻害する物質のスクリーニング用に使用することができる。

【0057】

本発明の目的の1つはまた、本発明による核酸、あるいは本発明によるポリペプチドを含むp 5 3 タンパク質と関連している諸疾患の例えば、診断および治療といった適応症に対する薬物であって、また、適当な添加剤あるいは賦形剤と一緒にして適切なものである場合に、本発明の核酸あるいは本発明のポリペプチドが、製薬的に受け入れ可能なキャリア

10

20

30

40

50

により製剤化される、p53タンパク質と関連している諸疾患の治療のためのそうした薬物の産生のためのプロセスである。

【0058】

実現可能な治療法および/または予防薬は、活性化化合物として、(a)本発明による前記TCRポリペプチドおよび/またはその誘導体および/または(b)本発明による核酸および/または(c)p53、264-272に対して特異的に定方向に方向付けられているTCRを含む、インビトロあるいはエキソビボにて産生されるTリンパ球を含む、特に、ワクチン、組換え粒子あるいは注射あるいは注入溶液である。

【0059】

ヒトにおける遺伝子治療適用に関しては、裸の形態で、あるいは上述されている遺伝子治療において活性であるベクターの1つの形態で、あるいは、リポソームあるいは金粒子により複合化された形態で、本発明による前記核酸を含む、薬物および/または組換え粒子は特に適当なものである。前記製薬上のキャリアは、好適には、pH約6.0~8.0、好適には、pH約6.8~7.8、特にpH約7.4、および/または約200~400mosmol/Lの浸透圧、好適には、約290~310mosmol/Lの浸透圧を有する例えば、生理学的緩衝溶液である。さらに、前記製薬上のキャリアには、例えば、ヌクレアーゼ阻害剤、好適には、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)などの錯化剤、および/または、当業者には公知のものであるその他の賦形剤といった適当な安定剤を含めることができる。

10

【0060】

本発明のさらなる1つの目的は、本発明による核酸を適当なやり方で発現させるということにより特徴付けられる、p53タンパク質と関連している諸疾患の診断および/または治療あるいは適当な宿主細胞において薬理的に活性な物質の同定用ポリペプチド作成のためのプロセスに関する。

20

【0061】

前記ポリペプチドは、例えば、熟練した技術を有する同業者には一般的に公知のものである前記諸方法により、すでに上述されているように、適当な発現システムにおいて、本発明の前記核酸の発現により、このように作成される。適当な宿主細胞とは、例えば、全て一般的に入手可能なものである、例えば、大腸菌(*E. coli*)株DHS、HB101、あるいはBL21、酵母菌株*Saccharomyces cerevisiae*、昆虫細胞系統、例えば、*Spodoptera frugiperda*由来のもの、あるいは動物細胞COS、Vero、293、HaCat、Helaである。

30

【0062】

治療モニタリングのための本発明による1つの診断法には、上記に非常に詳細に説明されている、本発明による前記ポリペプチド、あるいはその免疫学的に活性な部分が含まれる。例えば、ニトロセルロースあるいはナイロンで出来ている固相に好適に結合している前記ポリペプチドあるいはその部分は、例えば、自己免疫抗体あるいは腫瘍および白血病細胞と反応することが可能であるようにするために、調査すべき例えば、血液である体液とインビトロにて接触させることができる。前記抗体-抗原複合体は、その後、例えば、標識化された抗体ヒトIgGあるいは抗ヒトIgM抗体の助けを借りて、検出することができる。前記標識は、着色反応を触媒する、例えば、酵素、例えば、ペロオキシダーゼ、あるいは別の適当な標識である。自己抗体の存在およびその分量はこのように、前記着色反応という手段により容易にまた素早く検出することができる。

40

【0063】

治療モニタリングのためのもう1つの診断法には、本発明による抗体自体が含まれる。こうした抗体の助けを借りて、例えば、組織サンプルは、p53タンパク質と関連している諸疾患をそれによって診断するために、また、治療のための徴候をそれによって得るために、増大した量の中に前記関与しているポリペプチドが存在しているかどうかを調べることができる。この場合は、本発明による前記抗体は、例えば、すでに上記に説明されているように、酵素により標識化される。前記特異的抗体-抗原複合体はそれによって、容易

50

に、また、同様に素早く、酵素による着色反応という手段により検出することができる。

【0064】

本発明によるさらなる1つの診断法は、プローブ、好適には、DNAプローブ、および/またはプライマーから成る。これにより、適当なプローブの助けを借りて、例えば、適当な遺伝子バンクから分離することによって、本発明による前記核酸を得るというさらなる可能性が開かれる(例えば、Sambrookら、「Molecular Cloning. A Laboratory Manual」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ニューヨーク、第8章8.1ページ~8.81ページ、第9章9.47ページ~9.58ページ、および第10章10.1ページ~10.67ページ)。

10

【0065】

適当なプローブは、例えば、約100~1000個のヌクレオチドの長さを有する、好適には、約200~500個のヌクレオチドの長さを有する、特に、約300から400個のヌクレオチドの長さを有するDNAあるいはRNA断片であり、その配列を配列表の配列番号:1~配列番号:5による前記ポリペプチドから誘導することができる。

【0066】

代替的には、ポリメラーゼ連鎖反応用のプライマーとして適当なものである前記誘導核酸配列の助けを借りて、オリゴヌクレオチドを合成することができる。適当なプライマーは、約10~100個のヌクレオチドの長さを有する、好適には、約15~50個のヌクレオチドの長さを有する、特に、20~30個のヌクレオチドの長さを有するDNA断片であり、例えば、その配列は、前記遺伝子コードによる相当するcDNA配列の助けを借りて、配列表の配列番号:1~配列番号:5による前記ポリペプチドから誘導することができる。

20

【0067】

「コード核酸」という用語は、本発明による分離可能な生物学的に活性なポリペプチド又はプリカーサーをコードする1つのDNA配列に関する。前記ポリペプチドは、前記特異的な、例えば、酵素活性が保持されている限り、前記コード配列の完全長あるいはいずれかの部分の配列によりコードすることができる。

【0068】

本発明の前記核酸の前記配列における小さな変化は、例えば、遺伝子コードの変性により、起こすことが可能であること、あるいは非翻訳配列は、その活性を顕著に変化させることなく、前記核酸の5'および/または3'末端で、付加することができることが知られている。本発明はしたがってまた、本発明による前記核酸の「機能的変異体」から成る。

30

【0069】

「機能的変異体」という用語により、1つのDNA配列に対して相補的なものであって、特に高頻度可変性V(D)J領域において、誘導基準配列あるいはその部分により、緊急条件下でハイブリダイズされ、また、本発明の相当するポリペプチドに対して類似しているあるいは同一の活性を有する全てのDNA配列が表わされる。

【0070】

「緊縮ハイブリダイゼーション条件」という用語は、ハイブリダイゼーションが2.5x SSC緩衝液の中で60にて起こり、その後低緩衝液濃度の中で37にていくつもの洗浄ステップが続き、安定したままの状態になっている、そうした条件を意味するものとして理解されるべきである。

40

【0071】

本発明の意味の範囲内では、「機能的変異体」という用語は、本発明による前記ペプチドに機能的に関係しており、すなわち、前記ポリペプチドの構造的な特徴を有するポリペプチドを意味するものとして理解される。機能的な変異体の実施例は、マウス以外の、ヒトの組織を起源とし、あるいは、好適には、非ヒト哺乳動物、例えば、サル、ブタ、ラット、あるいはその他の鳥、例えば、ニワトリなどを起源とするものに相当するポリペプチドである。機能的変異体のその他の実施例は、さまざまな個人において、組織のさまざまな

50

器官において、前記遺伝子の異なる対立遺伝子によりコードされるポリペプチドである。本発明の目的のため、機能的な変異体は、本発明の前記T細胞抗原受容体(TCR)として、前記p53タンパク質の同一エピトープを認識する、特にポリペプチドである。さらなるもう1つの意味では、これらもまた、配列番号：1～配列番号：5の1つによる前記アミノ酸配列を有する前記ポリペプチドに対して、および/または、前記ペプチド配列の助けを借りて誘導されたDNA配列に対して、配列相同性、特に、約70%の配列同一性、好適には、約80%、特に約90%、さらに特に約95%の配列同一性を有するポリペプチドを意味するものとして理解される。これらの中にはまた、約1～60個の、好適には、約1～30個の、特に、約1～15個の、特に約1～5個のアミノ酸の範囲にある前記ポリペプチドの欠失、転化、付加、置換、挿入、化学的および/または物理的修飾、あるいはその一部分が含まれる。例えば、第1アミノ酸メチオニンは、有意に修飾されている前記ポリペプチドの前記機能がなくても、欠くことが可能である。

【0072】

次に、本発明は、これによって制限されることなく、添付の実施例および符号により、図面を参照して説明する。前記符号などは、以下のとおりである。

【0073】

図2は、作成された前記T細胞抗原受容体(TCR)鎖の図である。可変セグメント(V₃/J)の命名法はArdenら(Immunogenetics 42:501-530, 1995)に従い、Jセグメントおよび定常ドメインの命名は、Immunogeneticsデータベース(<http://imgt.cines.fr>:8104)に従った。この配列をベースにして、T細胞抗原受容体(TCR)鎖V₃、V₁₃、V_{3C}0は増殖性のものであり、一方、V₁は組換え領域V-D-Jにおけるフレームシフトを有しており、その結果、T細胞抗原受容体(TCR)鎖ポリペプチドに対して増殖性のものではない。C₀は、代替的なスプライシングにより産生された挿入片である。切断型形態のみが作成され、また、したがって分化は不可能であったため、われわれは、いずれかのサブファミリーにV₁鎖の定常ドメインを割り当てることができなかった。

【0074】

配列番号1は、「V₃」を示す。すなわち、増殖性、機能的マウス鎖(μV₃-muc)である。(図2を参照のこと)。

【0075】

配列番号2は、「V₁₃」を示す。すなわち、増殖性マウス鎖(μV₁₃-muc)である。(図2を参照のこと)。

【0076】

配列番号3は、「V₁」を示す。すなわち、非増殖性、非機能的マウス鎖(μV₁-muc)である。(図2を参照のこと)。

【0077】

配列番号4は、「V₃」を示す。すなわち、増殖性、機能的マウス鎖(μV₃-muc)である。(図2を参照のこと)。

【0078】

配列番号5は、「V_{3Cb0}」を示す。すなわち、Cb1のCb0上流挿入によるV₃のスプライシング変異体である。(図2を参照のこと)。

【0079】

配列番号6は、プライマーGSP-1(rev__R__aSP1)を示す。

【0080】

配列番号7は、プライマーGSP-2(rev__R__aSP2)を示す。

【0081】

配列番号8は、プライマーGSP-3(rev__Asc__aTCR__c1.2)を示す。

【0082】

配列番号9は、プライマーGSP-4(rev__Asc__bTCR__c2)を示す。

【0083】

配列番号10は、プライマー-GSP-5 (rev__bTCR__c4)を示す。

【0084】

配列番号11は、プライマー-GSP-6 (rev__Asc__bTCR__c6)を示す。

【0085】

配列番号12は、V3を示す。すなわち、前進プライマー (for__Va3 - NcoI__1)である。

【0086】

配列番号13は、V3 (C0)を示す。すなわち、前進プライマー (for__Vb3 - NcoI__1)である。

10

【0087】

配列番号14は、V13を示す。すなわち、逆転写プライマー (for__Va13 - NcoI__1)である。

【実施例】

【0088】

細胞基質mRNAは、製造業者のプロトコルにより、商業的に入手可能なQIAブレップミニブレップ (QIAGEN社、Hilden市ドイツ連邦共和国)を用いて作成された。5' RACE-PCRは、製造業者のプロトコルにより、商業的に入手可能なRACE PCRキット (Roche Molecular Diagnostics社)を用いて実施された。前記RACE-PCRプロトコル範囲内の逆転写に対する1つの代替物として、ディスプレイサーモ-RT (Display Systems Biotech社、米国カリフォルニア州Vista市)を用いて実施された。ベクターpCR (登録商標) 2.1-TOPO (登録商標) およびpCR (登録商標) XL-TOPO (登録商標) の中にクローン化して入れるために、製造業者のプロトコルにより、それに対応するキット (Invitrogen社、オランダ)が使用された。細胞傷害性アッセイは、Theobaldらの中に記載されている方法により実施された(「1つの一般的な腫瘍抗原としてp53を標的とする」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11993-11997, 1995)。

20

【0089】

1. -TCR鎖のクローニング

p53.264-272特異的HLA-A2.1-制限マウスCTLクローンから前記mRNAを抽出した後、完全長 -TCR鎖が、自己設計遺伝子特異的プライマー (配列番号: 6~配列番号: 14) という手段により、5' -RACE-PCR (Goehring Mannheim社、ドイツ)によって分離された。前記特異性は、2回目のPCR (入れ子状態PCR)の前にアガロースゲルから前記DNA中間体 (およそ1100bp)を作成することにより、増大させた。長さおよそ1000bpの産物は、その後、製造業者のインストラクションにより前記pCR (登録商標) -XL-TOPO (登録商標)ベクターシステムの中にクローン化して入れられ、配列を決められた。

30

【0090】

図1は、前記プライマーと前記鎖のクローニングの定位を図式的に示す。前記TCR-鎖の発現領域全体の増幅用の前記遺伝子特異的プライマーが、前記3'非発現領域 (UTR)において対形成するように選択された。停止コドン上で最終的には対合する前記遺伝子特異的プライマー-GSP-3 (配列番号: 8)は、その5'突出末端を經由してAscI部位を人工的に導入する。前記遺伝子特異的プライマーの配列は公表されているマウスTCR鎖配列を比較し、また、適当な領域を選択することにより、決定された。

40

【0091】

2. 切断されたT細胞抗原受容体 (TCR) 鎖のクローニング

前記TCR鎖のクローニングは、前記鎖に関しては実施されたが、前記鎖の定常ドメインのさまざまな遺伝子が存在するため、前記発現領域の外側で対合するいずれかの遺伝子特異的プライマーを使用することはここでは可能なことではない。したがって、3'切

50

断産物が精製されなければならず、前記5'-RACE PCRを再び利用し、また、前記産物は配列決定された。第1回目のPCRの産物は、ゲル電気泳動法においては何らの明確なバンドを示すこともなかったが、にもかかわらず、前記ゲルから抽出され、また、前記入れ子状態PCRに供給された。結果的に生じるダブルバンドはその後、前記TOPPO(登録商標)ベクターシステム(Invitrogen社)の中にクローン化されて入れられた。

【0092】

3. T細胞抗原受容体(TCR)鎖配列の分析

5つの異なるT細胞抗原受容体(TCR)鎖コード配列が前記PCR産物を配列決定することにより識別された。すなわち、

V₃: 生産的なTCR鎖であり、機能的である(配列番号: 1);

V₁₃: 生産的なTCR鎖(配列番号: 2);

V₁: 欠陥のある再配列(V₁->D: フレームシフト)による非生産的鎖であり、非機能的である(配列番号: 3);

V₃: 生産的鎖であり、機能的である(配列番号: 4);

V₃C₀: V₃の変異体を、C₁の上流にあるC₀挿入片により、スプライシングする(配列番号: 5)。

【0093】

4. レトロウイルスpBulletベクターシステムの中に生産的鎖をクローン化して入れる

前記5'領域において対合する、各鎖用に配列を取得したプライマーから誘導することが可能であった。これら配列は、PCRおよび出発コドンATGの周辺にあるNcoI部位(CCATGG)を経由して導入し、それによって、前記鎖の場合には、前記第2塩基トリプレットを修飾し、また、そのように第2アミノ酸を修飾することが可能であるといったようなやり方で修飾された。

【0094】

前記レトロウイルスpBulletベクターの中にクローン化して入れるために、第1mRNAは再び逆転写された(ディスプレイサーモ-RT、20ページを参照)が、しかしこの時には、前記RNAの前記ポリA尾部において対合した、1つのオリゴ-dTプライマー(ディスプレイサーモ-RT、20ページ参照)を使用することによるものであって、それによって、その後に行われたPCRにおける鋳型として役立ったRNA全体の逆転写(一本鎖cDNA)を産生することとなった。

【0095】

4.1 V₃/V₁₃のクローン化

前記TCR鎖は、上述の逆転写および前記フランキングNcoIおよびSalI部位が導入されたPCRによりクローン化された。pBulletおよび挿入片は、NcoIおよびSalIにより加水分解され、前記挿入片(V₃/V₁₃)は、標準的な諸方法により結合された。形質転換受容性細胞の形質変換後、陽性クローンを配列決定された。誤りのないV₁₃クローンがさらなる実験のために選択された。使用可能なクローンの収率は、V₃に関しては低いため、また、停止コドンにおける誤りとは関係無く、それらの1つは受け入れ可能であったため、後者のクローンは再びサブクローン化されて、停止コドン、この場合はBamHI特異的なものである3'フランキング「部位」を再構築するために、NcoI交換クローニングを経由して、現存するプラスミドの中にサブクローン化された。

【0096】

4.2 V₃のクローニング

前記鎖(V₃)は、PCR後に、そこからサブクローン化して前記pBulletベクターの中に入れるように、PCR(登録商標)XL-TOPPO(登録商標)の中にもう一度コード核酸をクローニングすることによりクローン化された。この目的のために、1つの適当なクローンが選択され、また、AscIによる加水分解によって最初に線形化され

10

20

30

40

50

た。同様に、空の pBul1et ベクターは XhoI による加水分解により線形化された。これには、その後、「平滑末端化」末端にするように、dNTP の存在下で、T4 DNA ポリメラーゼにより、両方の切断「粘着 (スティッキー)」末端に充填することが行われた。その後、その加水分解において切断されなければならない内部 NcoI 部位を野生型 T 細胞抗原受容体 (TCR) が有するため、また、同時に、前記空のベクターが NcoI により完全に加水分解されたため、前記 V₃ クローンの部分 NcoI 加水分解が実施された。前記 NcoI 完全長 V₃ 平滑末端化および前記平滑末端化 pBul1et - 空の NcoI 断片のゲル電気泳動と抽出を実施した後に、前記挿入片およびベクターが結合された。前記結合産物により形質転換された細菌クローンが配列決定された。

【0097】

10

5. ヒト PBMC の形質導入

前記レトロウイルス pBul1et ベクターの中に挿入された完全長 T 細胞抗原受容体 (TCR) 構築物を確立した後、これらプラスミドはまた、当業者であれば公知の諸方法により細菌培養培地において増殖され、作成された。前記細菌培養培地は、Ca₃(PO₄)₂ - トランスフェクションを経て、構造タンパク質 gag, pol および GALV - env をコードするプラスミドと組み合わせて、胚性腎細胞系統 293T の中にトランスフェクションされた。以下の組合せがトランスフェクションされた。すなわち、

1 - pBul1et + pHIT60 + pCOLT - GALV

2 - pBul1et AV03 + pBul1et BV03 + pHIT60 + pCOLT - GALV

20

3 - pBul1et AV13 + pBul1et BV03 + pHIT60 + pCOLT - GALV である。

【0098】

この一過性トランスフェクション (導入選択マーカーはなしで) は、健常者ドナーの OKT-3 (huCD3) 活性化 HLA-A2 - 陽性 PBMC とともに、ウイルス産生 293T 細胞 (2500 rad で照射) を共培養することにより、前記 PBMC を感染させるために利用された GALV 擬似型レトロウイルス粒子の産生において、約 24 時間後に結果が出た。形質導入の効率は、3 日間の共培養と増殖後およそ一週間でフローサイトメトリーにより評価された。また、さらなる増殖の後、溶菌反応性を検定することが可能となった。

30

【0099】

6. 形質導入 PBMC の FACS 分析

形質導入の効率は、前記フローサイトメトリー技術を使用することにより、前記 T 細胞抗原受容体 (TCR) 鎖組合せ V₃V₃、V₁₃V₃ を有する細胞、また、導入遺伝子を含んでいなかった前記 pBul1et 発現ベクターによる細胞のみを測定することにより評価された。この目的のために、10⁶ 個の細胞が抗 muTCR V₃ 抗体 (BD Pharmingen 社、ドイツ連邦共和国ハイデルベルグ市) および抗 huCD3 抗体の 1 μg により、製造業者のインストラクションにより室温で 30 分間染色され、また、フローサイトメトリーにより測定された。図 8 および 9 は、V₃V₃ の組合せを有する前記細胞と、V₁₃V₃ の組合せを有する細胞の両方とも、前記鎖導入遺伝子の膜結合発現を示す CD3 および muTCR V₃ に関しては陽性に染色可能であった。対照的に、導入遺伝子のない陰性対照 pBul1et は前記 V₃ 表面導入遺伝子に関しては非陽性であった。

40

【0100】

抗原特異性の再構成をフローサイトメトリーによりさらに測定するために、10⁵ 個の細胞が、0.375 μg の A2 - p53 (264 - 272) - PE - 四量体 (氷上にて 60 分間) および抗 huCD8 - FITC (氷上にて 15 分間) により染色され、フローサイトメトリーにより測定された。先に V₃V₃ の組合せにより形質導入された muTCR V₃ 陽性、FACS で分類された PBMC の染色が、例として (図 10 を参照) 示されている。

50

【0101】

7. 形質導入PBMCの細胞溶解活性

レトロウイルス形質導入ヒトPBMCの溶解反応性は細胞傷害性アッセイにより評価された。前記形質導入PBMCは、最初にペプチド負荷T2細胞を用いて、また、二番目に前記p53欠陥変異体Saos-2およびそのmut(143 V->A)p53トランスフェクタントSaos-2/143を用いて、標準的なクロム放出アッセイの中で検定された。前記HLA-A2.1表現型を有していた標的細胞は全て、NK細胞標的細胞として選択的に「コールドターゲット」として役立つクロムのように標識化されていなかったK562細胞の20倍過剰と付加的に混合され、また、したがって、腫瘍細胞の非特異的NK細胞媒介溶解を減少させた。エフェクター：標的細胞(E:T)という使用された比は30であった。

10

【0102】

前記V3V3組合せにより形質導入されたPBMCのp53ポリペプチド特異的反応は検出することができる。さらに、内在的に処理され、また、HLA-A2.1の文脈の中で提示されるp53誘導ペプチドは検出され(Saos-2/143)、これは、p53過剰発現腫瘍細胞の溶解に対して、前もって必要不可欠なものと同みなされる。前記陰性対照Saos-2の溶解は、いずれのエフェクター細胞に対しても、提示することができなかった。以下の表1は、例として、さまざまな標的細胞に関して測定された溶解比を示している。さらに、悪性腫瘍細胞系統(図示せず)の溶解比を検出することが可能であった。表1中、数値は、%溶解比、比E:T=30:1におけるデータである。

20

【0103】

【表1】

標的細胞／エフェクター {T細胞}	pBullet	Vα3Vβ3	Vα13Vβ3
T2+FluMI	9	20	19
T2+p53.264-272	6	88	5
Saos-2	4	6	7
Saos-2/143	1	31	4

30

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1】完全長T細胞抗原受容体(TCR)鎖の作成に対するプライマー位置の図である。

40

【図2】作成された前記T細胞抗原受容体(TCR)鎖の図である。

【図3】5'-RACE PCRにおける切断型T細胞抗原受容体(TCR)鎖の作成のためのプライマーの位置を示す。

【図4】野生型(Wt)マウス(mu)T細胞抗原受容体(TCR)V3鎖を発現するためのウイルスベクターpBulletAV03の図である。前記野生型V3鎖は、テキストの中で説明されているように、制限酵素切断部位NcoIおよびBamHIを経由してレトロウイルスベクターpBulletの中にクローン化されて入れられた。

【図5】上述されているように、制限酵素部位NcoIおよびSalIを経由してクローン化された野生型(Wt)マウス(mu)T細胞抗原受容体(TCR)V13鎖の図で

50

ある。

【図6】前記レトロウイルスpBul11etベクターの中にクローン化されて入れられた機能的野生型(Wt)マウス(mu)T細胞抗原受容体(TCR)V₃の図である。

【図7】空のpBul11etベクターにより形質導入されたPBMCのフロー細胞数測定の結果を示す。導入遺伝子(V₃)は検出されなかった。

【図8】フロー細胞数測定により検出された、ヒトPBMC上のマウス(mu)T細胞抗原受容体(TCR)発現の再構成のためのマーカーとしての前記導入遺伝子V₃の発現図である。予想どおり、付加的にCD3複合体を発現する細胞についてのみ、発現が示されている。

【図9】図8と同様に、組合せV₁₃V₃の発現図である。前記導入遺伝子V₃の検出により、ヒトPBMC上のマウス(mu)T細胞抗原受容体(TCR)の再構成が示唆される。

10

【図10】V₃V₃により形質導入されたヒトPBMCのフローサイトメトリーの図である。すなわち、HLA-A2.1-p53(264-272)-PE四量体の染色性が示されており、それは、前記ヒトPBMC上のp53(264-272)-特異的およびHLA-A2.1-制限T細胞抗原受容体(TCR)の発現を示している。

【国際公開パンフレット】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/070556 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/705, 16/18
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02186
- (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Februar 2002 (28.02.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 09 855.3 1. März 2001 (01.03.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): STANISLAWSKI, Thomas [DE/DE]; Schlagstrasse 4, 65193 Wiesbaden (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMITZ, Frank [DE/DE]; Rathausplatz 2, 54218 Büburg (DE). VOSS, Holger [DE/DE]; Im Bienengarten 23, 55218 Ingelheim (DE). THEOBALT, Matthias [DE/DE]; Römerstrasse 16, 55252 Mainz-Kastel (DE).
- (74) Anwälte: SCHOHE, Stefan usw.; Boehmert & Boehmert, Peutenkoflerstr. 20-22, 80336 München (DE).

- (81) Bestimmungsstaaten (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, 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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
mit internationalem Recherchenbericht
vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
einreichen

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



(54) Title: POLYPEPTIDE OF A P53 PROTEIN-SPECIFIC MURINE α / T-CELL RECEPTOR, NUCLEIC ACIDS CODING THEREFOR AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: POLYPEPTIDE EINER P53-PROTEIN-SPEZIFISCHEN MURINEN α / T-ZELL REZEPTORS, DIESE KODIERENDE NUKLEINSÄUREN UND DABIN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to polypeptides of a murine α /T-cell receptor mediating a p53 protein-specific T-cell response or functional variants or parts thereof or nucleic acids coding therefor, functional variants or parts thereof. Said polypeptides enable p53 protein-expressing cells to be recognized by T-cells provided with these genes, cytokines can be released, and T-cell induced lysis and/or apoptosis of tumor or leukemia cells can be performed.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung stellt Polypeptide eines p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α /T-Zell Rezeptors oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder diese kodierende Nucleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon zur Verfügung. Diese bewirken, daß p53-Protein-exprimierende Zellen von T-Zellen, die mit jenen Genen ausgestattet wurden, erkannt werden, Zytokine ausgeschüttet werden, und eine T-Zell-induzierte Lyse und/oder Apoptose von Tumor- oder Leukämiezellen herbeigeführt wird.

WO 02/070556 A1

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Polypeptide eines p53-Protein-spezifischen murinen α/β T-Zell Rezeptors, diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Polypeptide des eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β -T-Zell Rezeptors; diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung bei der Therapie, Diagnose und/oder Prävention von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.

Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten (ZTL) ist entscheidend für die Erzeugung und Regulierung einer effektiven Immunantwort. Der charakteristische T-Zelllinien-Marker ist der T-Zell-Antigen-Rezeptor (TZR). Es gibt zwei definierte Typen von TZR: Einer ist ein Heterodimer von zwei Disulfid-verbundenen Polypeptiden (α und β); der andere ist zwar strukturell ähnlich, besteht jedoch aus γ - und δ -Polypeptiden. Beide Rezeptoren sind mit einem Set von fünf Polypeptiden, dem CD3-Komplex assoziiert und bilden so zusammen den TZR-Komplex (TZR-CD3-Komplex). Der α/β -TZR ist der funktionell bedeutendste, da er in über 95% aller T-Zellen exprimiert wird.

α/β -T-Zellen können in zwei verschiedene sich überschneidende Populationen unterteilt werden: Eine Untergruppe, die den CD4-Marker trägt und hauptsächlich die Immunantwort unterstützt (T_H) und eine Untergruppe, die den CD8-Marker trägt und im wesentlichen zytotoxisch ist (T_C). $CD8^+$ -T-Zellen erkennen Antigene in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Solche Antigene können unter anderem tumorspezifische oder tumorassoziierte Peptidantigene sein. Nach Erkennung der Peptidantigene wird die betreffende Zelle abgetötet, indem die T-Zelle die Zielzelle lysiert und/oder Apoptose dieser Zielzellen induziert, oder Zytokine (z.B. IL-2, IFN- γ) freisetzt.

Unter den tumorassoziierten Peptidantigenen (TAA), die im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, sind die sogenannten "universellen" TAA von besonderem Interesse. Diese TAA leiten sich überwiegend von zellulären Proteinen ab, die in normalen Zellen schwach exprimiert und in Tumorzellen

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 2 -

überexprimiert werden. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem das "p53" Protein, dessen Expression in ungefähr 50% aller humanen malignen Erkrankungen, insbesondere in einer Reihe solider Tumore, erhöht ist, und dessen Umsatz im Sinne einer Proteasom-vermittelten Degradation und nachfolgender MHC-Klasse-I-assoziiierter Präsentation erhöht ist.

Oligopeptide des p53-Proteins können im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden und repräsentieren attraktive Zielstrukturen für CD8-positive T-Zellen.

Ein Ansatz für die Entwicklung immuntherapeutischer Verfahren zur Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen ist die Identifizierung von Protein-spezifischen TZR. Solche TZR können unter bestimmten Voraussetzungen T-Zellen mit Antigen-spezifität im allgemeinen und Tumor-Reaktivität im besonderen versehen mit dem Ziel, daß diese T-Zellen die Remission und die Eradikation eines bestimmten Tumors herbeiführen.

Weijts et al. ("A retroviral vector system, 'STITCH', in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T-lymphocytes", 1998, *Gene Therapy* 5:1995-1203) beschreiben ein retrovirales Vektorsystem zur Transduktion von Genen in aktivierte T-Lymphozyten. Dieses System wird verwendet, um die Expression von Antikörper-basierten chimären Rezeptoren in der Membran von T-Zellen zu bewirken. Diese T-Zellen können dann gegen z. B. Nieren-Karzinomzellen eingesetzt werden. Mittels FACS-Analyse wird die Protein-Expression und damit der Erfolg der Vektor-Übertragung bestimmt, während Cytotoxizitäts-Test Aufschluß über die erfolgreiche Expression und Funktion des chimären Rezeptors geben. Ähnlich beschreiben Eshhar et al. ("Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the γ or ζ subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors", 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:720-724) die Herstellung von tumorspezifischen Lymphozyten und ihre Verwendung in der Immuntherapie auf der Basis von Chimären, die die variablen Regionen eines Antikörpers mit der konstanten Region des TZR umfassen. Diese chimären Gene konnten auf der Oberfläche von zytolytischen T-Zell-Hybridomen exprimiert werden und bewirkten die Ausschüttung von Interleukin-2 nach Kontakt mit dem Antigen.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 3 -

Clay et al. ("Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity"; 1999, J. Immunology 163:507-513) beschreiben die Isolierung von Genen der α -TZR und β -TZR Ketten eines MART-1 (25-35) spezifischen TZR und deren Expression in humanen peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs). Die Lyse von verschiedenen Melanomzelllinien wird beschrieben.

Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by *ex vivo* genetically engineered CTL", 2000, J. Immunol. 164, 3705-3712) beschreiben ein immuntherapeutisches Verfahren für Colon-Karzinomen unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN. Das chimäre spezifische Rezeptorkonstrukt wird über einen retroviralen Vektor in primäre Maus-T-Lymphozyten transduziert. Diese Zellen wurden in Mäuse injiziert (sogenannte adoptiver T-Zell-Transfer), die vorher mit Colon-Karzinomzellen beimpft waren.

Aus Theobald et al. ("Targeting p53 as a general tumor antigen", 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11993-11997) ist die Herstellung von p53-spezifischen zytotoxischen T-Zellen nach der Injektion von Peptiden aus der Wildtyp-Sequenz von p53 bekannt. Mittels dieser T-Zelllinien konnte anschließend eine Auswahl von menschlichen Tumorzellen lysiert werden. Die Isolierung von Genen spezifischer TZR der gegen p53 gerichteten lytischen T-Zellen wird nicht beschrieben. Die WO 97/32603 beschreibt allgemein ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten T-Lymphozyten, die gegen Tumorgewebe gerichtete spezifische TZR exprimieren. Dabei wird eine HLA-transgene Maus (in diesem Fall HLA-A2.1) mit tumorassoziertem Antigen immunisiert, um so die Produktion von zytotoxischen T-Lymphozyten zu bewirken, die spezifische TZR auf ihrer Oberfläche exprimieren. Als tumorassozierte Antigene werden Peptide verschiedener Gene, wie Her-2/neu, Ras, p53, Tyrosinase, MART, gp100, MAGE, BAGE und MUC-1 beschrieben. Aus den Her-2/neu spezifischen T-Lymphozyten wird dann die Nukleotidsequenz, die mindestens eine variable Region der α - und β -Kette des entsprechenden nicht menschlichen TZR enthält isoliert und in verschiedenen genetischen (u.a. "humanisierten") TZR-Konstrukten verwendet. So beschreibt die WO 97/32603 Fusionsproteine von variablen Regionen von TZR mit der ζ -Region von CD3, CD8 oder CD16, sowie die Verwendung flexibler Linker der Aminosäuresequenz (GGGGS)₃.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 4 -

Ein spezifisch gegen das Oligopeptid der Aminosäuren 264-272 von p53 gerichteter TZR und dessen Verwendung wird jedoch durch die oben genannten Publikationen sowie in der übrigen Literatur weder erwähnt noch nahegelegt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die murinen Gene der Ketten (α -TZR und β -TZR) eines neuen, effektiv gegen das p53-Protein gerichteten TZR zur Verfügung zu stellen. Diese bewirken, daß p53-Protein-exprimierende Zellen von T-Zellen, die mit jenen Genen ausgestattet wurden, erkannt werden, Zytokine ausgeschüttet werden, und eine T-Zell-induzierte Lyse und/oder Apoptose von Tumor- oder Leukämiezellen herbeigeführt wird.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch das Polypeptid des eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β TZR gemäß SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nucleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon, insbesondere Substitutionen, Deletionen, Insertionen, Additionen, Inversionen und/oder chemische oder physikalische Modifikationen einer oder mehrerer Aminosäuren oder diese kodierende Nucleinsäuren, gelöst.

Aus einer einfach-A2.1-transgenen Maus (([A2.1xC57BL/6]xC57BL/6)_{F1}) wurden die Gene der eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α oder β TZR-Ketten isoliert, die eine HLA-A2.1 restringierte und gegen das Peptid der Aminosäuren 264-272 des p53-Proteins gerichtete spezifische T-Zell-Antwort vermitteln. Die Polypeptide dieses TZR waren bisher unbekannt. Die Gene wurden als Wildtyp (WT) retroviral in humane periphere Blut-Lymphozyten (PBLs) eingeschleust und die HLA-restringierte Antigen-Erkennung funktionell durch TZR-vermittelte zytotoxische Lyse verschiedener Zell-Linien im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest überprüft. Zusätzlich zu der "regulären" β -TZR-Kette der vorliegenden Erfindung konnte eine Variante der β -TZR-Kette isoliert werden die aufgrund von

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 5 -

Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder für die Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, so daß sich aus dieser Erfindung völlig neue Therapieansätze ergeben.

Bei Liu et al. ("Targeting of human p53-overexpressing tumor cells by an HLA A*0201-restricted murine T-cell receptor expressed in Jurkat T Cells", 2000, Cancer Res. 60, 693-701) wird die Herstellung eines p53-spezifischen TZR auf der Basis von injizierten Peptiden beschrieben. Die erhaltenen T-Zellen werden als für die Immuntherapie von Krebs geeignet beschrieben. Der von Liu et al. beschriebene TZR ist jedoch gegen ein Peptid der Aminosäuren 149-157 von p53 gerichtet. Da das von den TZR erkannte Epitop des TAA für die therapeutische Wirkung und Nebenwirkungen von entscheidender Bedeutung ist, überrascht das Vorhandensein von weiteren effektiven und bisher unbekanntem TZR, die gegen andere Peptide/Epitope des p53 gerichtet sind, umso mehr.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, umfassend das erfindungsgemäße Polypeptid oder funktionelle Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.

Das Fusionsprotein kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es die ζ -Region von CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die ζ -Region von humanem CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, das einen flexiblen Linker umfaßt (Whitlow et al., „An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability“, Prot. Engin. 6(8), pp. 989-995, 1993), insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGGS)₃. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Fusionsprotein die ζ -Kette des CD3-Komplexes oder ITAM-Motive der ζ -Kette oder Teile davon umfassen, insbesondere die ζ -Kette von humanem CD3 oder Teile davon. Das Fusionsprotein kann weiterhin dadurch gekennzeichnet sein, daß es CD8 α oder das Lck-Bindungsmotiv von CD8 α umfaßt oder Teile davon, insbesondere von humanem CD8 α .

Bei dem erfindungsgemäßen Fusionsprotein kann es sich weiterhin um eine chimäre partiell oder vollständig humanisierte α und/oder β TZR-Kette handeln. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, bei dem es sich um einen Einzelketten-TZR handelt. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, das einen flexiblen Linker umfaßt,

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 6 -

insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGS)₃. Das erfindungsgemäße Fusionsprotein kann aber auch dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich um einen α/β -TZR handelt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins zur Diagnose und/oder Behandlung vom mit p53-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, z.B. in einer geeigneten Wirtszelle, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure verwendet wird.

Hergestellt werden hierbei Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion eines Polypeptids der Erfindung aufweisen oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion funktionell aktiv ist. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von ca. 1-200, vorzugsweise ca. 1-150, insbesondere ca. 1-100, vor allem ca. 1-50 fremden Aminosäuren. Beispiele solcher Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, die z. B. aus der Galactosidase von *E. coli* abgeleitet sein können. Weiterhin können auch virale Peptidsequenzen, wie zum Beispiel vom Bakteriophagen M13 verwendet werden, um so Fusionsproteine für das dem Fachmann bekannte "phage display"-Verfahren zu erzeugen.

Zur Aufreinigung der erfindungsgemäßen Proteine kann ein weiteres/weiteres Polypeptid("tag") angefügt sein. Erfindungsgemäße Protein-tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern, ohne den Komplex in nennenswertem Maße zu eluieren und anschließend gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele der dem Fachmann bekannten Protein-tags sind ein (His)₆-tag, ein Myc-tag, ein FLAG-tag, ein Strep-tag, ein Strep-tag II, ein Hämagglutinin-tag, Glutathion-Transferase (GST)-tag, Intein mit einem Affinitäts-Chitin-binding-tag oder Maltose-bindendes Protein (MBP)-tag. Diese Protein-tags können sich N-, C-terminal und/oder intern befinden.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Polypeptiden können alle erfindungsgemäßen Polypeptide oder deren Teile unter zellfreien Bedingungen hergestellt worden sein, z. B. durch Synthese oder durch *in vitro*-Translation. So kann das gesamte Polypeptid oder Teile

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 7 -

davon zum Beispiel mit Hilfe der klassischen Synthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Teile der erfindungsgemäßen Polypeptide eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Die Erfindung betrifft auch Polypeptide, die Derivate eines Antikörpers mit Spezifität für das p53-Peptidantigen (AA 264-272), vorzugsweise präsentiert im Kontext von HLA-A2.1 sind.

Weiterhin umfaßt die Erfindung retro-inverse Peptide oder Pseudopeptide gemäß der Polypeptidsequenz der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktionelle Varianten oder Teile davon. Diese Peptide weisen anstelle der -CO-NH-Peptidbindungen -NH-CO-Bindungen auf.

Die Aufgabe der Erfindung wird weiterhin durch eine erfindungsgemäße Nucleinsäure gelöst, die eine DNA, RNA, PNA (Peptide nucleic acid) oder p-NA (Pyranosyl nucleic acid), vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA ist mit einer Länge von mindestens 8 Nucleotiden, vorzugsweise mit mindestens 12 Nucleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nucleotiden ist. Die Nucleinsäure kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Sequenz der Nucleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist. Sie kann auch in Form ihrer antisense-Sequenz vorliegen.

Für die Expression des betreffenden Gens ist im allgemeinen eine doppelsträngige DNA bevorzugt, wobei der für das Polypeptid kodierende DNA-Bereich besonders bevorzugt ist. Dieser Bereich beginnt mit dem ersten in einer Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak 1987, Nucleic Acids Res. 15:8125-48) liegenden Start-Codon (ATG) bis zum nächsten Stop-Codon (TAG, TGA bzw. TAA), das im gleichen Leseraster zum ATG liegt. Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen ist die Konstruktion von antisense Oligonucleotiden (Zheng und Kemeny 1995, Clin. Exp. Immunol. 100:380-382; Nellen und Lichtenstein 1993, Trends Biochem. Sci. 18:419-23) und/oder Ribozymen (Amarzguioui et al. 1998, Cell. Mol. Life Sci. 54:1175-202; Vaish, et al. 1998, Nucleic Acids Res. 26:5237-42; Persidis 1997, Nat. Biotechnol. 15:921-2; Couture und Stinchcomb 1996, Trends Genet. 12:510-5). Mit "antisense"-Oligonucleotiden kann man die Stabilität der erfindungsgemäßen Nucleinsäure verringern und/oder die Translation der erfindungsgemäßen Nucleinsäure inhibieren. So kann beispielsweise die Expression der entsprechenden Gene in Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verringert werden. Oligonucleotide können sich daher als

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 8 -

Therapeutikum eignen. Diese Strategie eignet sich beispielsweise auch für Haut, epidermale und dermale Zellen, insbesondere, wenn die "antisense"-Oligonukleotide mit Liposomen komplexiert werden (Smyth et al. 1997, *J. Invest. Dermatol.* **108**:523-6; White et al. 1999, *J. Invest. Dermatol.* **112**:699-705; White et al. 1999, *J. Invest. Dermatol.* **112**:887-92). Für die Verwendung als Sonde oder als "antisense"-Oligonukleotid ist eine einzelsträngige DNA oder RNA bevorzugt.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Nucleinsäuren können alle erfindungsgemäßen Nucleinsäuren oder deren Teile auch synthetisch hergestellt worden sein. Weiterhin kann zur Durchführung der Erfindung eine Nucleinsäure verwendet werden, die synthetisch hergestellt worden ist. So kann die erfindungsgemäße Nucleinsäure beispielsweise chemisch anhand der in den von SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 beschriebenen Proteinsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes z. B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z. B. Uhlmann & Peyman 1990, *Chemical Reviews* **90**:543-584).

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- oder Exonukleasen, insbesondere durch in der Zelle vorkommende DNasen und RNasen, abgebaut. Deshalb ist es vorteilhaft, die Nucleinsäure zu modifizieren, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so daß über einen langen Zeitraum eine hohe Konzentration der Nucleinsäure in der Zelle beibehalten wird (Beigelman et al. 1995, *Nucleic Acids Res.* **23**:3989-94; Dudyecz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehrerer Internukleotid-Phosphatgruppen oder durch die Einführung einer oder mehrerer Nicht-Phosphor-Internukleotide, erhalten werden.

Geeignete modifizierte Internukleotide sind in Uhlmann und Peymann (1990, *Chem. Rev.* **90**:544) zusammengefaßt (siehe auch Beigelman et al. 1995, *Nucleic Acids Res.* **23**:3989-94; Dudyecz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Modifizierte Internukleotid-Phosphatreste und/oder nicht-Phosphoresterbindungen in einer Nucleinsäure, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphoramidat, Phosphorodithioat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxanbrücken, Carbonatbrücken, Carboxymethylester, Acetamidatbrücken und/oder Thiobrücken enthalten. Es ist auch beabsichtigt, daß diese Modifizierung die

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 9 -

Haltbarkeit einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden kann, verbessert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, adenoviralen Vektors, retroviralen Vektors (Miller, et al. „Improved retroviral vectors for gene transfer and expression“, *BioTechniques* Vol. 7, No. 9, p 980, 1989) und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure in einem Vektor vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten sein. Vorzugsweise enthält der gentherapeutisch wirksame Vektor T-Zell spezifische regulatorische Sequenzen, die funktionell mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verbunden sind. Die Expressionsvektoren können prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. 1994, *Nucleic. Acids Res.* 22:5767-5768), für die Expression in Insektenzellen z. B. *Baculovirus*-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den *trp*-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den Met 25, GAL 1 oder ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. 1983, *J. Biol. Chem.* 258:2674-2682; Mumberg, supra), den *Baculovirus*-Polyhedrin-Promotor, für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839). Für die Expression in Säugerzellen sind beispielsweise Promotoren geeignet, die eine konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen erlauben. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer und/oder Repressorsequenzen. Beispiel für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40 Promotor

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 10 -

oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. 1981, Nature 214:228-232) und weitere virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV. Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen et al. 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5:516-20).

Beispiele für regulierbare Elemente, die T-Zell spezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in diesen Zelltypen exprimiert werden.

Beispiele für regulierbare Elemente, die zellzyklusspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren folgender Gene: cdc25, Cyclin A, Cyclin E, cdc2, E2F, B-myb oder DHFR (Zwicker und Müller 1997, Trends Genet. 13:3-6). Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolischspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glukosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

Der erfindungsgemäße Vektor kann zur Transfektion einer Wirtszelle verwendet werden, bei der es sich bevorzugterweise um eine T-Zelle handelt. Besonders bevorzugt ist eine Wirtszelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie auf ihrer Oberfläche ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Fusionsprotein exprimiert.

Um die Einführung von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen oder nicht-viralen Vektors vorliegen. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Retroviren, Baculoviren, Vakziniaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht-virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder poly-Lysin konjugierte DNA.

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, beispielsweise Adenovirusvektoren oder retrovirale Vektoren (Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3:466-76; Springer et al. 1998, Mol. Cell. 2:549-58).

Ein bevorzugter Mechanismus, erfindungsgemäße Polypeptide *in vivo* zur Expression zu bringen, ist der virale Gen-Transfer, insbesondere mit Hilfe retroviraler Partikel. Diese werden vorzugsweise genutzt, entsprechende Zielzellen, vorzugsweise T-Lymphozyten, des Patienten *ex vivo* mit den für erfindungsgemäße Polypeptide kodierenden Genen oder Nukleotidsequenzen durch Transduktion zu versehen. Die Zielzellen können daraufhin im Sinne eines adoptiven Zelltransfers wieder in den Patienten reinfundiert werden, um mit der *de novo* eingefügten Spezifität tumorizide und/oder immunmodulierende Effektorfunktionen zu übernehmen. Jüngst wurden auf diesem Wege sehr gute gentherapeutische Erfolge in der Behandlung der durch Immuninkompetenz gekennzeichneten SCID-X1- Krankheit bei Neugeborenen erzielt, in dem hämatologische Vorläuferzellen mit einem analogen intakten Transgen einer in den Kindern vorkommenden nicht-funktionellen mutierten Variante des γ -Kettengens, das für die Differenzierung in die verschiedenen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems essentiell ist, retroviral versehen wurden (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Weiterhin besteht die Möglichkeit den Gentransfer *in vivo* durchzuführen, einerseits durch präferentiell stereotaktische Injektion der infektiösen Partikel, andererseits durch direkte Applikation von Viren-produzierenden Zellen (Oldfield, et al. Hum. Gen. Ther., 1993, 4:39-69).

Die zum Transfer von Genen häufig eingesetzten viralen Vektoren sind nach heutigem Stand der Technik vorwiegend retrovirale, lentivirale, adenovirale und adeno-assoziierte virale Vektoren. Diese sind von natürlichen Viren abgeleitete zirkuläre Nukleotidsequenzen, in denen zumindest die viralen Strukturprotein-kodierenden Gene durch das zu transferierende Konstrukt ausgetauscht werden.

Retrovirale Vektorsysteme schaffen die Voraussetzung für eine langhaltende Expression des Transgens durch die stabile, aber ungerichtete Integration in das Wirtsgenom. Vektoren der jüngeren Generation besitzen keine irrelevanten und potentiell immunogenen Proteine, des weiteren gibt es keine vorbestehende Immunität des Empfängers gegenüber dem Vektor. Retroviren enthalten ein RNA-Genom, das in eine Lipidhülle verpackt ist, die aus Teilen der Wirtszellmembran und Virusproteinen besteht. Zur Expression viraler Gene wird das RNS-Genom revers transkribiert und mit dem Enzym Integrase in die Zielzell-DNS integriert. Diese kann daraufhin von der infizierten Zelle transkribiert und translatiert werden, wodurch virale Bestandteile entstehen, die sich zu Retroviren zusammenfügen. RNS wird ausschließlich

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 12 -

dann in die neu entstandenen Viren eingefügt. Das Genom der Retroviren besitzt drei essentielle Gene: *gag*, das für virale Strukturproteine, sogenannte gruppenspezifische Antigene kodiert, *pol* für Enzyme wie Reverse Transkriptase und Integrase und *env* für das Hüllprotein („envelope“), das für die Bindung des wirtsspezifischen Rezeptors verantwortlich ist. Die Produktion der replikationsinkompetenten Viren findet nach Transfektion in sogenannten Verpackungszelllinien statt, die zusätzlich mit den *gag/pol*-kodierenden Genen ausgestattet wurden und diese „in trans“ exprimieren und somit die Ausbildung replikationsinkompetenter (d.h. *gag/pol*-deletierter) transgener Viruspartikel komplementieren. Eine Alternative ist die Cotransfektion der essentiellen Virusgene, wobei nur der das Transgen enthaltende Vektor das Verpackungssignal trägt.

Die Separation dieser Gene ermöglicht einerseits die beliebige Kombination des *gag/pol*-Leserahmens mit aus verschiedenen Stämmen gewonnenen *env*-Leserahmen, wodurch Pseudotypen mit verändertem Wirtspotropismus entstehen, andererseits kann dadurch die Bildung replikationskompetenter Viren innerhalb von Verpackungszellen drastisch reduziert werden. Das aus „gibbon ape leukemia virus“ (GALV) abgeleitete Hüllprotein, das im vorliegenden Fall Verwendung findet, ist in der Lage, humane Zellen zu transduzieren und ist in der Verpackungszelllinie PG13 mit amphotropen Wirtsbereich etabliert (Miller et al., 1991). Zusätzlich wird die Sicherheit durch selektive Deletion von nicht-essentiellen Virussequenzen zur Verhinderung einer homologen Rekombination und somit der Produktion replikationskompetenter Partikel erhöht.

Neue, nicht-virale Vektoren bestehen aus autonomen, sich selbst-integrierenden DNS-Sequenzen, den Transposonen, die durch z.B. liposomale Transfektion in die Wirtszelle eingeschleuft werden und erstmals erfolgreich zur Expression humaner Transgene in Säugerzellen eingesetzt wurden (Yant et al., 2000).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Hautzellen, erreicht werden kann (Alexander und Akhurst 1995, Hum. Mol. Genet. 4:2279-85). Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu

100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (1987, supra) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleoyloxpropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6982-6986; Felgner et al. 1994, J. Biol. Chem. 269:2550-2556; Gao und Huang, 1991, Biochim. Biophys. Acta 1189:195-203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioctadecylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transfer von Nucleinsäuren in die Zelle erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nucleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al. 1999, Gene Therapy 6:282; Brandén et al 1999, Nature Biotech. 17:784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nucleinsäuren in das Cytoplasma der Zelle ermöglichen (Kiehler et al 1997, Bioconj. Chem. 8:213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peymann 1990, supra). Eine andere besonders geeignete Form von gentherapeutischen Vektoren läßt sich dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nucleinsäure auf Goldpartikeln aufbringt und diese mit Hilfe der sogenannten "Gene Gun" in Gewebe, bevorzugt in die Haut, oder Zellen schießt (Wang et al., 1999, J. Invest. Dermatol. 112:775-81).

Für die gentherapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäure ist es auch von Vorteil, wenn der Teil der Nucleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, ein oder mehrere nicht kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Polypeptids, und/oder eine polyA-Sequenz, insbesondere die natürlich vorkommende polyA-Sequenz oder eine SV40 Virus polyA-Sequenz, vor allem am 3'-Ende des Gens enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA erreicht werden kann (Jackson 1993, Cell 74:9-14 und Palmüter et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:478-482).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine T-Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder einem anderen erfindungsgemäßen Genkonstrukt transformiert ist. Wirtszellen können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen sein, Beispiele für prokaryotische Wirtszellen sind *E. coli* und für eukaryotische Zellen *Saccharomyces cerevisiae* oder Insektenzellen.

Eine besonders bevorzugte transformierte Wirtszelle ist eine transgene T-Vörläuferzelle oder eine Stammzelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt. Verfahren zur Transformation von Wirtszellen und/oder Stammzellen sind dem Fachmann gut bekannt und umfassen zum Beispiel Elektroporation, Mikroinjektion oder Transduktion. Eine besonders bevorzugte transformierte Wirtszelle ist eine patienteneigene T-Zelle, die nach der Entnahme mit einem erfindungsgemäßen Genkonstrukt transfiziert oder transduziert wird. Erfindungsgemäße Wirtszellen können insbesondere dadurch erhalten werden, daß dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen entnommen werden, die dann *ex vivo* mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen genetischen Konstrukten transfiziert oder transduziert werden, um so erfindungsgemäße Wirtszellen zu erhalten. Die *ex vivo* generierten spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten re-implantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by *ex vivo* genetically engineered CTL", J. Immunol. 2000, 164:3705-3712) beschriebenen Verfahren unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZIL, Perforin und γ -IFN.

Ein weiteres bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung von p53-Protein-spezifischen Antigenen ist dadurch gekennzeichnet, daß p53-präsentierende Tumorzellen oder Fraktionen davon mit einer erfindungsgemäßen Wirtszelle unter Bedingungen zusammengebracht werden, bei denen die Tumorzellen oder Fraktionen davon nur dann lysieren, wenn der Tumor das p53-Protein-spezifische Antigen präsentiert, für welches das exprimierte Polypeptid oder Fusionsprotein spezifisch ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose und/oder Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder funktioneller Äquivalente davon oder Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure immunisiert wird.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 15 -

Das Verfahren erfolgt nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon oder diese(s) kodierende Nukleinsäure(n), gegebenenfalls in Anwesenheit von z. B. inkompletten Freundesches Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (siehe z. B. Diamond et al. 1981, The New England Journal of Medicine, pp. 1344-1349). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z. B. über Säulenchromatographie reinigen. Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (1991, Nature 349: 293-299) hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper zur Diagnose, Prognose und Therapie-Optimierung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, der gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichtet ist und mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden spezifisch reagiert, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Kopplung an geeignete Träger, wie z. B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können. Dieser Antikörper ist entweder polykonal oder monoklonal, bevorzugt ist ein monoklonaler Antikörper. Unter dem Begriff Antikörper versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung auch gentechnisch hergestellte und gegebenenfalls modifizierte Antikörper bzw. antigenbindende Teile davon, wie z.B. chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper, multifunktionelle Antikörper, bi- oder oligospezifische Antikörper, einzelsträngige Antikörper, F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmente (siehe z.B. EP-B1-0 368 684, US 4,816,567, US 4,816,397, WO 88/01649, WO 93/06213, WO 98/24884). Die erfindungsgemäßen Antikörper können zur Diagnose, Therapie-Überwachung und/oder Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 16 -

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein nach diesem Verfahren hergestelltes Arzneimittel zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung dieses Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.

Die Therapie der mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen kann auf herkömmliche Weise, z.B. durch Infusionen oder Injektionen erfolgen, die die erfindungsgemäßen Arzneimittel enthalten. Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann weiterhin gegebenenfalls in Form von Liposomenkomplexen bzw. Goldpartikelkomplexen erfolgen. Die Behandlung mittels der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann aber auch über orale Dosierungsformen, wie z.B. Tabletten oder Kapseln, über die Schleimhäute, zum Beispiel der Nase oder der Mundhöhle, oder in Form von unter die Haut implantierten Dispositoren erfolgen. Transdermale therapeutische Systeme sind zum Beispiel aus den EP 0 944 398 A1, EP 0 916 336 A1, EP 0 889 723 A1 oder EP 0 852 493 A1 bekannt. Die erfindungsgemäßen (Poly)peptide und deren Derivate können auch dazu eingesetzt werden, Patienten mit Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, die mit p53 in Zusammenhang stehen, gezielt immunkompetent zu machen, um die Induktion, Erzeugung und Expansion von p53.264-272-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zu erreichen und die Tumor- und Leukämiezellen der betreffenden Patienten spezifisch abzutöten. Solche Erkrankungen umfassen zum Beispiel solide Tumorerkrankungen, lymphohämatopoetische Neoplasien, maligne hämatologische Erkrankungen oder Blastenschübe.

Bei einer besonders bevorzugten Art der Behandlung wird dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen entnommen, die dann *ex vivo* mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen genetischen Konstrukten transfiziert oder transduziert werden. Die *ex vivo* generierten spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten re-infundiert oder transplantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by *ex vivo* genetically engineered CTL", 2000, J. Immunol. 164: 3705-3712) beschriebenen immuntherapeutischen Verfahren bei Colon-Karzinomen unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 17 -

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Tests zur Auffindung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens ein Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

Unter dem Begriff "funktionelle Interaktoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind alle diejenigen Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Stoffgemische zu verstehen, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Polypeptiden oder Antikörpern, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, unter geeigneten Bedingungen in Wechselwirkung treten können. Mögliche Interaktoren sind einfache chemische organische oder anorganische Moleküle oder Verbindungen, können aber auch Peptide, Proteine oder Komplexe davon umfassen. Die funktionellen Interaktoren können aufgrund ihrer Wechselwirkung die Funktion(en) der Nukleinsäuren, Polypeptide oder Antikörper *in vivo* oder *in vitro* beeinflussen oder auch nur an die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Polypeptide oder Antikörper binden oder mit ihnen andere Wechselwirkungen kovalenter oder nicht-kovalenter Weise eingehen.

Die Erfindung umfaßt weiterhin einen erfindungsgemäß hergestellten Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, der mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. Oft kann so das pathologische Verhalten der Zellen *in vitro* nachgeahmt werden und es können Substanzen gesucht werden, die das normale Verhalten der Zellen wieder herstellen und die ein therapeutisches Potential besitzen. Zudem läßt sich dieses Testsystem zum Screening von Substanzen ausnutzen, die eine Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem funktionellen Interaktor inhibieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel zur Indikation, wie z.B. Diagnose, und Therapie von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, bei dem eine

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 18 -

erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger formuliert wird.

Als Therapeutika und/oder Prophylaktika kommen insbesondere Impfstoffe, rekombinante Partikel oder Injektionen oder Infusionslösungen in Betracht, die als Wirkstoff (a) das erfindungsgemäße TZR-Polypeptid und/oder seine Derivate und/oder (b) eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten und/oder (c) *in-vitro* oder *ex-vivo* erzeugte T-Lymphozyten, die einen spezifisch gegen p53.264-272 gerichteten TZR enthalten.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel und/oder rekombinanter Partikel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen bzw. Goldpartikeln komplexierter Form enthält. Der pharmazeutische Träger ist beispielsweise eine physiologische Pufferlösung, vorzugsweise mit einem pH von ca. 6,0-8,0, vorzugsweise von ca. 6,8-7,8. Insbesondere von ca. 7,4 und/oder einer Osmolarität von ca. 200-400 milliosmol/Liter, vorzugsweise von ca. 290-310 milliosmol/Liter. Zusätzlich kann der pharmazeutische Träger geeignete Stabilisatoren, wie z. B. Nukleaseinhibitoren, vorzugsweise Komplexbildner wie EDTA und/oder andere dem Fachmann bekannte Hilfsstoffe enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids zur Diagnose und/oder Behandlung von mit p53-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen in einer geeigneten Wirtszelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine erfindungsgemäße Nukleinsäure auf geeignete Weise exprimiert wird.

Das Polypeptid wird so beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die *E. coli* Stämme DHS, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzelllinien, z. B. von *Spodoptera frugiperda*, oder die tierischen Zellen COS, Vero, 293, HaCaT, und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

Ein erfindungsgemäßes Diagnostikum zur Therapie-Überwachung enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunologisch wirksamen Teile davon. Das Polypeptid bzw. die Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z. B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit, z. B. Blut, *in vitro* in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikörpern oder Tumor- und Leukämiezellen reagieren zu können. Der Antikörper-Antigen-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, z. B. Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert, oder um eine andere geeignete Markierung. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

Ein anderes Diagnostikum zur Therapie-Überwachung enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid in einer erhöhten Menge vorhanden ist, um dadurch mit p53-Protein in Zusammenhang stehende Erkrankungen zu diagnostizieren und Hinweise zum Therapie-Erfolg zu erhalten. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Antigen-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Diagnostikum umfaßt eine Sonde, vorzugsweise eine DNA-Sonde, und/oder Primer. Dies eröffnet eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, zum Beispiel durch die Isolierung aus einer geeigneten Genbank anhand einer geeigneten Sonde zu erhalten (siehe z. B. Sambrook et al. 1989, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY Kapitel 8 Seite 8.1 bis 8.81, Kapitel 9 Seite 9.47 bis 9.58 und Kapitel 10 Seite 10.1 bis 10.67).

Als Sonde eignen sich beispielsweise DNA- oder RNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100-1000 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200-500 Nukleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300-400 Nukleotiden deren Sequenz aus den Polypeptiden gemäß den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 des Sequenzprotokolls abgeleitet werden kann.

Alternativ können anhand der abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen Oligonukleotide synthetisiert werden, die sich als Primer für eine Polymerase Kettenreaktion eignen. Als Primer eignen sich beispielsweise DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 10-100 Nucleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 15 bis 50 Nucleotiden, insbesondere mit einer Länge von 20-30 Nucleotiden deren Sequenz aus den Polypeptiden gemäß den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 des Sequenzprotokolls anhand der entsprechenden cDNA Sequenzen gemäß dem genetischen Code abgeleitet werden kann.

Der Begriff "kodierende Nukleinsäure" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die für ein isolierbares bioaktives erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Precursor kodiert. Das Polypeptid kann durch eine Sequenz in voller Länge oder jeden Teil der kodierenden Sequenz kodiert werden, solange die spezifische, beispielsweise enzymatische Aktivität erhalten bleibt.

Es ist bekannt, daß kleine Veränderungen in der Sequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren vorhanden sein können, zum Beispiel durch die Degenerierung des genetischen Codes, oder daß nicht translatierte Sequenzen am 5'- und/oder 3'-Ende der Nukleinsäure angehängt sein können, ohne daß dessen Aktivität wesentlich verändert wird. Diese Erfindung umfaßt deshalb auch sogenannte "funktionelle Varianten" der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Mit dem Begriff "funktionelle Varianten" sind alle DNA-Sequenzen bezeichnet, die komplementär zu einer DNA-Sequenz sind, die unter stringenten Bedingungen mit einer abgeleiteten Referenzsequenz oder Teilen davon, insbesondere der hypervariablen V(D)J-C-Region, hybridisieren und eine zu dem entsprechenden erfindungsgemäßen Polypeptid ähnliche oder identische Aktivität aufweisen.

Unter "stringenten Hybridisierungsbedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, bei denen eine Hybridisierung bei 60°C in 2,5 x SSC-Puffer, gefolgt von mehreren Waschschritten bei 37°C in einer geringeren Pufferkonzentration erfolgt und stabil bleibt.

Unter dem Begriff "funktionelle Varianten" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Polypeptiden verwandt sind, d. h. Strukturmerkmale der Polypeptide aufweisen. Beispiele funktioneller Varianten sind die

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 21 -

entsprechenden Polypeptide, die aus anderen Organismen als der Maus, also dem Menschen, bzw., vorzugsweise aus nicht-menschlichen Säugetieren wie z. B. Affen, Schweinen und Ratten oder auch Vögeln, z. B. Hühnern, stammen. Andere Beispiele funktioneller Varianten sind Polypeptide, die durch unterschiedliche Allele des Gens, in verschiedenen Individuen oder in verschiedenen Organen eines Organismus kodiert werden. Funktionelle Varianten im Sinne der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Polypeptide, die das gleiche Epitop des p53 Proteins erkennen, wie der TZR der vorliegenden Erfindung. Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität, von ca. 70%, vorzugsweise ca. 80%, insbesondere ca. 90%, vor allem ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß einer der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 und/oder zu anhand der Peptidsequenzen abgeleiteten DNA Sequenzen aufweisen. Dazu zählen auch Deletionen, Inversionen, Additionen, Substitutionen, Insertionen sowie chemische und/oder physikalische Modifikationen oder Teile des Polypeptids im Bereich von ca. 1-60, vorzugsweise von ca. 1-30, insbesondere von ca. 1-15, vor allem von ca. 1-5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird.

Die Erfindung soll nun weiter anhand der beigefügten Beispiele und Figuren erläutert werden, ohne durch diese eingeschränkt zu werden. Es zeigt:

Figur 1: Schema der Primerpositionen zur Präparation der Vollängen der TZR- α -Kette;

Figur 2: Darstellung der präparierten TZR-Ketten. Die Nomenklatur erfolgte für die variablen Segmente (V alpha/beta) nach Arden et al. (Immunogenetics 1995, 42:501-530), für die J-Segmente und die Konstanten Domänen nach der ImmunoGeneTics-Datenbank (<http://imgt.cines.fr:8104>). Die TZR-Ketten V α 3, V α 13, V β 3 und V β 3C β 0 sind, bezogen auf ihre Sequenz, produktiv, V β 1 hingegen weist einen Frame-Shift in der Rekombinationsregion V-D-J und ist nachfolgend nicht produktiv für ein TZR-beta-Ketten-Polypeptid. C β 0 stellt die durch alternatives Splicing entstandene Insertion dar. Die konstante Domäne der V β 1-Kette konnte keiner Subfamilie zugewiesen werden, da ausschließlich die trunkierte Form präpariert wurde und damit keine Differenzierung möglich war.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 22 -

- Figur 3: Positionen der Primer zur Präparation der trunkierten TZR- β -Ketten im Rahmen der 5'-RACE-PCR.
- Figur 4: Darstellung des viralen Vektors pBullet AV03 zur Expression der wildtyp (Wt) murine (mu) TZR $V\alpha 3$ -Kette. Die Wildtyp $V\alpha 3$ -Kette wurde wie im Text beschrieben über die Restriktionsenzymstellen *NcoI* und *BamHI* in den retroviralen Vektor pBullet kloniert.
- Figur 5: Darstellung der Wt muTZR $V\alpha 13$ -Kette, die über die Restriktionsenzymstellen *NcoI* und *SaI* wie beschrieben kloniert wurde.
- Figur 6: Darstellung der funktionellen Wt muTZR $V\beta 3$, in den retroviralen Vektor pBullet kloniert.
- Figur 7: Ergebnis der durchflußzytometrischen Messung der mit dem leeren Vektor pBullet transduzierten PBMZ. Es konnte kein Transgen ($V\beta 3$) nachgewiesen werden.
- Figur 8: Darstellung der Expression des Transgens $V\beta 3$ als Marker für Rekonstitution der mu-TZR-Expression auf humanen PBMZ, die durchflußzytometrisch nachgewiesen werden konnte. Die Expression ist, wie erwartet, ausschließlich für Zellen, die zusätzlich den CD3-Komplex exprimieren, zu zeigen.
- Figur 9: Darstellung der Expression der Kombination $V\alpha 13V\beta 3$ ähnlich Figur 8, die Detektion des Transgens $V\beta 3$ läßt auf Rekonstitution der murinen TZR-Expression auf humanen PBMZ schließen.
- Figur 10: Durchflußzytometrische Darstellung mit $V\alpha 3V\beta 3$ transduzierter humaner PBMZ, gezeigt ist eine Anfärbarkeit für HLA-A2.1-p53(264-272)-PE-Tetramer die auf Expression eines p53(264-272)-spezifischen und HLA-A2.1-restringierten TZR auf den humanen PBMZ hinweist.

SEQ ID Nr. 1: " $V\alpha 3$ ": produktive, funktionelle Maus α -Kette (mu $\nu\alpha$ -mu α); (siehe Figur 2);

SEQ ID Nr. 2: " $V\alpha 13$ ": produktive Maus α -Kette (mu $\nu\alpha$ -mu α); (siehe Figur 2);

SEQ ID Nr. 3: " $V\beta 1$ ": nicht produktive, nicht funktionelle Maus β -Kette (mu $\nu\beta$ -mu β); (siehe Figur 2);

SEQ ID Nr. 4: " $V\beta 3$ ": produktive, funktionelle Maus β -Kette (mu $\nu\beta$ -mu β); (siehe Figur 2);

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 23 -

SEQ ID Nr. 5: "V β 3Cb0": splicing-Variante von V β 3 mit Cb0 Insertion vor Cb1; (siehe Figur 2);

SEQ ID Nr. 6: Primer GSP-1 (rev_R_a_SP1)

SEQ ID Nr. 7: Primer GSP-2 (rev_R_a_SP2)

SEQ ID Nr. 8: Primer GSP-3 (rev_Asc_aTCR_c1.2)

SEQ ID Nr. 9: Primer GSP-4 (rev_Asc_bTCR_c2)

SEQ ID Nr. 10: Primer GSP-5 (rev_bTCR_c4)

SEQ ID Nr. 11: Primer GSP-6 (rev_Asc_bTCR_c6)

SEQ ID Nr. 12: V α 3: Primer Forward (for_Va3-NcoI_1)

SEQ ID Nr. 13: V β 3(C β 0): Primer Forward (for_Vb3-NcoI_1)

SEQ ID Nr. 14: V α 13: Primer Reverse (for_Val3-NcoI_1)

Beispiele:

Die Präparation cytosolischer mRNA wurde unter der Verwendung des käuflich erhältlichen QIAprep Miniprep (QIAGEN, Hilden, Germany) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die 5'-RACE-PCR wurde unter der Verwendung des käuflich erhältlichen RACE PCR Kit (Roche Molecular Diagnostics) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die reverse Transkription wurde alternativ zur reversen Transkription innerhalb des RACE-PCR-Protokolls mit displayTHERMO-RT (Display Systems Biotech, Vista, CA, USA) durchgeführt. Zur Klonierung in die Vektoren pCR $\text{\textcircled{R}}$ 2.1-TOPO $\text{\textcircled{R}}$ und pCR $\text{\textcircled{R}}$ XL-TOPO $\text{\textcircled{R}}$ wurden die entsprechenden Kits (Invitrogen, Niederlande) gemäß Protokoll des Herstellers verwendet. Die Zytotoxizitätstests erfolgten nach dem in Theobald et al. ("Targeting p53 as a general tumor antigen", 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11993-11997) beschriebenen Verfahren.

1. Klonierung der α -TZR-Ketten

Nach Extraktion der mRNA aus einem p53.264-272-spezifischen, HLA-A2.1-restringierten Maus-ZTL-Klon wurde über 5'-RACE-PCR (Boehringer Mannheim, Germany) mittels der selbst designten Gen-spezifischen Primern (SEQ ID Nr. 6 bis SEQ ID Nr. 14) die Vollängen α -TZR-Kette isoliert. Zur Erhöhung der Spezifität wurde das DNA-Intermediat (ca. 1100 Bp) vor der zweiten PCR (Nested PCR) aus einem Agarose-Gel präpariert. Die etwa 1000 Bp großen Produkte wurden nachfolgend in das pCR $\text{\textcircled{R}}$ -XL-TOPO $\text{\textcircled{R}}$ -Vektorsystem nach Angaben des Herstellers kloniert und sequenziert.

Die Orientierung der Primer und die Klonierung der alpha-Kette ist schematisch in Figur 1 gezeigt. Die Gen-spezifischen Primer zur Amplifikation der gesamten kodogenen Region der TZR- α -Kette wurden so gewählt, daß sie in der 3'-nicht-kodogenen Region (UTR) paarten. Der Gen-spezifische Primer GSP-3 (SEQ ID Nr. 8), der abschließend auf dem Stop-Codon paart, fügt durch seinen 5'-Überhang künstlich eine *AscI*-Site ein. Die Sequenzen der Gen-spezifischen Primer wurden durch Vergleich publizierter Maus-TZR- α -Ketten Sequenzen und Auswahl geeigneter Bereich ermittelt.

2. Klonierung der trunkierten-TZR- β -Ketten

Zur Klonierung der TZR- β -Kette wurde wie bei der α -Kette verfahren, jedoch konnten hier keine Gen-spezifischen Primer dienen, die außerhalb der codogenen Region paarten, da verschiedene Gene der konstanten Domäne der β -Kette existieren. Daher mußte ein 3'-trunkiertes Produkt generiert werden, wozu ebenfalls die 5'-RACE PCR benutzt wurde, welches sequenziert wurde. Das Produkt der ersten PCR ergab in der Gelelektrophorese keine deutliche Bande, wurde aber dennoch aus dem Gel extrahiert und der Nested PCR zugeführt. Die resultierende Doppelbande wurde nachfolgend in das TOPO®-Vektorsystem (Invitrogen) kloniert.

3. Analyse der TZR-Ketten Sequenzen

Durch Sequenzierung der PCR-Produkte konnten fünf verschiedene TZR-Ketten-kodierende Sequenzen unterschieden werden:

- 1) V α 3: produktive TZR- α -Kette, funktionell (SEQ ID Nr. 1);
- 2) V α 13: produktive TZR- α -Kette (SEQ ID Nr. 2);
- 3) V β 1: durch fehlerhaftes Rearrangement (V β 1->D beta: frameshift) nicht produktive β -Kette, nicht funktionell (SEQ ID Nr. 3);
- 4) V β 3: produktive β -Kette, funktionell (SEQ ID Nr. 4); und
- 5) V β 3C β 0: splicing-Variante von V β 3 mit C β 0 Insertion vor C β 1 (SEQ ID Nr. 5).

4. Klonierung der produktiven Ketten in das retrovirale Vektorsystem pBullet

Aus den erhaltenen Sequenzen ließen sich für jede Kette Primer ableiten, die im 5'-Bereich paaren. Diese wurden derart modifiziert (siehe SEQ ID Nrn. 12-14), daß sich durch eine PCR

eine *NcoI*-Site (CCATGG) um das Startcodon ATG einfügen ließ, wodurch im Fall der α -Ketten das zweite Basentriplett und dadurch die zweite Aminosäure modifiziert wurde.

Zur Klonierung in den retroviralen Vektor pBullet wurde zunächst erneut mRNA revers transkribiert (displayTHERMO-RT, vgl. S. 20), diesmal jedoch mit einem oligo dT-Primer (displayTHERMO-RT, vgl. S. 20), der im poly-A-tail der RNA paarte, wodurch ein reverses Transkript (einzelssträngige cDNA) der gesamten RNA entstand. Dieses diente in einer nachfolgenden PCR als Matrize.

4.1 Klonierung V α 3/13

Die Klonierung der TZR- α -Ketten erfolgte nach oben beschriebener reversen Transkription und PCR, in der die flankierenden *NcoI*- und *SaI*-Sites eingefügt wurden. pBullet und Insert wurden *NcoI*- und *SaI*-verdaut, und das Insert (V α 3/V α 13) wurde nach Standardmethodik einligiert. Nach Transformation kompetenter Bakterien wurden positive Klone sequenziert. Ein fehlerloser V α 13-Klon wurde für weitere Versuche gewählt. Da die Ausbeute verwertbarer Klone für V α 3 gering war, und einer dieser bis auf einen Fehler im Stopcodon akzeptabel war, wurde dieser zur Rekonstitution des Stop-Codons nochmals in ein bestehendes Plasmid über eine *NcoI*-Austauschkonierung umkloniert, wobei die 3'-flankierende "site" in diesem Fall eine BamHI-spezifische war.

4.2 Klonierung V β 3

Zur Klonierung der β -Kette (V β 3), wurde die kodierende Nukleinsäure nach der PCR abermals in den pCR $\text{\textcircled{R}}$ XL-TOPO $\text{\textcircled{R}}$ kloniert, um von dort aus in den Vektor pBullet umkloniert zu werden. Dazu wurde ein geeigneter Klon selektiert und zunächst durch einen *AscI*-Verdau linearisiert. Gleichsam wurde der leere Vektor pBullet durch einen *XhoI*-Verdau linearisiert. Daraufhin wurden beide "sticky" geschnittenen, Enden durch die T4-DNA-Polymerase in Anwesenheit von dNTPs zu "blunt"-Enden aufgefüllt. Dann erfolgte ein partieller *NcoI*-Verdau des V β 3-Klons, da WildtypTZR über eine interne *NcoI*-Site verfügen und diese bei jenem Verdau nicht geschnitten werden darf und gleichsam ein kompletter *NcoI*-Verdau des leeren Vektors. Nach Gel-Elektrophorese und Extraktion des *NcoI*-VolllängeV β 3-blunt und des blunt-pBullet-leer-*NcoI* Fragments erfolgte die Ligation des Inserts und des Vektors. Mit dem Ligationsprodukt transformierte Bakterienklone wurden sequenziert.

5. Transduktion humaner PBMZ

Nach Etablierung in den retroviralen Vektor pBullet inserierter Vollängen-TZR-Konstrukte, wurden diese Plasmide nach dem Fachmann bekannten Methoden in Bakterienkulturen amplifiziert und präpariert. Diese wurden in Kombination mit den für die Strukturproteine *gag*, *pol* und *GALV-env* kodierenden Plasmiden in die embryonale Nierenzelllinie 293T über $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektion transfiziert. Es wurden folgende Kombinationen transfiziert:

- 1 - pBullet + pHIT60 + pCOLT-GaLV
- 2 - pBullet AV03+pBullet BV03 + pHIT60 + pCOLT-GALV
- 3 - pBullet AV13+pBullet BV03 + pHIT60 + pCOLT-GALV

Diese transiente Transfektion (keine eingeführten Selektionsmarker) führte nach etwa 24h zur Produktion von GALV-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, die durch Ko-Kultivierung der virusproduzierenden 293T-Zellen (2500 rad bestrahlt) mit OKT-3(α -hu CD3)-aktivierten HLA-A2 positiven PBMZ gesunder Spender, zur Infektion dieser PBMZ genutzt wurden. Die Transduktionseffizienz wurde etwa eine Woche nach dreitägiger Kokultivierung und Expansion durch Durchflußzytometrie evaluiert und nach weiterer Expansion konnte die lytische Reaktivität getestet werden.

6. FACS-Untersuchung transduzierter PBMZ

Zur Evaluierung der Transduktionseffizienz wurden Zellen mit der TZR-Ketten-Kombination $V\alpha 3V\beta 3$, $V\alpha 13V\beta 3$ und auch solche, die nur mit dem Expressionsvektor pBullet, der kein Transgen enthielt, mit der Technik der Durchflußzytometrie gemessen. Dazu wurden 10^6 Zellen laut Herstellerangaben mit 1 μg anti-muTCR $V\beta 3$ -Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg) und anti-huCD3-Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen. Figuren 8 und 9 zeigen, daß sowohl die mit der Kombination aus $V\alpha 3V\beta 3$ als auch die mit der aus $V\alpha 13V\beta 3$ positiv für CD3 und muTCR $V\beta 3$ anfärbbar waren, was als Hinweis auf membranständige Expression des β -Ketten-Transgens hinwies. Nicht positiv für $V\beta 3$ -Oberflächen-Transgen hingegen war die Negativkontrolle pBullet ohne Transgen.

Um weiterhin die Rekonstitution der Antigenpezifität durchflußzytometrisch zu bestimmen, wurden 10^5 Zellen mit 0,375 μg A2-p53(264-272)-PE-Tetramer (60 Minuten auf Eis) und anti-huCD8-FITC (15 Minuten auf Eis) gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen.

WO 02/070556

- 27 -

PCT/EP02/02186

Exemplarisch ist die Färbung zuvor positiv für muTCR V β 3 FACS-sortierter, mit der Kombination V α 3V β 3 transduzierter PBMC gezeigt (siehe Figur 10).

7. Zytolytische Aktivität transduzierter PBMZ

Die lytische Reaktivität retroviral transduzierter humaner PBMZ wurde durch Zytotoxizitätstests evaluiert. Die transduzierten PBMZ wurden in einem Standard Chromfreisetzungstest getestet, wobei zum einen peptidbeladene T2-Zellen, als auch die p53-Defektmutante Saos-2 und deren mut (143 V->A) p53 Transfektante Saos-2/143 eingesetzt wurden. Die Zielzellen, die alle den HLA-A2.1-Phänotyp besaßen, wurden zusätzlich in zwanzigfachem Überschuß nicht Chrom-markierter K562-Zellen versetzt, die als sogenanntes „cold target“ selektiv als NK-Zell Zielzellen dienten und somit die unspezifische NK-Zell vermittelte Lyse der Tumorzellen verringerten. Das eingesetzte Verhältnis von Effektor-zu-Zielzellen (E:Z) war 30.

Es ist eine für das p53-Polypeptid spezifische Reaktion der mit der Kombination V α 3V β 3 transduzierten PBMZ zu erkennen. Außerdem wird endogen prozessiertes und in Kontext von HLA-A2.1 präsentiertes p53 abgeleitetes Peptid erkannt (Saos-2/143), was als notwendige Voraussetzung zur Lyse p53-überexprimierender Tumorzellen gilt. Eine Lyse der Negativkontrolle Saos-2 ließ sich für keine Effektorzellen zeigen. Nachfolgende Tabelle 1 stellt exemplarisch die gemessene spezifische Lyse verschiedener Zielzellen dar. Weiter konnte eine spezifische Lyse maligner Zelllinien nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Tabelle 1:

Zielzelle\Effektor	pBullet	V α 3V β 3	V α 13V β 3
T2+FluMI	9	20	19
T2+p53.264-272	6	88	5
Saos-2	4	6	7
Saos-2/143	1	31	4

Angaben in % spezifischer Lyse, Verhältnis E:Z = 30:1

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 28 -

Patentansprüche

1. Polypeptid eines eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β T-Zell Rezeptors gemäß SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.
2. Fusionsprotein, umfassend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder funktionelle Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die ζ -Region von CD3, und/oder CD8, CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die ζ -Region von humanem CD3 und/oder CD8, CD16 oder Teile davon.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 2 oder 3, weiterhin einen flexiblen Linker umfassend, insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGG)₃.
5. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein chimäres, zumindest partiell humanisiertes Fusionsprotein handelt.
6. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Einzelketten oder Doppelketten T-Zell Rezeptor handelt.
7. α - oder β -Kette eines T-Zell-Rezeptors, der die Antigen-Erkennungssequenz eines für die Aminosäuren 264-272 des Proteins p53 oder eines Komplexes von p53 264-272 und HLA-A2 spezifischen Antikörpers umfaßt.
8. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid synthetisch hergestellt worden ist.
9. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA ist mit einer

WO 02/070556

- 29 -

PCT/EP02/02186

Länge von mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 18 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nukleotiden ist.

10. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Nukleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist.
11. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2, 9 oder 10 in Form ihrer komplementären "antisense"-Sequenz.
12. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure synthetisch hergestellt worden ist.
13. Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, retroviralen Vektors, adenoviralen Vektors oder Partikels und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9 bis 12.
14. Wirtszelle, transfiziert mit einem Vektor oder infiziert oder transduziert mit einem Partikel gemäß Anspruch 13.
15. Wirtszelle nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine T-Zelle oder eine T-Vorläuferzelle oder eine Stammzelle handelt.
16. Wirtszelle nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie auf ihrer Oberfläche ein Polypeptid oder Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 exprimiert.
17. Verfahren zur Identifizierung von p53-Protein-spezifischen Antigenen, dadurch gekennzeichnet, daß p53-präsentierende Tumorzellen oder Fraktionen davon mit einer Wirtszelle gemäß Anspruch 16 unter Bedingungen zusammengebracht werden, bei denen die Tumorzellen oder Fraktionen davon nur dann lysiert werden, wenn der Tumor das p53-Protein-spezifische Antigen präsentiert, für welches das präsentierte Polypeptid oder Fusionsprotein spezifisch ist.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 30 -

18. Verfahren zur Herstellung eines gegen ein Polypeptid, Fusionsprotein oder eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 gerichteten Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose, Behandlung und/oder Überwachung der Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen und/oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem Polypeptid oder funktionellen Äquivalenten davon oder Teilen davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder diese kodierende Nukleinsäuren immunisiert wird.
19. Antikörper, hergestellt gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gerichtet ist.
20. Rekombinanter Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er die die Antigen-Erkennungssequenz der α - oder β -Kette eines für die Aminosäuren 264-272 des Proteins p53 oder eines Komplexes von p53 264-272 und HLA-A2 spezifischen T-Zell-Rezeptors umfaßt.
21. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.
22. Arzneimittel zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens einen Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält.
23. Verwendung eines Arzneimittels nach Anspruch 22 zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- 31 -

24. Verfahren zur Herstellung eines Tests zur Auffindung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.
25. Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält.

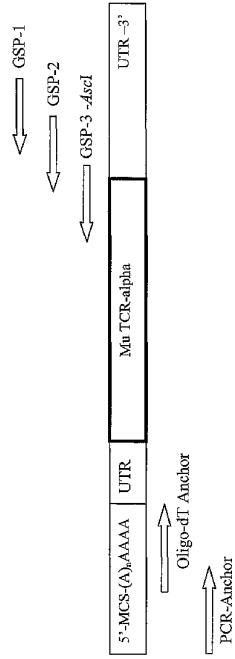


FIGURE 1

FIGUR 2V α 3 (SEQ ID Nr. 1) :

V α 3	J α 33	C α
--------------	---------------	------------

V α 13 (SEQ ID Nr. 2) :

V α 13	J α 42	C α
---------------	---------------	------------

V β 1 (SEQ ID Nr. 3) :

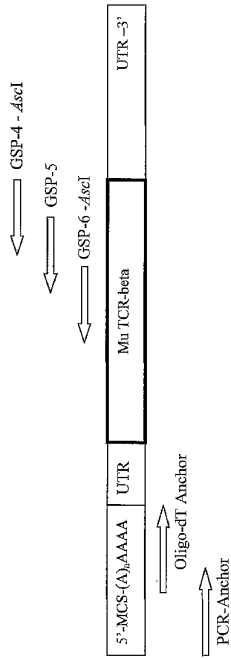
V β 1	D	J β 2.1	C β
-------------	---	---------------	-----------

V β 3 (SEQ ID Nr. 4) :

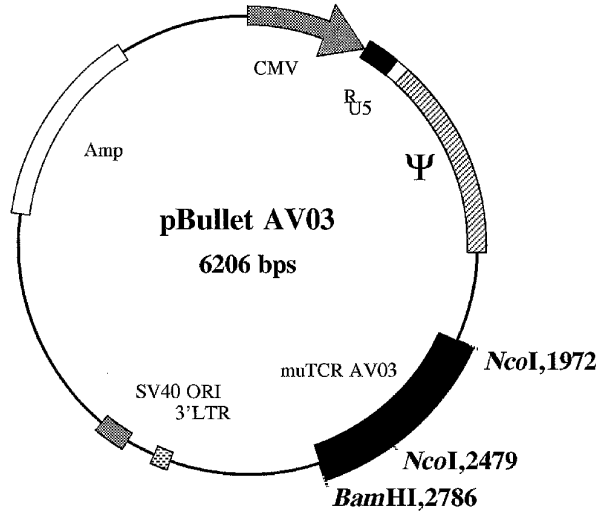
V β 3	D	J β 1.1	C β 1
-------------	---	---------------	-------------

V β 3C β 0 (SEQ ID Nr. 5) :

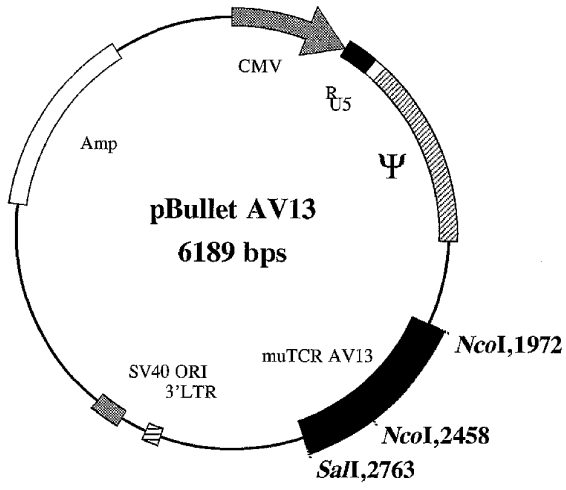
V β 3	D	J β 1.1	C β 0	C β 1
-------------	---	---------------	-------------	-------------



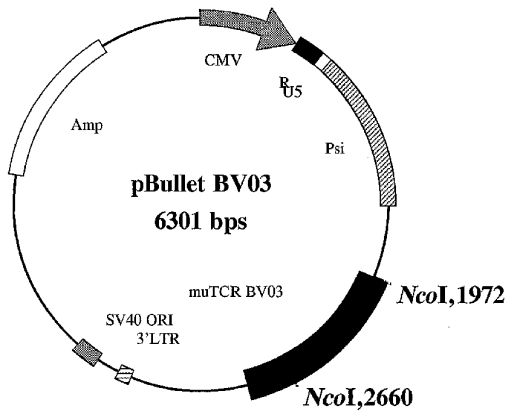
Figur 3



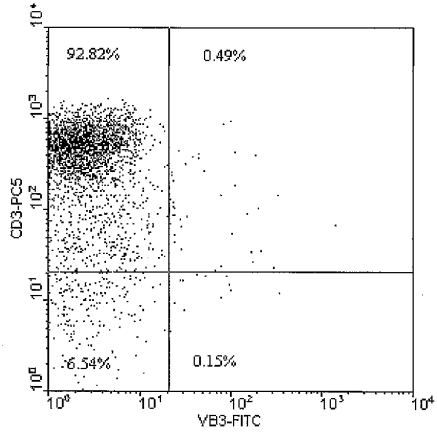
Figur 4



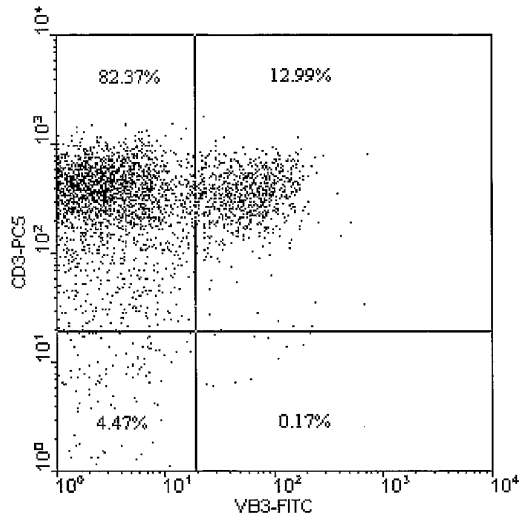
Figur 5



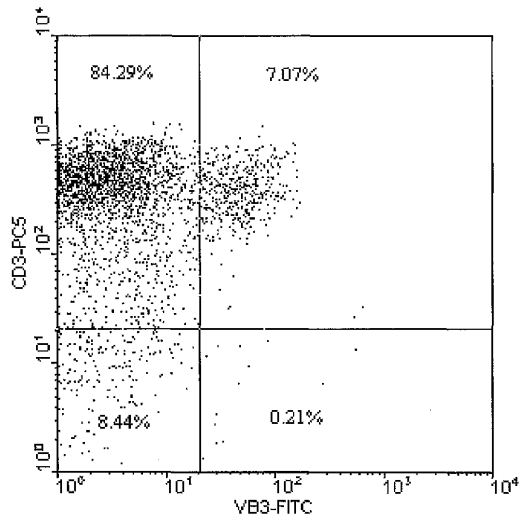
Figur 6



Figur 7



Figur 8

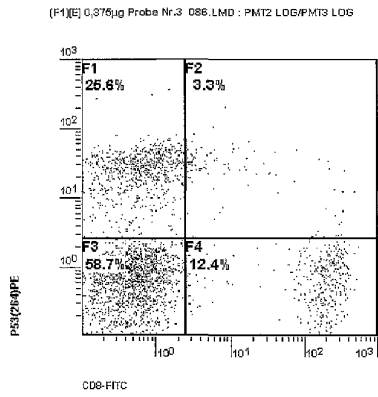


Figur 9

WO 02/070556

10/10

PCT/EP02/02186



Figur 10

WO 02/070556

1/7

PCT/EP02/02186

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Stanislawski, Thomas

<120> Polypeptide eines p53-Protein spezifischen, murinen
alpha/beta T-Zell Rezeptors, diese kodierende
Nukleinsäuren und deren Verwendung

<130> I30051PCT

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

```

Met Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg
 1           5           10          15

Asp Ala Gln Ala Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
 20          25          30

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
 35          40          45

Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
 50          55          60

Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 65          70          75          80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
 85          90          95

Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
100          105         110

Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
115         120         125

Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu
130         135         140

Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe
145         150         155

Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile
165         170         175

Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn
180         185         190

Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile
195         200         205

```

WO 02/070556

2/7

PCT/EP02/02186

Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp
 210 220
 Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe
 225 230 235 240
 Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 245 250 255
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260 265

<210> 2
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

4/7

Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr
 65 70 75 80
 Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu
 85 90 95
 Glu Ile Gln Ser Ser Glu Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Ser Leu Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val
 130 135 140
 Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala
 145 150 155 160
 Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
 165 170 175
 Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
 180 185 190
 Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
 195 200 205
 Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
 210 215 220
 Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu
 225 230 235 240
 Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly
 245 250 255
 Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu
 260 265 270
 Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr
 275 280 285
 Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Lys Lys
 290 295 300
 Asn Ser
 305

 <210> 5
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 5
 Met Ala Thr Arg Leu Leu Cys Tyr Thr Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Arg Ile Leu Asn Ser Lys Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys
 20 25 30
 Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His

WO 02/070556	6/7	PCT/EP02/02186
<400> 6 ctctccagca accttcctca		20
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 7 ggctcctttt ggcttgaaga		20
<210> 8 <211> 34 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 8 aggcgcgccct tcaactggac cacagcctca gogt		34
<210> 9 <211> 34 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 9 aggcgcgccct tcaggaatty ttttyyttga coat		34
<210> 10 <211> 19 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 10 ggatctcata gaggatggt		19
<210> 11 <211> 31 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 11 aggcgcgccct ggccacttgt cctcctctga a		31
<210> 12 <211> 25 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 12 agcatgccat ggtcctggcg ctccct		25
<210> 13 <211> 27 <212> DNA <213> Mus musculus		

WO 02/070556

7/7

PCT/EP02/02186

<400> 13
agcatgcaat ggctacaagg ctctctct

27

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 14
agcatgcaat ggttctatgg ctgca

25

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/070556 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/705, 16/18 (81) Bestimmungsstaaten (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, EG, ES, FI, GB, GD, GI, 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, NG, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02186

(22) Internationales Anmeldedatum: 28. Februar 2002 (28.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 101 09 855.3 1. März 2001 (01.03.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): IMMUGENICS AG [DE/DE]; Unikliniken, Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STANISLAWSKI, Thomas [DE/DE]; Schlagstrasse 4, 65193 Wiesbaden (DE). SCHMITZ, Frank [DE/DE]; Rathausplatz 2, 54218 Birberg (DE). VOSS, Holger [DE/DE]; Im Bienengarten 23, 55218 Ingelheim (DE). THEOBALT, Matthias [DE/DE]; Römerstrasse 16, 55252 Mainz-Kastel (DE).

(74) Anwälte: SCHOHE, Stefan usw.; Boehmert & Boehmert, Peitenkoferstr. 20-22, 80336 München (DE).

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

Veröffentlicht: mit internationalem Recherchenbericht

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten Fassung: 23. Oktober 2003

(15) Informationen zur Berichtigung: siehe PCT Gazette Nr. 43/2003 vom 23. Oktober 2003, Section II

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



(54) Title: POLYPEPTIDE OF A P53 PROTEIN-SPECIFIC MURINE Aβ T-CELL RECEPTOR, NUCLEIC ACIDS CODING THEREFOR AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: POLYPEPTIDE EINER P53-PROTEIN-SPEZIFISCHEN MURINEN Aβ T-ZELL-REZEPTORS, DIESE KODIERENDE NUKLEINSÄUREN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to polypeptides of a murine αβ T-cell receptor mediating a p53 protein-specific T-cell response or functional variants or parts thereof or nucleic acids coding therefor, functional variants or parts thereof. Said polypeptides enable p53 protein-expressing cells to be recognized by T-cells provided with these genes, cytokines can be released, and T-cell induced lysis and/or apoptosis of tumor or leukemia cells can be performed.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung stellt Polypeptide eines eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen αβ T-Zell Rezeptors oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder diese kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon zur Verfügung. Diese bewirken, daß p53-Protein-exprimierende Zellen von T-Zellen, die mit jenen Genen ausgestattet wurden, erkannt werden, Zytokine ausgeschüttet werden, und eine T-Zell-induzierte Lyse und/oder Apoptose von Tumor- oder Leukämiezellen herbeigeführt wird.

WO 02/070556 A1

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

**Polypeptide eines p53-Protein-spezifischen murinen α/β T-Zell Rezeptors, diese
kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung**

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Polypeptide des eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β -T-Zell Rezeptors; diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung bei der Therapie, Diagnose und/oder Prävention von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.

Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten (ZTL) ist entscheidend für die Erzeugung und Regulierung einer effektiven Immunantwort. Der charakteristische T-Zelllinien-Marker ist der T-Zell-Antigen-Rezeptor (TZR). Es gibt zwei definierte Typen von TZR: Einer ist ein Heterodimer von zwei Disulfid-verbundenen Polypeptiden (α und β); der andere ist zwar strukturell ähnlich, besteht jedoch aus γ - und δ -Polypeptiden. Beide Rezeptoren sind mit einem Set von fünf Polypeptiden, dem CD3-Komplex assoziiert und bilden so zusammen den TZR-Komplex (TZR-CD3-Komplex). Der α/β -TZR ist der funktionell bedeutendste, da er in über 95% aller T-Zellen exprimiert wird.

α/β -T-Zellen können in zwei verschiedene sich überschneidende Populationen unterteilt werden: Eine Untergruppe, die den CD4-Marker trägt und hauptsächlich die Immunantwort unterstützt (T_H) und eine Untergruppe, die den CD8-Marker trägt und im wesentlichen zytotoxisch ist (T_C). $CD8^+$ -T-Zellen erkennen Antigene in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Solche Antigene können unter anderem tumorspezifische oder tumorassoziierte Peptidantigene sein. Nach Erkennung der Peptidantigene wird die betreffende Zelle abgetötet, indem die T-Zelle die Zielzelle lysiert und/oder Apoptose dieser Zielzellen induziert, oder Zytokine (z.B. IL-2, IFN- γ) freisetzt.

Unter den tumorassoziierten Peptidantigenen (TAA), die im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, sind die sogenannten "universellen" TAA von besonderem Interesse. Diese TAA leiten sich überwiegend von zellulären Proteinen ab, die in normalen Zellen schwach exprimiert und in Tumorzellen

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

überexprimiert werden. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem das "p53" Protein, dessen Expression in ungefähr 50% aller humanen malignen Erkrankungen, insbesondere in einer Reihe solider Tumore, erhöht ist, und dessen Umsatz im Sinne einer Proteasom-vermittelten Degradation und nachfolgender MHC-Klasse-I-assoziiertes Präsentation erhöht ist.

Oligopeptide des p53-Proteins können im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden und repräsentieren attraktive Zielstrukturen für CD8-positive T-Zellen.

Ein Ansatz für die Entwicklung immuntherapeutischer Verfahren zur Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen ist die Identifizierung von Protein-spezifischen TZR. Solche TZR können unter bestimmten Voraussetzungen T-Zellen mit Antigen-spezifität im allgemeinen und Tumor-Reaktivität im besonderen versehen mit dem Ziel, daß diese T-Zellen die Remission und die Eradikation eines bestimmten Tumors herbeiführen.

Weijtens et al. ("A retroviral vector system, 'STITCH'; in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T-lymphocytes", 1998, *Gene Therapy* 5:1995-1203) beschreiben ein retrovirales Vektorsystem zur Transduktion von Genen in aktivierte T-Lymphozyten. Dieses System wird verwendet, um die Expression von Antikörper-basierten chimären Rezeptoren in der Membran von T-Zellen zu bewirken. Diese T-Zellen können dann gegen z. B. Nieren-Karzinomzellen eingesetzt werden. Mittels FACS-Analyse wird die Protein-Expression und damit der Erfolg der Vektor-Übertragung bestimmt, während Cytotoxizitäts-Test Aufschluß über die erfolgreiche Expression und Funktion des chimären Rezeptors geben. Ähnlich beschreiben Eshhar et al. ("Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the γ or ζ subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors", 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:720-724) die Herstellung von tumorspezifischen Lymphozyten und ihre Verwendung in der Immuntherapie auf der Basis von Chimären, die die variablen Regionen eines Antikörpers mit der konstanten Region des TZR umfassen. Diese chimären Gene konnten auf der Oberfläche von zytolytischen T-Zell-Hybridomen exprimiert werden und bewirkten die Ausschüttung von Interleukin-2 nach Kontakt mit dem Antigen.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Clay et al. ("Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity"; 1999, J. Immunology 163:507-513) beschreiben die Isolierung von Genen der α -TZR und β -TZR Ketten eines MART-1 (25-35) spezifischen TZR und deren Expression in humanen peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs). Die Lyse von verschiedenen Melanomzelllinien wird beschrieben.

Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by *ex vivo* genetically engineered CTL", 2000, J. Immunol. 164, 3705-3712) beschreiben ein immuntherapeutisches Verfahren für Colon-Karzinomen unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN. Das chimäre spezifische Rezeptorkonstrukt wird über einen retroviralen Vektor in primäre Maus-T-Lymphozyten transduziert. Diese Zellen wurden in Mäuse injiziert (sogenannte adoptiver T-Zell-Transfer), die vorher mit Colon-Karzinomzellen beimpft waren.

Aus Theobald et al. ("Targeting p53 as a general tumor antigen", 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11993-11997) ist die Herstellung von p53-spezifischen zytotoxischen T-Zellen nach der Injektion von Peptiden aus der Wildtyp-Sequenz von p53 bekannt. Mittels dieser T-Zelllinien konnte anschließend eine Auswahl von menschlichen Tumorzellen lysiert werden. Die Isolierung von Genen spezifischer TZRs der gegen p53 gerichteten lytischen T-Zellen wird nicht beschrieben. Die WO 97/32603 beschreibt allgemein ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten T-Lymphozyten, die gegen Tumorgewebe gerichtete spezifische TZRs exprimieren. Dabei wird eine HLA-transgene Maus (in diesem Fall HLA-A2.1) mit tumorassoziertem Antigen immunisiert, um so die Produktion von zytotoxischen T-Lymphozyten zu bewirken, die spezifische TZRs auf ihrer Oberfläche exprimieren. Als tumorassozierte Antigene werden Peptide verschiedener Gene, wie Her-2/neu, Ras, p53, Tyrosinase, MART, gp100, MAGE, BAGE und MUC-1 beschrieben. Aus den Her-2/neu spezifischen T-Lymphozyten wird dann die Nukleotidsequenz, die mindestens eine variable Region der α - und β -Kette des entsprechenden nicht menschlichen TZR enthält isoliert und in verschiedenen genetischen (u.a. "humanisierten") TZR-Konstrukten verwendet. So beschreibt die WO 97/32603 Fusionsproteine von variablen Regionen von TZR mit der ζ -Region von CD3, CD8 oder CD16, sowie die Verwendung flexibler Linker der Aminosäuresequenz (GGGS)₃.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Ein spezifisch gegen das Oligopeptid der Aminosäuren 264-272 von p53 gerichteter TZR und dessen Verwendung wird jedoch durch die oben genannten Publikationen sowie in der übrigen Literatur weder erwähnt noch nahegelegt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die murinen Gene der Ketten (α -TZR und β -TZR) eines neuen, effektiv gegen das p53-Protein gerichteten TZR zur Verfügung zu stellen. Diese bewirken, daß p53-Protein-exprimierende Zellen von T-Zellen, die mit jenen Genen ausgestattet wurden, erkannt werden, Zytokine ausgeschüttet werden, und eine T-Zell-induzierte Lyse und/oder Apoptose von Tumor- oder Leukämiezellen herbeigeführt wird.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch das Polypeptid des eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β TZR gemäß SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon, insbesondere Substitutionen, Deletionen, Insertionen, Additionen, Inversionen und/oder chemische oder physikalische Modifikationen einer oder mehrerer Aminosäuren oder diese kodierende Nukleinsäuren, gelöst.

Aus einer einfach-A2.1-transgenen Maus (([A2.1xC57BL/6]xC57BL/6)_{F1}) wurden die Gene der eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α oder β TZR-Ketten isoliert, die eine HLA-A2.1 restringierte und gegen das Peptid der Aminosäuren 264-272 des p53-Proteins gerichtete spezifische T-Zell-Antwort vermitteln. Die Polypeptide dieses TZR waren bisher unbekannt. Die Gene wurden als Wildtyp (WT) retroviral in humane periphere Blut-Lymphozyten (PBLs) eingeschleust und die HLA-restringierte Antigen-Erkennung funktionell durch TZR-vermittelte zytotoxische Lyse verschiedener Zell-Linien im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest überprüft. Zusätzlich zu der "regulären" β -TZR-Kette der vorliegenden Erfindung konnte eine Variante der β -TZR-Kette isoliert werden, die aufgrund von alternativer mRNA-Reifung entstanden ist (beschrieben bei Behlke und Loh, "Alternative splicing of murine T-cell receptor β -chain transcripts", 1986, Nature 322:379-382). Die erhaltene T-Zell-Population war in der Lage, Peptid in nanomolaren Konzentrationen zu erkennen und effizient p53-Transfektanten und eine Varietät von A2.1-positiven malignen Zellen abzutöten. Die erfindungsgemäßen Gene des p53-spezifischen TZR gehören nicht zu den bisher bekannten geeigneten Materialien für die Diagnose - wie beispielsweise der Indikation - und/oder der Behandlung - wie beispielsweise der Modulation - von mit p53-

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder für die Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, so daß sich aus dieser Erfindung völlig neue Therapieansätze ergeben.

Bei Liu et al. ("Targeting of human p53-overexpressing tumor cells by an HLA A*0201-restricted murine T-cell receptor expressed in Jurcat T Cells", 2000, Cancer Res. 60, 693-701) wird die Herstellung eines p53-spezifischen TZR auf der Basis von injizierten Peptiden beschrieben. Die erhaltenen T-Zellen werden als für die Immuntherapie von Krebs geeignet beschrieben. Der von Liu et al. beschriebene TZR ist jedoch gegen ein Peptid der Aminosäuren 149-157 von p53 gerichtet. Da das von den TZR erkannte Epitop des TAA für die therapeutische Wirkung und Nebenwirkungen von entscheidender Bedeutung ist, überrascht das Vorhandensein von weiteren effektiven und bisher unbekanntem TZR, die gegen andere Peptide/Epitope des p53 gerichtet sind, umso mehr.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, umfassend das erfindungsgemäße Polypeptid oder funktionelle Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.

Das Fusionsprotein kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es die ζ -Region von CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die ζ -Region von humanem CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, das einen flexiblen Linker umfaßt (Whitlow et al., "An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability", Prot. Engin. 6(8), pp. 989-995, 1993), insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGS)₃. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Fusionsprotein die ζ -Kette des CD3-Komplexes oder ITAM-Motive der ζ -Kette oder Teile davon umfassen, insbesondere die ζ -Kette von humanem CD3 oder Teile davon. Das Fusionsprotein kann weiterhin dadurch gekennzeichnet sein, daß es CD8 α oder das Lck-Bindungsmotiv von CD8 α umfaßt oder Teile davon, insbesondere von humanem CD8 α .

Bei dem erfindungsgemäßen Fusionsprotein kann es sich weiterhin um eine chimäre partiell oder vollständig humanisierte α und/oder β TZR-Kette handeln. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, bei dem es sich um einen Einzelketten-TZR handelt. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, das einen flexiblen Linker umfaßt,

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGG)₃. Das erfindungsgemäße Fusionsprotein kann aber auch dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich um einen $\alpha\beta$ -TZR handelt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins zur Diagnose und/oder Behandlung von mit p53-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, z.B. in einer geeigneten Wirtszelle, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure verwendet wird.

Hergestellt werden hierbei Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion eines Polypeptids der Erfindung aufweisen oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion funktionell aktiv ist. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von ca. 1-200, vorzugsweise ca. 1-150, insbesondere ca. 1-100, vor allem ca. 1-50 fremden Aminosäuren. Beispiele solcher Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, die z. B. aus der Galactosidase von *E. coli* abgeleitet sein können. Weiterhin können auch virale Peptidsequenzen, wie zum Beispiel vom Bakteriophagen M13 verwendet werden, um so Fusionsproteine für das dem Fachmann bekannte "phage display"-Verfahren zu erzeugen.

Zur Aufreinigung der erfindungsgemäßen Proteine kann ein weiteres/weiteres Polypeptid("tag") angefügt sein. Erfindungsgemäße Protein-tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern, ohne den Komplex in nennenswertem Maße zu eluieren und anschließend gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele der dem Fachmann bekannten Protein-tags sind ein (His)₆-tag, ein Myc-tag, ein FLAG-tag, ein Strep-tag, ein Strep-tag II, ein Hämagglutinin-tag, Glutathion-Transferase (GST)-tag, Intein mit einem Affinitäts-Chitin-binding-tag oder Maltose-bindendes Protein (MBP)-tag. Diese Protein-tags können sich N-, C-terminal und/oder intern befinden.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Polypeptiden können alle erfindungsgemäßen Polypeptide oder deren Teile unter zellfreien Bedingungen hergestellt worden sein, z. B. durch Synthese oder durch *in vitro*-Translation. So kann das gesamte Polypeptid oder Teile

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

davon zum Beispiel mit Hilfe der klassischen Synthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Teile der erfindungsgemäßen Polypeptide eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Die Erfindung betrifft auch Polypeptide, die Derivate eines Antikörpers mit Spezifität für das p53-Peptidantigen (AA 264-272), vorzugsweise präsentiert im Kontext von HLA-A2.1 sind.

Weiterhin umfaßt die Erfindung retro-inverse Peptide oder Pseudopeptide gemäß der Polypeptidsequenz der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktionelle Varianten oder Teile davon. Diese Peptide weisen anstelle der -CO-NH-Peptidbindungen -NH-CO-Bindungen auf.

Die Aufgabe der Erfindung wird weiterhin durch eine erfindungsgemäße Nucleinsäure gelöst, die eine DNA, RNA, PNA (Peptide nucleic acid) oder p-NA (Pyranosyl nucleic acid), vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA ist mit einer Länge von mindestens 8 Nucleotiden, vorzugsweise mit mindestens 12 Nucleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nucleotiden ist. Die Nucleinsäure kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Sequenz der Nucleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist. Sie kann auch in Form ihrer antisense-Sequenz vorliegen.

Für die Expression des betreffenden Gens ist im allgemeinen eine doppelsträngige DNA bevorzugt, wobei der für das Polypeptid kodierende DNA-Bereich besonders bevorzugt ist. Dieser Bereich beginnt mit dem ersten in einer Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak 1987, Nucleic Acids Res. 15:8125-48) liegenden Start-Codon (ATG) bis zum nächsten Stop-Codon (TAG, TGA bzw. TAA), das im gleichen Leseraster zum ATG liegt. Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen ist die Konstruktion von antisense Oligonucleotiden (Zheng und Kemeny 1995, Clin. Exp. Immunol. 100:380-382; Nellen und Lichtenstein 1993, Trends Biochem. Sci. 18:419-23) und/oder Ribozymen (Amarzguioui et al. 1998, Cell. Mol. Life Sci. 54:1175-202; Vaish, et al. 1998, Nucleic Acids Res. 26:5237-42; Persidis 1997, Nat. Biotechnol. 15:921-2; Couture und Stinchcomb 1996, Trends Genet. 12:510-5). Mit "antisense"-Oligonucleotiden kann man die Stabilität der erfindungsgemäßen Nucleinsäure verringern und/oder die Translation der erfindungsgemäßen Nucleinsäure inhibieren. So kann beispielsweise die Expression der entsprechenden Gene in Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verringert werden. Oligonucleotide können sich daher als

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Therapeutikum eignen. Diese Strategie eignet sich beispielsweise auch für Haut, epidermale und dermale Zellen, insbesondere, wenn die "antisense"-Oligonukleotide mit Liposomen komplexiert werden (Smyth et al. 1997, J. Invest. Dermatol. 108:523-6; White et al. 1999, J. Invest. Dermatol. 112:699-705; White et al. 1999, J. Invest. Dermatol. 112:887-92). Für die Verwendung als Sonde oder als "antisense"-Oligonukleotid ist eine einzelsträngige DNA oder RNA bevorzugt.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Nucleinsäuren können alle erfindungsgemäßen Nucleinsäuren oder deren Teile auch synthetisch hergestellt worden sein. Weiterhin kann zur Durchführung der Erfindung eine Nucleinsäure verwendet werden, die synthetisch hergestellt worden ist. So kann die erfindungsgemäße Nucleinsäure beispielsweise chemisch anhand der in den von SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 beschriebenen Proteinsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes z. B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z. B. Uhlmann & Peyman 1990, Chemical Reviews 90:543-584).

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- oder Exonucleasen, insbesondere durch in der Zelle vorkommende DNasen und RNasen, abgebaut. Deshalb ist es vorteilhaft, die Nucleinsäure zu modifizieren, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so daß über einen langen Zeitraum eine hohe Konzentration der Nucleinsäure in der Zelle beibehalten wird (Beigelman et al. 1995, Nucleic Acids Res. 23:3989-94; Dudydz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehrerer Internukleotid-Phosphatgruppen oder durch die Einführung einer oder mehrerer Nicht-Phosphor-Internukleotide, erhalten werden.

Geeignete modifizierte Internukleotide sind in Uhlmann und Peymann (1990, Chem. Rev. 90:544) zusammengefaßt (siehe auch Beigelman et al. 1995, Nucleic Acids Res. 23:3989-94; Dudydz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Modifizierte Internukleotid-Phosphatreste und/oder nicht-Phosphoresterbindungen in einer Nucleinsäure, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphoramidat, Phosphorodithioat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxanbrücken, Carbonatbrücken, Carboxymethylester, Acetamidatbrücken und/oder Thiobrücken enthalten. Es ist auch beabsichtigt, daß diese Modifizierung die

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Haltbarkeit einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden kann, verbessert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, adenoviralen Vektors, retroviralen Vektors (Miller, et al. „Improved retroviral vectors for gene transfer and expression“, BioTechniques Vol. 7, No. 9, p 980, 1989) und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure in einem Vektor vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten sein. Vorzugsweise enthält der gentherapeutisch wirksame Vektor T-Zell spezifische regulatorische Sequenzen, die funktionell mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verbunden sind. Die Expressionsvektoren können prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. 1994, Nucleic. Acids Res. 22:5767-5768), für die Expression in Insektenzellen z. B. *Baculovirus*-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den Met 25, GAL 1 oder ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. 1983, J. Biol. Chem. 258:2674-2682; Mumberg, supra), den *Baculovirus*-Polyhedrin-Promotor, für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839). Für die Expression in Säugetierzellen sind beispielsweise Promotoren geeignet, die eine konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen erlauben. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer und/oder Repressorsequenzen. Beispiel für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40 Promotor

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. 1981, Nature 214:228-232) und weitere virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV. Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen et al. 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5:516-20).

Beispiele für regulierbare Elemente, die T-Zell spezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in diesen Zelltypen exprimiert werden.

Beispiele für regulierbare Elemente, die zellzyklusspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren folgender Gene: cdc25, Cyclin A, Cyclin E, cdc2, E2F, B-myb oder DHFR (Zwicker und Müller 1997, Trends Genet. 13:3-6). Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolischspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glukosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

Der erfindungsgemäße Vektor kann zur Transfektion einer Wirtszelle verwendet werden, bei der es sich bevorzugterweise um eine T-Zelle handelt. Besonders bevorzugt ist eine Wirtszelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie auf ihrer Oberfläche ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Fusionsprotein exprimiert.

Um die Einführung von erfindungsgemäßen Nucleinsäuren und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nucleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen oder nicht-viralen Vektors vorliegen. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Retroviren, Baculoviren, Vakziniaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht-virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder poly-Lysin konjugierte DNA.

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, beispielsweise Adenovirusvektoren oder retrovirale Vektoren (Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3:466-76; Springer et al. 1998, Mol. Cell. 2:549-58).

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Ein bevorzugter Mechanismus, erfindungsgemäße Polypeptide *in vivo* zur Expression zu bringen, ist der virale Gen-Transfer, insbesondere mit Hilfe retroviraler Partikel. Diese werden vorzugsweise genutzt, entsprechende Zielzellen, vorzugsweise T-Lymphozyten, des Patienten *ex vivo* mit den für erfindungsgemäße Polypeptide kodierenden Genen oder Nukleotidsequenzen durch Transduktion zu versehen. Die Zielzellen können daraufhin im Sinne eines adoptiven Zelltransfers wieder in den Patienten reinfundiert werden, um mit der *de novo* eingefügten Spezifität tumorizide und/oder immunmodulierende Effektorfunktionen zu übernehmen. Jüngst wurden auf diesem Wege sehr gute gentherapeutische Erfolge in der Behandlung der durch Immuninkompetenz gekennzeichneten SCID-X1- Krankheit bei Neugeborenen erzielt, in dem hämatologische Vorläuferzellen mit einem analogen intakten Transgen einer in den Kindern vorkommenden nicht-funktionellen mutierten Variante des γ -Kettengens, das für die Differenzierung in die verschiedenen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems essentiell ist, retroviral versehen wurden (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Weiterhin besteht die Möglichkeit den Gentransfer *in vivo* durchzuführen, einerseits durch präferentiell stereotaktische Injektion der infektiösen Partikel, andererseits durch direkte Applikation von Viren-produzierenden Zellen (Oldfield, et al. Hum. Gen. Ther., 1993, 4:39-69).

Die zum Transfer von Genen häufig eingesetzten viralen Vektoren sind nach heutigem Stand der Technik vorwiegend retrovirale, lentivirale, adenovirale und adeno-assoziierte virale Vektoren. Diese sind von natürlichen Viren abgeleitete zirkuläre Nukleotidsequenzen, in denen zumindest die viralen Strukturprotein-kodierenden Gene durch das zu transferierende Konstrukt ausgetauscht werden.

Retrovirale Vektorsysteme schaffen die Voraussetzung für eine langhaltende Expression des Transgens durch die stabile, aber ungerichtete Integration in das Wirtsgenom. Vektoren der jüngeren Generation besitzen keine irrelevanten und potentiell immunogenen Proteine, des weiteren gibt es keine vorbestehende Immunität des Empfängers gegenüber dem Vektor. Retroviren enthalten ein RNA-Genom, das in eine Lipidhülle verpackt ist, die aus Teilen der Wirtszellmembran und Virusproteinen besteht. Zur Expression viraler Gene wird das RNS-Genom revers transkribiert und mit dem Enzym Integrase in die Zielzell-DNS integriert. Diese kann daraufhin von der infizierten Zelle transkribiert und translatiert werden, wodurch virale Bestandteile entstehen, die sich zu Retroviren zusammenfügen. RNS wird ausschließlich

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

dann in die neu entstandenen Viren eingefügt. Das Genom der Retroviren besitzt drei essentielle Gene: *gag*, das für virale Strukturproteine, sogenannte gruppenspezifische Antigene kodiert, *pol* für Enzyme wie Reverse Transkriptase und Integrase und *env* für das Hüllprotein („envelope“), das für die Bindung des wirtsspezifischen Rezeptors verantwortlich ist. Die Produktion der replikationsinkompetenten Viren findet nach Transfektion in sogenannten Verpackungszelllinien statt, die zusätzlich mit den *gag/pol*-kodierenden Genen ausgestattet wurden und diese „in trans“ exprimieren und somit die Ausbildung replikationsinkompetenter (d.h. *gag/pol*-deletierter) transgener Viruspartikel komplementieren. Eine Alternative ist die Cotransfektion der essentiellen Virusgene, wobei nur der das Transgen enthaltende Vektor das Verpackungssignal trägt.

Die Separation dieser Gene ermöglicht einerseits die beliebige Kombination des *gal/pol*-Leserahmen mit aus verschiedenen Stämmen gewonnenen *env*-Leserahmen, wodurch Pseudotypen mit verändertem Wirtstropismus entstehen, andererseits kann dadurch die Bildung replikationskompetenter Viren innerhalb von Verpackungszellen drastisch reduziert werden. Das aus „gibbon ape leukemia virus“ (GALV) abgeleitete Hüllprotein, das im vorliegenden Fall Verwendung findet, ist in der Lage, humane Zellen zu transduzieren und ist in der Verpackungszelllinie PG13 mit amphotropen Wirtsbereich etabliert (Miller et al., 1991). Zusätzlich wird die Sicherheit durch selektive Deletion von nicht-essentiellen Virussequenzen zur Verhinderung einer homologen Rekombination und somit der Produktion replikationskompetenter Partikel erhöht.

Neue, nicht-virale Vektoren bestehen aus autonomen, sich selbst-integrierenden DNS-Sequenzen, den Transposonen, die durch z.B. liposomale Transfektion in die Wirtszelle eingeschleuft werden und erstmals erfolgreich zur Expression humaner Transgene in Säugerzellen eingesetzt wurden (Yant et al., 2000).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Hautzellen, erreicht werden kann (Alexander und Akhurst 1995, Hum. Mol. Genet. 4:2279-85). Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (1987, supra) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6982-6986; Felgner et al. 1994, J. Biol. Chem. 269:2550-2556; Gao und Huang. 1991, Biochim. Biophys. Acta 1189:195-203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioctadecylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transfer von Nucleinsäuren in die Zelle erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nucleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al. 1999, Gene Therapy 6:282; Brandén et al 1999, Nature Biotech. 17:784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nucleinsäuren in das Cytoplasma der Zelle ermöglichen (Kiehl et al 1997, Bioconj. Chem. 8:213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peymann 1990, supra). Eine andere besonders geeignete Form von genterapeutischen Vektoren läßt sich dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nucleinsäure auf Goldpartikeln aufbringt und diese mit Hilfe der sogenannten "Gene Gun" in Gewebe, bevorzugt in die Haut, oder Zellen schießt (Wang et al., 1999, J. Invest. Dermatol. 112:775-81).

Für die genterapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäure ist es auch von Vorteil, wenn der Teil der Nucleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, ein oder mehrere nicht kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Polypeptids, und/oder eine polyA-Sequenz, insbesondere die natürlich vorkommende polyA-Sequenz oder eine SV40 Virus polyA-Sequenz, vor allem am 3'-Ende des Gens enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA erreicht werden kann (Jackson 1993, Cell 74:9-14 und Palmiter et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:478-482).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine T-Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder einem anderen erfindungsgemäßen Genkonstrukt transformiert ist. Wirtszellen können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen sein, Beispiele für prokaryotische Wirtszellen sind *E. coli* und für eukaryotische Zellen *Saccharomyces cerevisiae* oder Insektenzellen.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Eine besonders bevorzugte transformierte Wirtszelle ist eine transgene T-Vörläuferzelle oder eine Stammzelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt. Verfahren zur Transformation von Wirtszellen und/oder Stammzellen sind dem Fachmann gut bekannt und umfassen zum Beispiel Elektroporation, Mikroinjektion oder Transduktion. Eine besonders bevorzugte transformierte Wirtszelle ist eine patienteneigene T-Zelle, die nach der Entnahme mit einem erfindungsgemäßen Genkonstrukt transfiziert oder transduziert wird. Erfindungsgemäße Wirtszellen können insbesondere dadurch erhalten werden, daß dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen entnommen werden, die dann *ex vivo* mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen genetischen Konstrukten transfiziert oder transduziert werden, um so erfindungsgemäße Wirtszellen zu erhalten. Die *ex vivo* generierten spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten re-implantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by *ex vivo* genetically engineered CTL", J. Immunol. 2000, 164:3705-3712) beschriebenen Verfahren unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN.

Ein weiteres bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung von p53-Protein-spezifischen Antigenen ist dadurch gekennzeichnet, daß p53-präsentierende Tumorzellen oder Fraktionen davon mit einer erfindungsgemäßen Wirtszelle unter Bedingungen zusammengebracht werden, bei denen die Tumorzellen oder Fraktionen davon nur dann lysieren, wenn der Tumor das p53-Protein-spezifische Antigen präsentiert, für welches das exprimierte Polypeptid oder Fusionsprotein spezifisch ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose und/oder Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder funktioneller Äquivalente davon oder Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure immunisiert wird.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Das Verfahren erfolgt nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon oder diese(s) kodierende Nukleinsäure(n), gegebenenfalls in Anwesenheit von z. B. inkompletten Freundsches Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (siehe z. B. Diamond et al. 1981, The New England Journal of Medicine, pp. 1344-1349). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z. B. über Säulenchromatographie reinigen. Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (1991, Nature 349: 293-299) hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper zur Diagnose, Prognose und Therapie-Optimierung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, der gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichtet ist und mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden spezifisch reagiert, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Kopplung an geeignete Träger, wie z. B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können. Dieser Antikörper ist entweder polyklonal oder monoklonal, bevorzugt ist ein monoklonaler Antikörper. Unter dem Begriff Antikörper versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung auch gentechnisch hergestellte und gegebenenfalls modifizierte Antikörper bzw. antigenbindende Teile davon, wie z.B. chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper, multifunktionelle Antikörper, bi- oder oligospezifische Antikörper, einzelsträngige Antikörper, F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmente (siehe z.B. EP-B1-0 368 684, US 4,816,567, US 4,816,397, WO 88/01649, WO 93/06213, WO 98/24884). Die erfindungsgemäßen Antikörper können zur Diagnose, Therapie-Überwachung und/oder Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein nach diesem Verfahren hergestelltes Arzneimittel zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung dieses Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.

Die Therapie der mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen kann auf herkömmliche Weise, z.B. durch Infusionen oder Injektionen erfolgen, die die erfindungsgemäßen Arzneimittel enthalten. Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann weiterhin gegebenenfalls in Form von Liposomenkomplexen bzw. Goldpartikelkomplexen erfolgen. Die Behandlung mittels der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann aber auch über orale Dosierungsformen, wie z.B. Tabletten oder Kapseln, über die Schleimhäute, zum Beispiel der Nase oder der Mundhöhle, oder in Form von unter die Haut implantierten Dispositoren erfolgen. Transdermale therapeutische Systeme sind zum Beispiel aus den EP 0 944 398 A1, EP 0 916 336 A1, EP 0 889 723 A1 oder EP 0 852 493 A1 bekannt. Die erfindungsgemäßen (Poly)peptide und deren Derivate können auch dazu eingesetzt werden, Patienten mit Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, die mit p53 in Zusammenhang stehen, gezielt immunkompetent zu machen, um die Induktion, Erzeugung und Expansion von p53.264-272-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zu erreichen und die Tumor- und Leukämiezellen der betreffenden Patienten spezifisch abzutöten. Solche Erkrankungen umfassen zum Beispiel solide Tumorerkrankungen, lymphohämatopoetische Neoplasien, maligne hämatologische Erkrankungen oder Blastenschübe.

Bei einer besonders bevorzugten Art der Behandlung wird dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen entnommen, die dann *ex vivo* mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen genetischen Konstrukten transfiziert oder transduziert werden. Die *ex vivo* generierten spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten re-infundiert oder transplantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. ("Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by *ex vivo* genetically engineered CTL", 2000, J. Immunol. 164: 3705-3712) beschriebenen immuntherapeutischen Verfahren bei Colon-Karzinomen unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Tests zur Auffindung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens ein Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

Unter dem Begriff "funktionelle Interaktoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind alle diejenigen Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Stoffgemische zu verstehen, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Polypeptiden oder Antikörpern, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, unter geeigneten Bedingungen in Wechselwirkung treten können. Mögliche Interaktoren sind einfache chemische organische oder anorganische Moleküle oder Verbindungen, können aber auch Peptide, Proteine oder Komplexe davon umfassen. Die funktionellen Interaktoren können aufgrund ihrer Wechselwirkung die Funktion(en) der Nukleinsäuren, Polypeptide oder Antikörper *in vivo* oder *in vitro* beeinflussen oder auch nur an die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Polypeptide oder Antikörper binden oder mit ihnen andere Wechselwirkungen kovalenter oder nicht-kovalenter Weise eingehen.

Die Erfindung umfaßt weiterhin einen erfindungsgemäß hergestellten Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, der mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. Oft kann so das pathologische Verhalten der Zellen *in vitro* nachgeahmt werden und es können Substanzen gesucht werden, die das normale Verhalten der Zellen wieder herstellen und die ein therapeutisches Potential besitzen. Zudem läßt sich dieses Testsystem zum Screening von Substanzen ausnutzen, die eine Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem funktionellen Interaktor inhibieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel zur Indikation, wie z.B. Diagnose, und Therapie von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, bei dem eine

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger formuliert wird.

Als Therapeutika und/oder Prophylaktika kommen insbesondere Impfstoffe, rekombinante Partikel oder Injektionen oder Infusionslösungen in Betracht, die als Wirkstoff (a) das erfindungsgemäße TZR-Polypeptid und/oder seine Derivate und/oder (b) eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten und/oder (c) *in-vitro* oder *ex-vivo* erzeugte T-Lymphozyten, die einen spezifisch gegen p53.264-272 gerichteten TZR enthalten.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel und/oder rekombinanter Partikel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen bzw. Goldpartikeln komplexierter Form enthält. Der pharmazeutische Träger ist beispielsweise eine physiologische Pufferlösung, vorzugsweise mit einem pH von ca. 6,0-8,0, vorzugsweise von ca. 6,8-7,8. Insbesondere von ca. 7,4 und/oder einer Osmolarität von ca. 200-400 milliosmol/Liter, vorzugsweise von ca. 290-310 milliosmol/Liter. Zusätzlich kann der pharmazeutische Träger geeignete Stabilisatoren, wie z. B. Nukleaseinhibitoren, vorzugsweise Komplexbildner wie EDTA und/oder andere dem Fachmann bekannte Hilfsstoffe enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids zur Diagnose und/oder Behandlung von mit p53-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen in einer geeigneten Wirtszelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine erfindungsgemäße Nukleinsäure auf geeignete Weise exprimiert wird.

Das Polypeptid wird so beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die *E. coli* Stämme DHS, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzelllinien, z. B. von *Spodoptera frugiperda*, oder die tierischen Zellen COS, Vero, 293, HaCaT, und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Ein erfindungsgemäßes Diagnostikum zur Therapie-Überwachung enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunologisch wirksamen Teile davon. Das Polypeptid bzw. die Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z. B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit, z. B. Blut, *in vitro* in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikörpern oder Tumor- und Leukämiezellen reagieren zu können. Der Antikörper-Antigen-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, z. B. Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert, oder um eine andere geeignete Markierung. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

Ein anderes Diagnostikum zur Therapie-Überwachung enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid in einer erhöhten Menge vorhanden ist, um dadurch mit p53-Protein in Zusammenhang stehende Erkrankungen zu diagnostizieren und Hinweise zum Therapie-Erfolg zu erhalten. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Antigen-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Diagnostikum umfaßt eine Sonde, vorzugsweise eine DNA-Sonde, und/oder Primer. Dies eröffnet eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, zum Beispiel durch die Isolierung aus einer geeigneten Genbank anhand einer geeigneten Sonde zu erhalten (siehe z. B. Sambrook et al. 1989, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY Kapitel 8 Seite 8.1 bis 8.81, Kapitel 9 Seite 9.47 bis 9.58 und Kapitel 10 Seite 10.1 bis 10.67).

Als Sonde eignen sich beispielsweise DNA- oder RNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100-1000 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200-500 Nukleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300-400 Nukleotiden deren Sequenz aus den Polypeptiden gemäß den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 des Sequenzprotokolls abgeleitet werden kann.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Alternativ können anhand der abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen Oligonukleotide synthetisiert werden, die sich als Primer für eine Polymerase Kettenreaktion eignen. Als Primer eignen sich beispielsweise DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 10-100 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 15 bis 50 Nukleotiden, insbesondere mit einer Länge von 20-30 Nukleotiden deren Sequenz aus den Polypeptiden gemäß den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 des Sequenzprotokolls anhand der entsprechenden cDNA Sequenzen gemäß dem genetischen Code abgeleitet werden kann.

Der Begriff "kodierende Nukleinsäure" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die für ein isolierbares bioaktives erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Precursor kodiert. Das Polypeptid kann durch eine Sequenz in voller Länge oder jeden Teil der kodierenden Sequenz kodiert werden, solange die spezifische, beispielsweise enzymatische Aktivität erhalten bleibt.

Es ist bekannt, daß kleine Veränderungen in der Sequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren vorhanden sein können, zum Beispiel durch die Degenerierung des genetischen Codes, oder daß nicht translatierte Sequenzen am 5'- und/oder 3'-Ende der Nukleinsäure angehängt sein können, ohne daß dessen Aktivität wesentlich verändert wird. Diese Erfindung umfaßt deshalb auch sogenannte "funktionelle Varianten" der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Mit dem Begriff "funktionelle Varianten" sind alle DNA-Sequenzen bezeichnet, die komplementär zu einer DNA-Sequenz sind, die unter stringenten Bedingungen mit einer abgeleiteten Referenzsequenz oder Teilen davon, insbesondere der hypervariablen V(D)J-Region, hybridisieren und eine zu dem entsprechenden erfindungsgemäßen Polypeptid ähnliche oder identische Aktivität aufweisen.

Unter "stringenten Hybridisierungsbedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, bei denen eine Hybridisierung bei 60°C in 2,5 x SSC-Puffer, gefolgt von mehreren Waschschritten bei 37°C in einer geringeren Pufferkonzentration erfolgt und stabil bleibt.

Unter dem Begriff "funktionelle Varianten" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Polypeptiden verwandt sind, d. h. Strukturmerkmale der Polypeptide aufweisen. Beispiele funktioneller Varianten sind die

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

entsprechenden Polypeptide, die aus anderen Organismen als der Maus, also dem Menschen, bzw., vorzugsweise aus nicht-menschlichen Säugetieren wie z. B. Affen, Schweinen und Ratten oder auch Vögeln, z. B. Hühnern, stammen. Andere Beispiele funktioneller Varianten sind Polypeptide, die durch unterschiedliche Allele des Gens, in verschiedenen Individuen oder in verschiedenen Organen eines Organismus kodiert werden. Funktionelle Varianten im Sinne der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Polypeptide, die das gleiche Epitop des p53 Proteins erkennen, wie der TZR der vorliegenden Erfindung. Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität, von ca. 70%, vorzugsweise ca. 80%, insbesondere ca. 90%, vor allem ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß einer der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 und/oder zu anhand der Peptidsequenzen abgeleiteten DNA Sequenzen aufweisen. Dazu zählen auch Deletionen, Inversionen, Additionen, Substitutionen, Insertionen sowie chemische und/oder physikalische Modifikationen oder Teile des Polypeptids im Bereich von ca. 1-60, vorzugsweise von ca. 1-30, insbesondere von ca. 1-15, vor allem von ca. 1-5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird.

Die Erfindung soll nun weiter anhand der beigefügten Beispiele und Figuren erläutert werden, ohne durch diese eingeschränkt zu werden. Es zeigt:

- Figur 1: Schema der Primerpositionen zur Präparation der Vollängen der TZR- α -Kette;
- Figur 2: Darstellung der präparierten TZR-Ketten. Die Nomenklatur erfolgte für die variablen Segmente (V alpha/beta) nach Arden et al. (Immunogenetics 1995, 42:501-530), für die J-Segmente und die Konstanten Domänen nach der ImmunoGeneTics-Datenbank (<http://imgt.cines.fr:8104>). Die TZR-Ketten V α 3, V α 13, V β 3 und V β 3C β 0 sind, bezogen auf ihre Sequenz, produktiv, V β 1 hingegen weist einen Frame-Shift in der Rekombinationsregion V-D-J und ist nachfolgend nicht produktiv für ein TZR-beta-Ketten-Polypeptid. C β 0 stellt die durch alternatives Splicing entstandene Insertion dar. Die konstante Domäne der V β 1-Kette konnte keiner Subfamilie zugewiesen werden, da ausschließlich die trunkierte Form präpariert wurde und damit keine Differenzierung möglich war.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- Figur 3: Positionen der Primer zur Präparation der trunkierten TZR- β -Ketten im Rahmen der 5'-RACE-PCR.
- Figur 4: Darstellung des viralen Vektors pBullet AV03 zur Expression der Wildtyp (Wt) murine (mu) TZR V α 3-Kette. Die Wildtyp V α 3-Kette wurde wie im Text beschrieben über die Restriktionsenzymstellen *NcoI* und *BamHI* in den retroviralen Vektor pBullet kloniert.
- Figur 5: Darstellung der Wt muTZR V α 13-Kette, die über die Restriktionsenzymstellen *NcoI* und *SaI* wie beschrieben kloniert wurde.
- Figur 6: Darstellung der funktionellen Wt muTZR V β 3, in den retroviralen Vektor pBullet kloniert.
- Figur 7: Ergebnis der durchflußzytometrischen Messung der mit dem leeren Vektor pBullet transduzierten PBMZ. Es konnte kein Transgen (V β 3) nachgewiesen werden.
- Figur 8: Darstellung der Expression des Transgens V β 3 als Marker für Rekonstitution der mu-TZR-Expression auf humanen PBMZ, die durchflußzytometrisch nachgewiesen werden konnte. Die Expression ist, wie erwartet, ausschließlich für Zellen, die zusätzlich den CD3-Komplex exprimieren, zu zeigen.
- Figur 9: Darstellung der Expression der Kombination V α 13V β 3 ähnlich Figur 8, die Detektion des Transgens V β 3 läßt auf Rekonstitution der murinen TZR-Expression auf humanen PBMZ schließen.
- Figur 10: Durchflußzytometrische Darstellung mit V α 3V β 3 transduzierter humaner PBMZ, gezeigt ist eine Anfärbbarkeit für HLA-A2.1-p53(264-272)-PE-Tetramer die auf Expression eines p53(264-272)-spezifischen und HLA-A2.1-restringierten TZR auf den humanen PBMZ hinweist.

SEQ ID Nr. 1: "V α 3": produktive, funktionelle Maus α -Kette (muvo-mu α); (siehe Figur 2);

SEQ ID Nr. 2: "V α 13": produktive Maus α -Kette (muvo-mu α); (siehe Figur 2);

SEQ ID Nr. 3: "V β 1": nicht produktive, nicht funktionelle Maus β -Kette (muv β -muc β); (siehe Figur 2);

SEQ ID Nr. 4: "V β 3": produktive, funktionelle Maus β -Kette (muv β -muc β); (siehe Figur 2);

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

- SEQ ID Nr. 5: "V β 3Cb0": splicing-Variante von V β 3 mit Cb0 Insertion vor Cb1; (siehe Figur 2);
- SEQ ID Nr. 6: Primer GSP-1 (rev_R_a_SP1)
- SEQ ID Nr. 7: Primer GSP-2 (rev_R_a_SP2)
- SEQ ID Nr. 8: Primer GSP-3 (rev_Asc_aTCR_c1.2)
- SEQ ID Nr. 9: Primer GSP-4 (rev_Asc_bTCR_c2)
- SEQ ID Nr. 10: Primer GSP-5 (rev_bTCR_c4)
- SEQ ID Nr. 11: Primer GSP-6 (rev_Asc_bTCR_c6)
- SEQ ID Nr. 12: V α 3: Primer Forward (for_Va3-NcoI_1)
- SEQ ID Nr. 13: V β 3(C β 0): Primer Forward (for_Vb3-NcoI_1)
- SEQ ID Nr. 14: V α 13: Primer Reverse (for_Val3-NcoI_1)

Beispiele:

Die Präparation cytosolischer mRNA wurde unter der Verwendung des käuflich erhältlichen QIAprep Miniprep (QIAGEN, Hilden, Germany) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die 5'RACE-PCR wurde unter der Verwendung des käuflich erhältlichen RACE PCR Kit (Roche Molecular Diagnostics) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die reverse Transkription wurde alternativ zur reversen Transkription innerhalb des RACE-PCR-Protokolls mit displayTHERMO-RT (Display Systems Biotech, Vista, CA, USA) durchgeführt. Zur Klonierung in die Vektoren pCR $\text{\textcircled{R}}$ 2.1-TOPO $\text{\textcircled{R}}$ und pCR $\text{\textcircled{R}}$ XL-TOPO $\text{\textcircled{R}}$ wurden die entsprechenden Kits (Invitrogen, Niederlande) gemäß Protokoll des Herstellers verwendet. Die Zytotoxizitätstests erfolgten nach dem in Theobald et al. ("Targeting p53 as a general tumor antigen", 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11993-11997) beschriebenen Verfahren.

1. Klonierung der α -TZR-Ketten

Nach Extraktion der mRNA aus einem p53.264-272-spezifischen, HLA-A2.1-restringierten Maus-ZTL-Klon wurde über 5'-RACE-PCR (Boehringer Mannheim, Germany) mittels der selbst designierten Gen-spezifischen Primern (SEQ ID Nr. 6 bis SEQ ID Nr. 14) die Vollängen α -TZR-Kette isoliert. Zur Erhöhung der Spezifität wurde das DNA-Intermediat (ca. 1100 Bp) vor der zweiten PCR (Nested PCR) aus einem Agarose-Gel präpariert. Die etwa 1000 Bp großen Produkte wurden nachfolgend in das pCR $\text{\textcircled{R}}$ -XL-TOPO $\text{\textcircled{R}}$ -Vektorsystem nach Angaben des Herstellers kloniert und sequenziert.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Die Orientierung der Primer und die Klonierung der alpha-Kette ist schematisch in Figur 1 gezeigt. Die Gen-spezifischen Primer zur Amplifikation der gesamten kodogenen Region der TZR- α -Kette wurden so gewählt, daß sie in der 3'-nicht-kodogenen Region (UTR) paarten. Der Gen-spezifische Primer GSP-3 (SEQ ID Nr. 8), der abschließend auf dem Stop-Codon paart, fügt durch seinen 5'-Überhang künstlich eine *AscI*-Site ein. Die Sequenzen der Gen-spezifischen Primer wurden durch Vergleich publizierter Maus-TZR- α -Ketten Sequenzen und Auswahl geeigneter Bereich ermittelt.

2. Klonierung der trunkierten-TZR- β -Ketten

Zur Klonierung der TZR- β -Kette wurde wie bei der α -Kette verfahren, jedoch konnten hier keine Gen-spezifischen Primer dienen, die außerhalb der codogenen Region paarten, da verschiedene Gene der konstanten Domäne der β -Kette existieren. Daher mußte ein 3'-trunkiertes Produkt generiert werden, wozu ebenfalls die 5'-RACE PCR benutzt wurde, welches sequenziert wurde. Das Produkt der ersten PCR ergab in der Gelelektrophorese keine deutliche Bande, wurde aber dennoch aus dem Gel extrahiert und der Nested PCR zugeführt. Die resultierende Doppelbande wurde nachfolgend in das TOPO®-Vektorsystem (Invitrogen) kloniert.

3. Analyse der TZR-Ketten Sequenzen

Durch Sequenzierung der PCR-Produkte konnten fünf verschiedene TZR-Ketten-kodierende Sequenzen unterschieden werden:

- 1) V α 3: produktive TZR- α -Kette, funktionell (SEQ ID Nr. 1);
- 2) V α 13: produktive TZR- α -Kette (SEQ ID Nr. 2);
- 3) V β 1: durch fehlerhaftes Rearrangement (V β 1->D beta: frameshift) nicht produktive β -Kette, nicht funktionell (SEQ ID Nr. 3);
- 4) V β 3: produktive β -Kette, funktionell (SEQ ID Nr. 4); und
- 5) V β 3C β 0: splicing-Variante von V β 3 mit C β 0 Insertion vor C β 1 (SEQ ID Nr. 5).

4. Klonierung der produktiven Ketten in das retrovirale Vektorsystem pBullet

Aus den erhaltenen Sequenzen ließen sich für jede Kette Primer ableiten, die im 5'-Bereich paaren. Diese wurden derart modifiziert (siehe SEQ ID Nrn. 12-14), daß sich durch eine PCR

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

eine *NcoI*-Site (CCATGG) um das Startcodon ATG einfügen ließ, wodurch im Fall der α -Ketten das zweite Basentriplett und dadurch die zweite Aminosäure modifiziert wurde.

Zur Klonierung in den retroviralen Vektor pBullet wurde zunächst erneut mRNA revers transkribiert (displayTHERMO-RT, vgl. S. 20), diesmal jedoch mit einem oligo dT-Primer (displayTHERMO-RT, vgl. S. 20), der im poly-A-tail der RNA paarte, wodurch ein reverses Transkript (einzelssträngige cDNA) der gesamten RNA entstand. Dieses diente in einer nachfolgenden PCR als Matrize.

4.1 Klonierung V α 3/13

Die Klonierung der TZR- α -Ketten erfolgte nach oben beschriebener reversen Transkription und PCR, in der die flankierenden *NcoI*- und *Sall*-Sites eingefügt wurden. pBullet und Insert wurden *NcoI*- und *Sall*-verdaut, und das Insert (V α 3/V α 13) wurde nach Standardmethodik einligiert. Nach Transformation kompetenter Bakterien wurden positive Klone sequenziert. Ein fehlerloser V α 3-Klon wurde für weitere Versuche gewählt. Da die Ausbeute verwertbarer Klone für V α 3 gering war, und einer dieser bis auf einen Fehler im Stopcodon akzeptabel war, wurde dieser zur Rekonstitution des Stop-Codons nochmals in ein bestehendes Plasmid über eine *NcoI*-Austauschkonierung umklont, wobei die 3'-flankierende "site" in diesem Fall eine BamHI-spezifische war.

4.2 Klonierung V β 3

Zur Klonierung der β -Kette (V β 3), wurde die kodierende Nukleinsäure nach der PCR abermals in den pCR $\text{\textcircled{X}}\text{L-TOPO}$ kloniert, um von dort aus in den Vektor pBullet umklont zu werden. Dazu wurde ein geeigneter Klon selektiert und zunächst durch einen *AseI*-Verdau linearisiert. Gleichsam wurde der leere Vektor pBullet durch einen *XhoI*-Verdau linearisiert. Daraufhin wurden beide "sticky" geschnittenen Enden durch die T4-DNA-Polymerase in Anwesenheit von dNTPs zu "blunt"-Enden aufgefüllt. Dann erfolgte ein partieller *NcoI*-Verdau des V β 3-Klons, da WildtypTZR über eine interne *NcoI*-Site verfügen und diese bei jenem Verdau nicht geschnitten werden darf und gleichsam ein kompletter *NcoI*-Verdau des leeren Vektors. Nach Gel-Elektrophorese und Extraktion des *NcoI*-VolllängeV β 3-blunt und des blunt-pBullet-leer-*NcoI* Fragments erfolgte die Ligation des Inserts und des Vektors. Mit dem Ligationsprodukt transformierte Bakterienklone wurden sequenziert.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

5. Transduktion humaner PBMZ

Nach Etablierung in den retroviralen Vektor pBullet inserierter Vollängen-TZR-Konstrukte, wurden diese Plasmide nach dem Fachmann bekannten Methoden in Bakterienkulturen amplifiziert und präpariert. Diese wurden in Kombination mit den für die Strukturproteine *gag*, *pol* und *GALV-env* kodierenden Plasmiden in die embryonale Nierenzelllinie 293T über $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektion transfiziert. Es wurden folgende Kombinationen transfiziert:

- 1 - pBullet + pHIT60 + pCOLT-GaLV
- 2 - pBullet AV03+pBullet BV03 + pHIT60 + pCOLT-GALV
- 3 - pBullet AV13+pBullet BV03 + pHIT60 + pCOLT-GALV

Diese transiente Transfektion (keine eingeführten Selektionsmarker) führte nach etwa 24h zur Produktion von GALV-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, die durch Ko-Kultivierung der virusproduzierenden 293T-Zellen (2500 rad bestrahlt) mit OKT-3(α -hu CD3)-aktivierten HLA-A2 positiven PBMZ gesunder Spender, zur Infektion dieser PBMZ genutzt wurden. Die Transduktionseffizienz wurde etwa eine Woche nach dreitägiger Kokultivierung und Expansion durch Durchflußzytometrie evaluiert und nach weiterer Expansion konnte die lytische Reaktivität getestet werden.

6. FACS-Untersuchung transduzierter PBMZ

Zur Evaluierung der Transduktionseffizienz wurden Zellen mit der TZR-Ketten-Kombination $V\alpha 3V\beta 3$, $V\alpha 13V\beta 3$ und auch solche, die nur mit dem Expressionsvektor pBullet, der kein Transgen enthielt, mit der Technik der Durchflußzytometrie gemessen. Dazu wurden 10^6 Zellen laut Herstellerangaben mit $1 \mu\text{g}$ anti-muTCR $V\beta 3$ -Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg) und anti-huCD3-Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen. Figuren 8 und 9 zeigen, daß sowohl die mit der Kombination aus $V\alpha 3V\beta 3$ als auch die mit der aus $V\alpha 13V\beta 3$ positiv für CD3 und muTCR $V\beta 3$ anfärbbar waren, was als Hinweis auf membranständige Expression des β -Ketten-Transgens hinwies. Nicht positiv für $V\beta 3$ -Oberflächen-Transgen hingegen war die Negativkontrolle pBullet ohne Transgen.

Um weiterhin die Rekonstitution der Antigenpezifität durchflußzytometrisch zu bestimmen, wurden 10^5 Zellen mit $0,375 \mu\text{g}$ A2-p53(264-272)-PE-Tetramer (60 Minuten auf Eis) und anti-huCD8-FITC (15 Minuten auf Eis) gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Exemplarisch ist die Färbung zuvor positiv für muTCR V β 3 FACS-sortierter, mit der Kombination V α 3V β 3 transduzierter PBMC gezeigt (siehe Figur 10).

7. Zytolytische Aktivität transduzierter PBMZ

Die lytische Reaktivität retroviral transduzierter humaner PBMZ wurde durch Zytotoxizitätstests evaluiert. Die transduzierten PBMZ wurden in einem Standard Chromfreisetzungstest getestet, wobei zum einen peptidbeladene T2-Zellen, als auch die p53-Defektmutante Saos-2 und deren mut (143 V->A) p53 Transfektante Saos-2/143 eingesetzt wurden. Die Zielzellen, die alle den HLA-A2.1-Phänotyp besaßen, wurden zusätzlich in zwanzigfachem Überschuß nicht Chrom-markierter K562-Zellen versetzt, die als sogenanntes „cold target“ selektiv als NK-Zell Zielzellen dienten und somit die unspezifische NK-Zell vermittelte Lyse der Tumorzellen verringerten. Das eingesetzte Verhältnis von Effektor-zu-Zielzellen (E:Z) war 30.

Es ist eine für das p53-Polypeptid spezifische Reaktion der mit der Kombination V α 3V β 3 transduzierten PBMZ zu erkennen. Außerdem wird endogen prozessiertes und in Kontext von HLA-A2.1 präsentiertes p53 abgeleitetes Peptid erkannt (Saos-2/143), was als notwendige Voraussetzung zur Lyse p53-überexprimierender Tumorzellen gilt. Eine Lyse der Negativkontrolle Saos-2 ließ sich für keine Effektorzellen zeigen. Nachfolgende Tabelle 1 stellt exemplarisch die gemessene spezifische Lyse verschiedener Zielzellen dar. Weiter konnte eine spezifische Lyse maligner Zelllinien nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Tabelle 1:

Zielzelle\Effektor	pBullet	V α 3V β 3	V α 13V β 3
T2+FluMI	9	20	19
T2+p53.264-272	6	88	5
Saos-2	4	6	7
Saos-2/143	1	31	4

Angaben in % spezifischer Lyse, Verhältnis E:Z = 30:1

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Patentansprüche

1. Polypeptid eines eine p53-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β T-Zell Rezeptors gemäß SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.
2. Fusionsprotein, umfassend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder funktionelle Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die ζ -Region von CD3, und/oder CD8, CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die ζ -Region von humanem CD3 und/oder CD8, CD16 oder Teile davon.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 2 oder 3, weiterhin einen flexiblen Linker umfassend, insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGS)₃.
5. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein chimäres, zumindest partiell humanisiertes Fusionsprotein handelt.
6. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Einzelketten oder Doppelketten T-Zell Rezeptor handelt.
7. α - oder β -Kette eines T-Zell-Rezeptors, der die Antigen-Erkennungssequenz eines für die Aminosäuren 264-272 des Proteins p53 oder eines Komplexes von p53 264-272 und HLA-A2 spezifischen Antikörpers umfaßt.
8. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid synthetisch hergestellt worden ist.
9. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA ist mit einer

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

Länge von mindestens 8 Nucleotiden, vorzugsweise mit mindestens 18 Nucleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nucleotiden ist.

10. Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Nucleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist.
11. Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2, 9 oder 10 in Form ihrer komplementären "antisense"-Sequenz.
12. Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure synthetisch hergestellt worden ist.
13. Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, retroviralen Vektors, adenoviralen Vektors oder Partikels und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, umfassend eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9 bis 12.
14. Wirtszelle, transfiziert mit einem Vektor oder infiziert oder transduziert mit einem Partikel gemäß Anspruch 13.
15. Wirtszelle nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine T-Zelle oder eine T-Vorläuferzelle oder eine Stammzelle handelt.
16. Wirtszelle nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie auf ihrer Oberfläche ein Polypeptid oder Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 exprimiert.
17. Verfahren zur Identifizierung von p53-Protein-spezifischen Antigenen, dadurch gekennzeichnet, daß p53-präsentierende Tumorzellen oder Fraktionen davon mit einer Wirtszelle gemäß Anspruch 16 unter Bedingungen zusammengebracht werden, bei denen die Tumorzellen oder Fraktionen davon nur dann lysiert werden, wenn der Tumor das p53-Protein-spezifische Antigen präsentiert, für welches das präsentierte Polypeptid oder Fusionsprotein spezifisch ist.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

18. Verfahren zur Herstellung eines gegen ein Polypeptid, Fusionsprotein oder eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 gerichteten Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose, Behandlung und/oder Überwachung der Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen und/oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem Polypeptid oder funktionellen Äquivalenten davon oder Teilen davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder diese kodierende Nukleinsäuren immunisiert wird.
19. Antikörper, hergestellt gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gerichtet ist.
20. Rekombinanter Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er die die Antigen-Erkennungssequenz der α - oder β -Kette eines für die Aminosäuren 264-272 des Proteins p53 oder eines Komplexes von p53 264-272 und HLA-A2 spezifischen T-Zell-Rezeptors umfaßt.
21. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.
22. Arzneimittel zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens einen Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält.
23. Verwendung eines Arzneimittels nach Anspruch 22 zur Behandlung von mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen.

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

24. Verfahren zur Herstellung eines Tests zur Auffindung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.
25. Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit p53-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält.

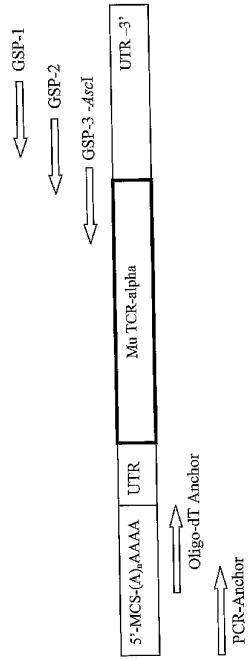


FIGURE 1

FIGUR 2V α 3 (SEQ ID Nr. 1) :

V α 3	J α 33	C α
--------------	---------------	------------

V α 13 (SEQ ID Nr. 2) :

V α 13	J α 42	C α
---------------	---------------	------------

V β 1 (SEQ ID Nr. 3) :

V β 1	D	J β 2.1	C β
-------------	---	---------------	-----------

V β 3 (SEQ ID Nr. 4) :

V β 3	D	J β 1.1	C β 1
-------------	---	---------------	-------------

V β 3C β 0 (SEQ ID Nr. 5) :

V β 3	D	J β 1.1	C β 0	C β 1
-------------	---	---------------	-------------	-------------

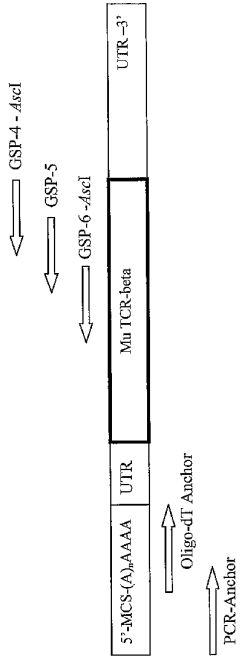
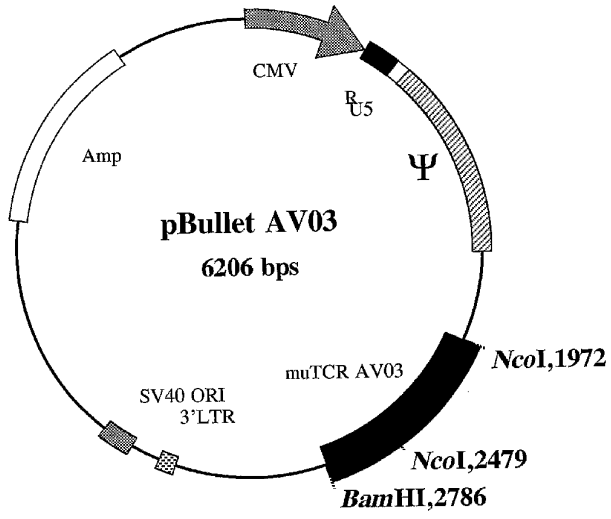
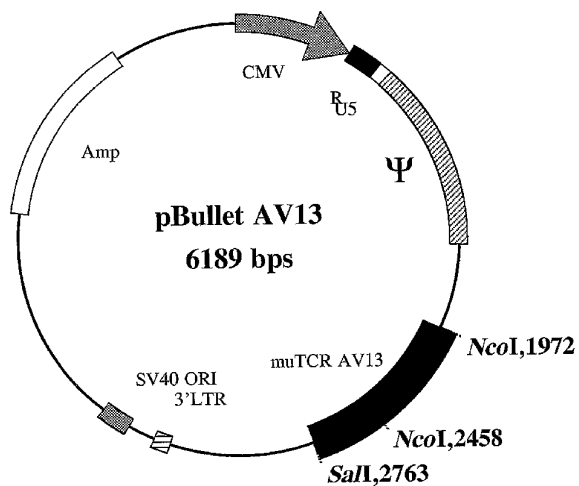


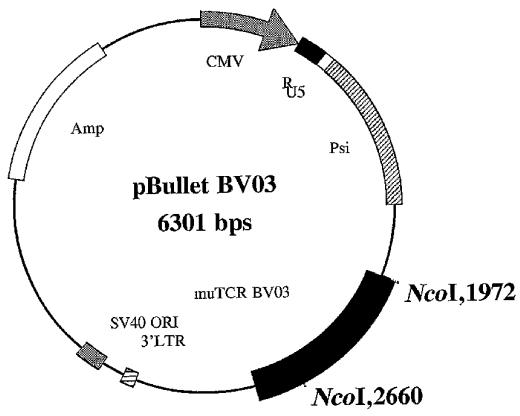
Figure 3



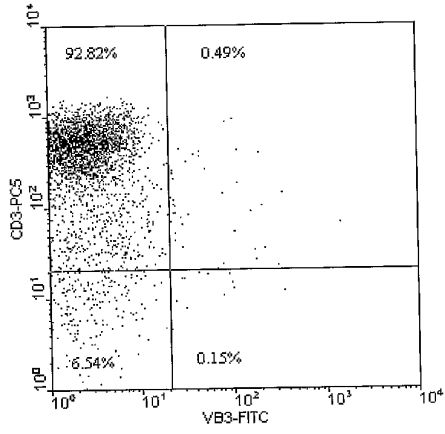
Figur 4



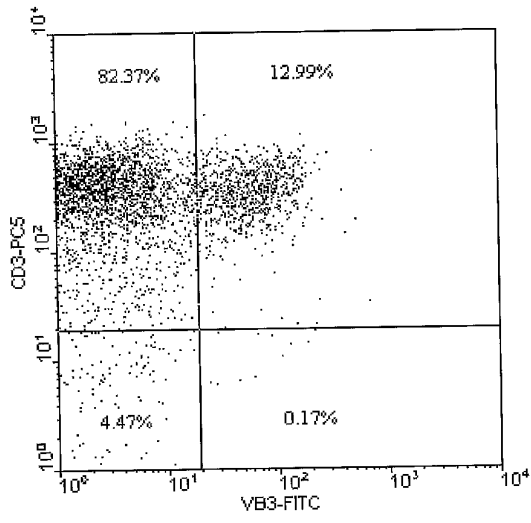
Figur 5



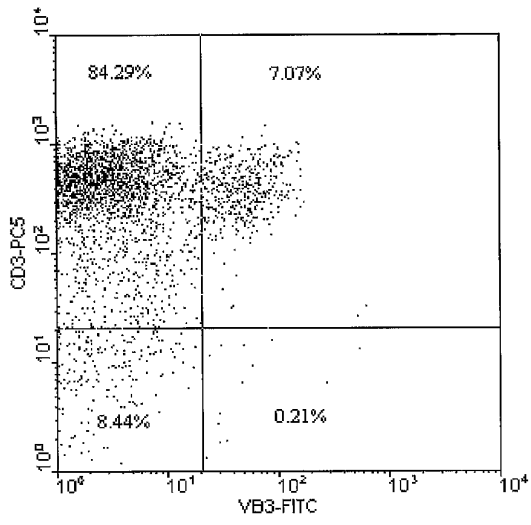
Figur 6



Figur 7



Figur 8

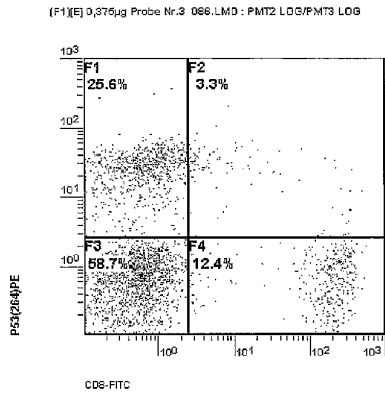


Figur 9

WO 02/070556

10/10

PCT/EP02/02186



Figur 10

WO 02/070556

1/7

PCT/EP02/02186

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Stanislawski, Thomas

<120> Polypeptide eines p53-Protein spezifischen, murinen
alpha/beta T-Zell Rezeptors, diese kodierende
Nukleinsäuren und deren Verwendung

<130> I30051PCT

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

```

Met Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg
 1          5          10          15

Asp Ala Gln Ala Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
 20          25          30

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
 35          40          45

Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
 50          55          60

Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 65          70          75          80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
 85          90          95

Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
100          105          110

Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
115          120          125

Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu
130          135          140

Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe
145          150          155          160

Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile
165          170          175

Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn
180          185          190

Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile
195          200          205

```

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

2/7

Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp
 210 215 220
 Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe
 225 230 235 240
 Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 245 250 255
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260 265

<210> 2
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

WO 02/070556 3/7 PCT/EP02/02186

225 230 235 240

Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr
245 250 255

Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260

<210> 3
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3
 Met Ser Cys Arg Leu Leu Leu Tyr Val Ser Leu Cys Leu Val Glu Thr
1 5 10 15

Ala Leu Met Asn Thr Lys Ile Thr Gln Ser Pro Arg Tyr Leu Ile Leu
20 25 30

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

Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Glu Lys Pro Pro Glu Leu Met
50 55 60

Phe Leu Tyr Asn Leu Lys Gln Leu Ile Arg Asn Glu Thr Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ile Pro Glu Cys Pro Asp Ser Ser Lys Leu Leu Leu His Ile
85 90 95

Ser Ala Val Asp Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser
100 105 110

Pro His Arg Gly Thr Met Leu Ser Ser Ser Asp Gln Gly His Asp
115 120 125

Ser Pro Ser
130

<210> 4
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4
 Met Ala Thr Arg Leu Leu Cys Tyr Thr Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Arg Ile Leu Asn Ser Lys Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys
20 25 30

Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His
35 40 45

Pro Val Val Phe Trp Tyr Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe
50 55 60

WO 02/070556

PCT/EP02/02186

4/7

Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr
 65 70 75 80
 Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu
 85 90 95
 Glu Ile Gln Ser Ser Glu Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Ser Leu Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val
 130 135 140
 Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala
 145 150 155 160
 Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
 165 170 175
 Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
 180 185 190
 Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
 195 200 205
 Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
 210 215 220
 Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu
 225 230 235 240
 Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly
 245 250 255
 Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu
 260 265 270
 Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr
 275 280 285
 Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Lys Lys
 290 295 300
 Asn Ser
 305

 <210> 5
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 5
 Met Ala Thr Arg Leu Leu Cys Tyr Thr Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Arg Ile Leu Asn Ser Lys Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys
 20 25 30
 Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His

WO 02/070556
 35 40 45
 PCT/EP02/02186

Pro Val Val Phe Trp Tyr Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe
 50 55 60

Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr
 65 70 75 80

Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu
 85 90 95

Glu Ile Gln Ser Ser Glu Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110

Ser Ser Leu Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr
 115 120 125

Arg Leu Thr Val Val Gly Leu Arg Leu Ser Tyr Ala Ser His His Ser
 130 135 140

Ser Leu Thr Ser Gln Cys Arg Ser Glu Cys Gly Thr Ser Glu Asp Leu
 145 150 155 160

Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala
 165 170 175

Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly
 180 185 190

Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu
 195 200 205

Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn
 210 215 220

Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp
 225 230 235 240

His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu
 245 250 255

Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln
 260 265 270

Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser
 275 280 285

Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile
 290 295 300

Ieu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val
 305 310 315 320

Val Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
 325 330

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

WO 02/070556	6/7	PCT/EP02/02186
<400> 6 ctctccagca accttctca		20
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 7 ggctcctttt ggcttgaaga		20
<210> 8 <211> 34 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 8 aggcgcgct tcaactggac cacagcctca gcgt		34
<210> 9 <211> 34 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 9 aggcgcgct tcaggaatty tttytytga ceat		34
<210> 10 <211> 19 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 10 ggatctcata gaggatggt		19
<210> 11 <211> 31 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 11 aggcgcgct ggccacttgt cctcctctga a		31
<210> 12 <211> 25 <212> DNA <213> Mus musculus		
<400> 12 agcatgccat ggtcctggcg ctctct		25
<210> 13 <211> 27 <212> DNA <213> Mus musculus		

WO 02/070556

7/7

PCT/EP02/02186

<400> 13
agcatgccat ggctacaagg ctctct

27

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 14
agcatgccat ggttctatgg ctgca

25

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat. application No. PCT/EP 02/02186
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 18129 A (SUNOL MOLECULAR CORP) 15 April 1999 (1999-04-15) siehe ganzes dok. besonders s.34,zeile 1-31 und ansprüche und beispiel 6, s.58	1-25
Y	THEOBALD M ET AL: "Targeting p53 as a general tumor antigen" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 92, December 1995 (1995-12), pages 11993-11997, XPO02131756 ISSN: 0027-8424 cited in the application siehe ganzes dokumant, besonders tab. 1, p.11996, 2.spalte, 2. abs. --- -/--	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority 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 principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 August 2002		Date of mailing of the international search report 16/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2200, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mueller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati	pplication No
PCT/EP	02/02186

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 23082 A (HERKEL JOHANNES ; COHEN IRUN R (IL); EREZ ALON NETA (IL); ROTTER VA) 27 April 2000 (2000-04-27) siehe ganzes dok. besonders ansprüche, p.10, 1.11.ff, beispiele 8,9,10 seite 38,39	1-25
A	THEOBALD M ET AL: "THE SEQUENCE ALTERATION ASSOCIATED WITH A MUTATIONAL HOTSPOT IN P53 PROTECTS CELLS FROM LYSIS BY CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES SPECIFIC FOR AFLANKING PEPTIDE EPITOPE" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 188, no. 6, 21 September 1998 (1998-09-21), pages 1017-1028. XP000925673 ISSN: 0022-1007 the whole document	
A	WO 93 24525 A (UNIV LEIDEN ; KAST WYBE MARTIN (NL); MELIEF CORNELIS JOSEPH MARIA) 9 December 1993 (1993-12-09) siehe ganzes dok. besonders ansprüche, zusammenfassung	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Internal	Application No	
Information on patent family members				PCT/EP	02/02186	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date		
WO 9918129	A	15-04-1999	AU	742650	B2	10-01-2002
			AU	9586998	A	27-04-1999
			CA	2305630	A1	15-04-1999
			CN	1279690	T	10-01-2001
			EP	1019439	A1	19-07-2000
			JP	2001519143	T	23-10-2001
			WO	9918129	A1	15-04-1999
WO 0023082	A	27-04-2000	EP	1150688	A1	07-11-2001
			WO	0023082	A1	27-04-2000
WO 9324525	A	09-12-1993	AT	183514	T	15-09-1999
			AU	681853	B2	11-09-1997
			AU	4359193	A	30-12-1993
			CA	2136624	A1	09-12-1993
			DE	69326064	D1	23-09-1999
			DE	69326064	T2	25-05-2000
			DK	643726	T3	20-03-2000
			EP	0643726	A1	22-03-1995
			ES	2139012	T3	01-02-2000
			GR	3031919	T3	31-03-2000
			JP	8501280	T	13-02-1996
			WO	9324525	A1	09-12-1993
			US	5679641	A	21-10-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internat	Aktenzeichen
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07K14/705 C07K16/18		PCT/EP 02/02186	
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK			
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K			
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen			
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH			
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
X	WO 99 18129 A (SUNOL MOLECULAR CORP) 15. April 1999 (1999-04-15) siehe ganzes dok. besonders s.34, zeile 1-31 und ansprüche und beispiel 6, s.58 ---	1-25	
Y	THEOBALD M ET AL: "Targeting p53 as a general tumor antigen" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, Bd. 92, Dezember 1995 (1995-12), Seiten 11993-11997, XP002131756 ISSN: 0027-8424 In der Anmeldung erwähnt siehe ganzes dokument, besonders tab. 1, p.11996, 2.spalte, 2. abs. --- -/--	1-25	
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
* Weitere Veröffentlichungen sind die Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		* Siehe Anhang Patentfamilie	
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausübung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und die der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist	
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
5. August 2002		16/08/2002	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2950, Tx. 31 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Mueller, F	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat.	Aktenzeichen
PCT/EP	02/02186

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WO 00 23082 A (HERKEL JOHANNES ;COHEN IRUN R (IL); EREZ ALON NETA (IL); RÖTTER VA) 27. April 2000 (2000-04-27) siehe ganzes dok. besonders ansprüche, p.10, 11. ff, beispiele 8,9,10 seite 38,39</p> <p>---</p>	1-25
A	<p>THEOBALD M ET AL: "THE SEQUENCE ALTERATION ASSOCIATED WITH A MUTATIONAL HOTSPOT IN P53PROTECTS CELLS FROM LYSIS BY CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES SPECIFIC FOR AFLANKING PEPTIDE EPITOPE" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, Bd. 188, Nr. 6, 21. September 1998 (1998-09-21), Seiten 1017-1028, XP000925673 ISSN: 0022-1067 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 93 24525 A (UNIV LEIDEN ;KAST WYBE MARTIN (NL); MELIEF CORNELIS JOSEPH MARIA ()) 9. Dezember 1993 (1993-12-09) siehe ganzes dok. besonders ansprüche, zusammenfassung</p> <p>---</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Internatio	Kennzeichen
Angaben zu Veröffentlichung, die zu dieser Patentfamilie gehören				PCT/EP	02/02186
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung		
WO 9918129	A	15-04-1999	AU 742650 B2	10-01-2002	
			AU 9586998 A	27-04-1999	
			CA 2305630 A1	15-04-1999	
			CN 1279690 T	10-01-2001	
			EP 1019439 A1	19-07-2000	
			JP 2001519143 T	23-10-2001	
			WO 9918129 A1	15-04-1999	
WO 0023082	A	27-04-2000	EP 1150688 A1	07-11-2001	
			WO 0023082 A1	27-04-2000	
WO 9324525	A	09-12-1993	AT 183514 T	15-09-1999	
			AU 681853 B2	11-09-1997	
			AU 4359193 A	30-12-1993	
			CA 2136624 A1	09-12-1993	
			DE 69326064 D1	23-09-1999	
			DE 69326064 T2	25-05-2000	
			DK 643726 T3	20-03-2000	
			EP 0643726 A1	22-03-1995	
			ES 2139012 T3	01-02-2000	
			GR 3031919 T3	31-03-2000	
			JP 8501280 T	13-02-1996	
			WO 9324525 A1	09-12-1993	
			US 5679641 A	21-10-1997	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68 Z	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00 B	
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ボス ホルゲル

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 8 インゲルヘイム イム ビーネンガルテン 2 3

(72) 発明者 テオバルト マティアス

ドイツ連邦共和国 5 5 2 5 2 マインツ - カシュテル レーメルシュトラッセ 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA63 CA04 CA07 CA20 DA03 EA02 HA11
 HA20
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ21 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89 QR32 QR35
 QR40 QR48 QR77 QS31
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA91Y AA94X AA94Y AC14 BA02 CA24 CA43 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 BA41 CA36
 DA40 MA01 NA14 ZA511 ZB021 ZB261 ZB271 ZC411 ZC412
 4C085 AA13 AA14 BB01 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 ZA51
 ZB02 ZB26 ZB27 ZC41
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA01 NA14 ZA51 ZB02 ZB26 ZB27
 ZC41

专利名称(译)	p53蛋白特异性鼠 α/β -T细胞受体的多肽，编码该多肽的核酸及其使用方法		
公开(公告)号	JP2004535780A	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2002569875	申请日	2002-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	林增益尼克斯AG		
申请(专利权)人(译)	Imugenikusu AG		
[标]发明人	シュタニスラーブスキートーマス シュミッツフランク ボスホルゲル テオバルトマティアス		
发明人	シュタニスラーブスキートーマス シュミッツフランク ボスホルゲル テオバルトマティアス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P7/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K14/705 C07K14/725 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P7/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K14/705 C07K14/7051 C07K14/70596 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395.N A61K48/00 A61P7/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.Z G01N33/53.D C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/HA11 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS31 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91Y 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/CA36 4C084/DA40 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA511 4C084/ZB021 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZB02 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC41 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA01 4C087/NA14 4C087/ZA51 4C087/ZB02 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZC41		
代理人(译)	福田康夫		
优先权	10109855 2001-03-01 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及介导p53蛋白特异性T细胞应答或其功能变体或部分的鼠 α/β T细胞受体的多肽或编码其的核酸，功能变体或部分。所述多肽使表达p53蛋白的细胞能够被提供有这些基因的T细胞识别，可以释放细胞因子，并且可以进行T细胞诱导的肿瘤或白血病细胞的裂解和/或凋亡。

標的細胞/エフェクター {T細胞}	pBullet	V α 3V β 3	V α 13V β 3
T2+FluM1	9	20	19
T2+p53.264-2 72	6	88	5
Saos-2	4	6	7
Saos-2/143	1	31	4