



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 34 912 T2** 2006.04.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 817 846 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 34 912.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/01689**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 912 393.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/030514**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.03.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **03.10.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.01.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **06.07.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.04.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12** (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

414417 **31.03.1995** **US**

(73) Patentinhaber:

University of Washington, Seattle, Wash., US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**CHEEVER, A., Martin, Mercer Island, US; DISIS, L.,
Mary, Renton, US**

(54) Bezeichnung: **INTRAZELLULARE DOMÄNE DES HER-2/NEU PROTEINS, FÜR DIE PREVENTION ODER BEHANDLUNG VON BÖSARTIGEN TUMOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung ist im allgemeinen auf Polypeptide und auf Nukleinsäuremoleküle, die für solche Polypeptide kodieren, gerichtet, zum Auslösen oder Verstärken einer Immunantwort auf HER-2/neu-Protein, einschließlich zur Verwendung bei der Behandlung von bösartigen Erkrankungen, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist,

Hintergrund der Erfindung

[0002] Trotz enormer Investitionen an finanziellen und humanen Mitteln bleibt Krebs eine der Haupttodesursachen. Zum Beispiel ist Krebs die führende Todesursache bei Frauen zwischen 35 und 74 Jahren. Brustkrebs ist die häufigste bösartige Erkrankung bei Frauen, und das Auftreten einer Entwicklung von Brustkrebs steigt an. Eine aus neun Frauen wird mit der Erkrankung diagnostiziert werden. Standardansätze, um Brustkrebs zu heilen, haben sich auf eine Kombination von Operation, Bestrahlung und Chemotherapie konzentriert. Diese Ansätze haben zu einigen dramatischen Erfolgen bei bestimmten bösartigen Erkrankungen geführt. Jedoch sind diese Ansätze nicht für alle bösartigen Erkrankungen erfolgreich gewesen, und Brustkrebs ist sehr häufig unheilbar beim Versuch, über ein bestimmtes Stadium hinaus zu behandeln. Alternative Ansätze zur Verhinderung und Therapie sind notwendig.

[0003] Eine häufige Eigenschaft von bösartigen Erkrankungen ist unkontrolliertes Zellwachstum. Krebszellen scheinen einen Prozeß der Transformation von einem normalen Phänotyp zu einem malignen Phänotyp durchlaufen zu haben, der zu autonomem Wachstum in der Lage ist. Amplifikation und Überexpression von somatischen Zellgenen wird als ein häufiges primäres Ereignis angesehen, das zur Transformation von normalen Zellen in maligne Zellen führt. Die malignen phänotypischen Eigenschaften, die durch die oncogenen Gene kodiert werden, werden während der Zellteilung auf die Nachkommenschaft der transformierten Zellen übertragen.

[0004] Die gegenwärtige Forschung, die sich mit Oncogenen beschäftigt, hat wenigstens 40 Oncogene identifiziert, die in malignen Zellen aktiv sind und für eine Transformation verantwortlich oder damit assoziiert sind. Oncogene sind in verschiedene Gruppe klassifiziert worden, basierend auf der vermeintlichen Funktion oder Lage ihrer Genprodukte (wie etwa des Proteins, das durch das Oncogen exprimiert wird).

[0005] Oncogene werden als essentiell für bestimmte Aspekte der normalen zellulären Physiologie angesehen. In dieser Hinsicht ist das HER-2/neu-Oncogen ein Mitglied der Tyrosin-Protein-Kinase-Familie der Oncogene und hat einen hohen Grad an Homologie mit dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor. HER-2/neu spielt vermutlich eine Rolle beim Zellwachstum und/oder Differenzierung. HER-2/neu scheint bösartige Erkrankungen durch quantitative Mechanismen zu induzieren, die aus einer erhöhten oder deregulierten Expression eines im wesentlichen normalen Genprodukts resultieren.

[0006] HER-2/neu (p185) ist das Proteinprodukt des HER-2/neu-Oncogens. Das HER-2/neu-Gen wird amplifiziert, und das HER-2/neu-Protein wird überexprimiert in einer Vielzahl von Krebsen, einschließlich Brust-, Ovarial-, Colon-, Lungen- und Prostatakrebs. HER-2/neu steht mit maligner Transformation in Beziehung. Es wird in 50%–60% von in-situ-Duktuskarzinomen und 20%–40% aller Brustkrebse gefunden, ebenso wie einem substantiellen Bruchteil an Adenokarzinomen, die in den Eierstöcken, Prostata, Colon und Lunge entstehen. HER-2/neu ist nicht nur mit dem malignen Phänotyp innig assoziiert, sondern auch mit der Aggressivität der malignen Erkrankung, indem es in einem Viertel aller invasiven Brustkrebse gefunden wird. HER-2/neu-Überexpression steht mit einer schlechten Prognose bei sowohl Brust- als auch Ovarialkrebs in Beziehung. HER-2/neu ist ein Transmembranprotein mit einer relativen molekularen Masse von 185 kd, das näherungsweise 1255 Aminosäuren (aa) lang ist. Es hat eine extrazelluläre Bindungsdomäne (ECD) mit näherungsweise 645 aa, mit 40% Homologie mit dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), einer stark hydrophoben Transmembranankerdomäne (TMD), und einer carboxyterminalen cytoplasmatischen Domäne (CD) von näherungsweise 580 aa mit 80% Homologie mit EGFR. Disis et al. (Cancer Res 54, 16–20, 1994) berichtet über eine HER-2/neu-Immunität in Patienten mit Brustkrebsen.

[0007] Aufgrund der Schwierigkeiten bei den gegenwärtigen Ansätzen für eine Therapie von Krebsen, bei denen das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist, gibt es einen Bedarf auf dem Gebiet für verbesserte Verbindungen und Zusammensetzungen. Die vorliegende Erfindung erfüllt diesen Bedarf und stellt darüber hinaus andere verwandte Vorteile bereit.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Kurz gesagt, stellt die vorliegende Erfindung Polypeptide, Nukleinsäuremoleküle (die die Expression solcher Polypeptide steuern) und virale Vektoren (die die Expression solcher Polypeptide steuern) zur Verwendung für die Immunisierung oder zur Herstellung eines Medikaments für die Immunisierung eines warmblütigen Tieres gegen eine bösartige Erkrankung bereit, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist. Ein Polypeptid oder Nukleinsäuremolekül entsprechend dieser Erfindung kann in einer Zusammensetzung vorliegen, die einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Verdünnungsmittel einschließt. Ein solches Polypeptid, Nukleinsäuremolekül, viraler Vektor oder pharmazeutische Zusammensetzung kann für die Immunisierung auf einer Einmalbasis (z.B. wenn eine bösartige Erkrankung vermutet wird) oder auf einer periodischen Basis verwendet werden (z.B. für ein Individuum mit einem erhöhten Risiko, eine bösartige Erkrankung zu erwerben oder erneut zu erwerben). Ein Medikament für die Immunisierung kann bei der Behandlung eines existierenden Tumors nützlich sein oder um ein Auftreten oder erneutes Auftreten eines Tumors zu verhindern.

[0009] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Polypeptid bereit, das durch eine DNA-Sequenz der Nukleotide 2026 bis 3765 von SEQ ID NO: 1 kodiert wird, bereit, wobei die DNA-Sequenz für ein Polypeptid kodiert, das eine Immunantwort auf HER-2/neu-Protein erzeugt. In einer bevorzugten Ausführungsform hat ein Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Lysin, Aminosäure 676, bis Valin, Aminosäure 1255, oder eine Variante davon, die wenigstens eine äquivalente Immunantwort erzeugt. Eine Zusammensetzung wird bereitgestellt, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Verdünnungsmittel umfaßt.

[0010] In einer anderen Ausführungsform wird ein Polypeptid oder eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung für die Immunisierung eines warmblütigen Tieres gegen eine bösartige Erkrankung bereitgestellt, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist. In einer anderen Ausführungsform wird ein solches Polypeptid oder Zusammensetzung für die Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines warmblütigen Tieres gegen eine bösartige Erkrankung verwendet, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist.

[0011] In einer anderen Ausführungsform wird ein Nukleinsäuremolekül, das die Expression eines Polypeptids gemäß der vorliegenden Erfindung steuert, für die Immunisierung durch Transfizieren der Zellen eines warmblütigen Tieres mit dem Nukleinsäuremolekül bereitgestellt. In einer anderen Ausführungsform wird ein solches Nukleinsäuremolekül für die Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines warmblütigen Tieres gegen eine bösartige Erkrankung verwendet, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist.

[0012] In einer anderen Ausführungsform wird ein viraler Vektor, der die Expression eines Polypeptids gemäß der vorliegenden Erfindung steuert, für die Immunisierung durch Infizieren der Zellen eines warmblütigen Tieres mit dem Vektor bereitgestellt. In einer anderen Ausführungsform wird ein solcher viraler Vektor für die Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines warmblütigen Tiers gegen eine bösartige Erkrankung verwendet, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist.

[0013] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden unter Bezugnahme auf die folgende detaillierte Beschreibung und die angehängten Zeichnungen deutlich werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0014] **Fig. 1** zeigt die Ergebnisse des Priming von naiven T-Lymphocyten auf HER-2/neu-Polypeptid durch dendritische Zellen. Aus Knochenmark stammende DC wurden mit GM-CSF und IL6 aus CD34+-Stammzellen erzeugt. DC, die mit HER-2/neu-Polypeptid gepulst wurden, induzierten eine Protein-spezifische Proliferation von autologen CD4+/CD45RA+-T-Lymphocyten nach 7 Tagen der Kultivierung von T-Zellen mit DC. Aus Knochenmark stammende CD34+-Stammzellen, die für eine Woche in serumfreiem Medium, enthaltend GM-CSF und IL-6, kultiviert wurden, wurden als APC verwendet. APC wurde in 96-Napf-Rundbodenplatten (Corning, Corning, NY, USA) in verschiedenen Konzentrationen ausplattiert und für 16–18 Stunden mit 20–25 µg/ml rekombinantem HER-2/neu-Polypeptid inkubiert. CD4+-T-Lymphocyten wurden aus autologen peripheren mononukleären Blutzellen durch positive Auswahl unter Verwendung von Immunaффinitätsäulen (CellPro, Incl., Bothell, WA, USA) isoliert. Antigen-gepulste APC wurden bestrahlt (10 Gy), und CD4+-T-Lymphocyten wurden in 10⁵ pro Napf zugegeben. Eine proliferative Antwort der T-Zellen wurde anhand der Aufnahme von (³H)-Thymidin (1 µCi/Napf) gemessen, das am Tag 7 für 16–18 Stunden zugegeben wurde. Proliferationsassays wurden in Serum-und-Cytokin-freiem Medium in 5-Napf-Replikaten durchgeführt. Die Symbole stellen dar: -- DC + HER-2/neu-Polypeptid + CD4+/CD45RA+-T-Zellen; -o- DC + CD4 +/CD45RA+ -T-Zellen; und -□- DC + HER-2/neu-Polypeptid.

[0015] [Fig. 2](#) zeigt die Antwort von CD4+-Zellen auf HER-2/neu-Polypeptid. Unter Verwendung des Priming-Assay, der für [Fig. 1](#) beschrieben wird, wurden CD4+-T-Zellen aus normalen Spendern auf Antworten auf humanes rekombinantes HER-2/neu-Polypeptid getestet. Die Symbole bedeuten; --■-- SC+CD4; und ...◆... SC+CD4+HER-2/neu-Polypeptid. SC" bedeutet Stammzellen.

[0016] [Fig. 3](#) zeigt, daß Ratten, die mit Ratten-HER-2/neu-Polypeptid immunisiert werden, Ratten-neu-spezifische Antikörper entwickeln. Ratten wurden mit rekombinantem Ratten-HER-2/neu-Polypeptid, 25 µg in MPL oder Vaccel-Adjuvans, immunisiert. Drei Immunisierungen wurden verabreicht, jeweils für 20 Tage getrennt. 20 Tage nach der letzten Immunisierung wurden Ratten auf Antikörperantworten gegenüber Ratten-neu getestet. Tiere, die mit Ratten-HER-2/neu-Polypeptid und dem Vaccel-Adjuvans immunisiert wurden, zeigten hochtitrige-Ratten-neu-spezifische Antworten. Die Kontrolle war ein Tier, das mit humanem HER-2/neu-Polypeptid (Fremdprotein) immunisiert worden war. In getrennten Experimenten entwickelten Ratten, die mit 100 µg und 300 µg an aufgereinigtem ganzem Ratten-neu immunisiert worden waren, keine nachweisbaren neu-spezifischen Antikörper (Daten nicht gezeigt). Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 Tieren. Die Symbole bedeuten: --■-- Ratten-HER-2/neu-Polypeptid/MPL; ...•... Ratten-HER-2/neu-Polypeptid/Vaccel; ---□--- MPL alleine; ---○--- Vaccel alleine; und ---⊕--- Kontrolle. „MPL" und „Vaccel" sind Adjuvantien (Ribi, Bozeman, MT, USA). „Neu" ist HER-2/neu-Protein.

[0017] [Fig. 4](#) zeigt, daß Brustkrebspatienten eine präexistente Resistenz gegenüber HER-2/neu-Polypeptid haben. Patienten-PBMC wurde anhand von tritiiertem Thymidineinbau in 24-Napf-Replikaten bewertet. Näpfe, die eine Antwort zeigten, werden als größer als der Mittelwert und 3 Standardabweichungen (372 cpm) der Kontrollnäpfe bewertet. Dieser HER-2/neu-positive, Stadium-II-Brustkrebspatient hat eine signifikante Antwort auf rekombinantes humanes HER-2/neu-Polypeptid. Die Symbole „p" stellen Peptide für HER-2/neu-Protein dar, „tt" stellt Tetanustoxoid dar, und „hHNP" stellt rekombinantes humanes HER-2/neu-Polypeptid dar.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0018] Vor Darstellung der Erfindung ist es möglicherweise für das Verständnis hilfreich, Definitionen bestimmter hiernach zu verwendender Begriffe darzulegen.

[0019] HER-2/neu-Polypeptid wie hierin verwendet, bezieht sich auf einen Teil des HER-2/neu-Proteins (das Protein, das ebenfalls als p185 oder als c-erbB2 bekannt ist) mit der Aminosäuresequenz von SED ID NO: 2 von Lysin, Aminosäure 676, bis Valin, Aminosäure 1255; und kann natürlichen Ursprungs, synthetisch hergestellt, gentechnisch hergestellt oder eine funktionelle äquivalente Variante davon sein, z.B. bei der eine oder mehrere Aminosäuren durch eine andere Aminosäure (andere Aminosäuren) oder Nicht-Aminosäure(n) ersetzt ist, die nicht wesentlich das Hervorrufen oder die Verstärkung einer Immunantwort auf HER-2/neu-Protein beeinträchtigen (z.B. eine Variante stimuliert eine Antwort durch Helfer-T-Zellen oder cytotoxischen T-Zellen).

[0020] Proliferation von T-Zellen – wie hierin verwendet, schließt die Multiplikation von T-Zellen ebenso wie die Stimulation von T-Zellen, die zur Multiplikation führt, ein, d.h. die Initiierung von Ereignissen, die zu Mitose führen, und der Mitose selbst. Verfahren zum Nachweis der Proliferation von T-Zellen werden unten diskutiert.

[0021] Wie oben bemerkt, ist die vorliegende Erfindung auf Verbindungen und Zusammensetzungen gerichtet, um die Immunität gegenüber dem Proteinprodukt, das durch das HER-2/neu-Oncogen exprimiert wird, hervorzurufen oder zu verstärken, einschließlich für bösartige Erkrankungen in einem warmblütigen Tier, bei der ein amplifiziertes HER-2/neu-Gen mit den bösartigen Erkrankungen assoziiert ist. Eine Assoziation eines amplifizierten HER-2/neu-Gens mit einer bösartigen Erkrankung erfordert nicht, daß das Proteinexpressionsprodukt des Gens auf dem Tumor vorhanden ist. Zum Beispiel kann eine Überexpression des Proteinexpressionsprodukts bei der Initiierung eines Tumors beteiligt sein, aber die Proteinexpression kann im folgenden verloren gehen. Eine Verwendung der vorliegenden Erfindung ist es, eine effektive autochthone Immunantwort hervorzurufen oder zu verstärken, um einen HER-2/neu-positiven Tumor in einen HER-2/neu-negativen umzuwandeln.

[0022] Genauer zeigt die Offenbarung der vorliegenden Erfindung in einem Aspekt, daß ein Polypeptid, basierend auf einem bestimmten Teil (HER-2/neu-Polypeptid) des Proteinexpressionsprodukts des HER-2/neu-Gens, von Thymus-abhängigen Lymphocyten (hiernach „T-Zellen") erkannt werden kann, und deshalb kann die autochthone Immun-T-Zellantwort prophylaktisch verwendet werden oder um bösartige Erkrankungen zu behandeln, bei denen ein solches Protein überexprimiert wird oder worden ist. Die Offenbarung der vorliegenden Erfindung zeigt ebenso in einem anderen Aspekt, daß Nukleinsäuremoleküle, die die Expression eines solchen Peptids steuern, alleine oder in einem viralen Vektor für die Immunisierung verwendet werden

können.

[0023] Im allgemeinen wird davon ausgegangen, daß CD4+-T-Zell-Population als Helfer/Inducer durch die Freisetzung von Lymphokinen bei Stimulation durch ein spezifisches Antigen funktionieren; jedoch kann eine Teilmenge der CD4+-Zellen als cytotoxische T-Lymphocyten (CTL) fungieren. In ähnlicher Weise wird davon ausgegangen, daß CD8+-T-Zellen so funktionieren, daß sie direkt antigene Ziele lysieren; jedoch können sie unter einer Vielzahl von Umständen Lymphokine sezernieren, um eine Helfer- oder DTH-Funktion bereitzustellen. Trotz des Potentials einer überlappenden Funktion sind die phänotypischen CD4- und CD8-Marker mit der Erkennung von Peptiden verknüpft, die an Klasse II- oder Klasse I-MHC-Antigene gebunden sind. Die Erkennung eines Antigens im Kontext von Klasse II- oder Klasse I-MHC erfordert, daß CD4+ und CD8+-T-Zellen auf unterschiedliche Antigene oder das selbe Antigen, präsentiert unter verschiedenen Umständen, antworten. Die Bindung von immunogenen Peptiden an Klasse-II-MHC-Antigene findet am häufigsten für Antigene statt, die durch Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen worden sind. Deshalb erkennen CD4+-T-Zellen im allgemeinen Antigene, die außerhalb von Tumorzellen gewesen sind. Im Gegensatz dazu findet unter normalen Umständen eine Bindung von Peptiden an Klasse-I-MHC nur für Proteine statt, die im Cytosol vorliegen und durch das Ziel selbst synthetisiert werden, Proteine in der äußeren Umgebung sind ausgeschlossen. Eine Ausnahme hierzu ist die Bindung von exogenen Peptiden mit einem genauen Klasse-I-Bindungsmotiv, die außerhalb der Zelle in hoher Konzentration vorliegen. Daher haben CD4+- und CD8+-T-Zellen in breiter Weise unterschiedliche Funktionen und tendieren dazu, unterschiedliche Antigene zu erkennen, als eine Reflexion davon, wo die Antigene normalerweise vorliegen.

[0024] Wie in der vorliegenden Erfindung offenbart, wird ein Polypeptid-Teil des Proteinprodukts, das durch das HER-2/neu-Oncogen exprimiert wird, von T-Zellen erkannt. Zirkulierendes HER-2/neu-Polypeptid wird in Peptid-Fragmente abgebaut. Peptid-Fragmente aus dem Polypeptid binden an Haupthistocompatibilitätskomplex(MHC)-Antigene. Durch ein Präsentieren eines an das MHC-Antigen gebundenen Peptids auf der Zelloberfläche und Erkennung durch Wirt-T-Zellen der Kombination von Peptid plus Selbst-MHC-Antigen wird ein HER-2/neu-Polypeptid (einschließlich demjenigen, das auf einer malignen Zelle exprimiert wird) gegenüber T-Zellen immunogen. Die ausgewählte Spezifität des T-Zellrezeptors ermöglicht es einzelnen T-Zellen, zwischen Peptiden zu unterscheiden, die sich nur durch einen einzelnen Aminosäurerest unterscheiden.

[0025] Während der Immunantwort auf ein Peptidfragment des Polypeptids werden T-Zellen, die einen T-Zellrezeptor mit hoher Affinitätsbindung des Peptid-MHC-Komplexes exprimieren, an den Peptid-MHC-Komplex binden und werden dadurch aktiviert und zur Proliferation induziert. Beim ersten Zusammentreffen mit einem Peptid wird eine kleine Anzahl von Immun-T-Zellen Lymphokine sezernieren, proliferieren und sich in Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen differenzieren. Die Haupt-Immunantwort wird in vivo stattfinden, ist aber schwierig in vitro nachzuweisen gewesen. Ein darauffolgendes Zusammentreffen mit dem selben Antigen durch die Gedächtnis-T-Zelle wird zu einer schnelleren und intensiveren Immunantwort führen. Die sekundäre Antwort wird entweder in vivo oder in vitro stattfinden. Die In-vitro-Antwort ist in leichter Weise quantifizierbar durch Messung des Grads an Proliferation, des Grads an Cytokin-Herstellung oder der Erzeugung einer cytolytischen Aktivität der T-Zell-Population, die in dem Antigen erneut ausgestellt wird. Eine substantielle Proliferation der T-Zell-Population in Antwort auf ein bestimmtes Antigen wird als ein Indikator für eine frühere Konfrontation oder ein Priming gegenüber dem Antigen angesehen.

[0026] Die Verbindungen dieser Erfindung umfassen im allgemeinen HER-2/neu-Polypeptide oder DNA-Moleküle, die die Expression solcher Peptide steuern, wobei die DNA-Moleküle in einem viralen Vektor vorliegen. Wie oben bemerkt, schließen die Polypeptide der vorliegenden Erfindung Varianten des Polypeptids von SEQ ID NO: 2 von Aminosäure 676 bis Aminosäure 1255 ein, die die Fähigkeit beibehalten, eine Immunantwort zu stimulieren. Solche Varianten schließen verschiedene strukturelle Formen des nativen Polypeptids ein. Aufgrund der Anwesenheit von ionisierbaren Amino- und Carboxylgruppen kann z.B. ein HER-2/neu-Polypeptid in der Form eines sauren oder basischen Salzes sein oder kann in neutraler Form sein. Einzelne Aminosäurereste können ebenso durch Oxidation oder Reduktion modifiziert sein.

[0027] Varianten innerhalb des Umfangs dieser Erfindung schließen ebenso Polypeptide ein, bei denen die primäre Aminosäurestruktur von nativem HER-2/neu-Polypeptid durch Bildung von kovalenten oder aggregativen Konjugaten mit anderen Peptiden oder Polypeptiden oder mit chemischen Gruppen wie etwa Glycosylgruppen, Lipiden, Phosphat, Acetyl-Gruppen und Ähnlichem modifiziert ist. Kovalente Derivate können z.B. hergestellt werden durch Verknüpfen bestimmter funktioneller Gruppen an Aminosäureseitenketten oder an den N- oder C-Terminus.

[0028] Die vorliegende Erfindung schließt ebenfalls HER-2/neu-Polypeptide mit oder ohne Glycosylierung

ein. Polypeptide, die in Hefe oder Säugetierexpressionssystemen exprimiert werden, können hinsichtlich des Molekulargewichts und des Glycosylierungsmusters nativen Molekülen ähnlich oder geringfügig unterschiedlich sein, abhängig von dem Expressionssystem. Zum Beispiel liefert eine Expression von DNA-kodierenden Polypeptiden in Bakterien, wie etwa *E. coli*, typischerweise nicht-glycosylierte Moleküle. N-Glycosylierungsstellen von eukaryotischen Proteinen sind durch das Aminosäuretripllett Asn-A₁-Z charakterisiert, wobei A₁ eine beliebige Aminosäure außer Pro ist, und Z Ser oder Thr ist. Varianten von HER-2/neu-Polypeptiden mit inaktivierten N-Glycosylierungsstellen können mit Techniken produziert werden, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, wie etwa Oligonukleotid-Synthese und Ligation oder ortsspezifische Mutagenesetechniken, und liegen innerhalb des Umfangs dieser Erfindung. Alternativ können N-verknüpfte Glycosylierungsstellen an ein HER-2/neu-Polypeptid angehängt werden.

[0029] Die Polypeptide dieser Erfindung schließen ebenso Varianten des SEQ ID NO: 2-Polypeptids (d.h. Varianten eines Polypeptids mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Aminosäure 676 bis Aminosäure 1255) ein, die eine Aminosäuresequenz haben, die sich von dieser Sequenz wegen einer oder mehrerer Deletionen, Insertionen, Substitutionen oder anderen Modifikationen unterscheiden. In einer Ausführungsform sind solche Varianten im wesentlichen homolog zu dem nativen HER-2/neu-Polypeptid und behalten die Fähigkeit bei, eine Immunantwort zu stimulieren. Eine „wesentliche Homologie“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf Aminosäuresequenzen, die durch DNA-Sequenzen kodiert werden, die in der Lage sind, unter moderat stringenten Bedingungen an eine Nukleotid-Sequenz zu hybridisieren, die mit einer natürlich vorkommenden DNA-Sequenz komplementär ist, die für den spezifizierten Polypeptid-Teil von SEQ ID NO: 2 hierin kodiert (d.h. Nukleotide 2026 bis 3765 von SEQ ID NO: 1). Geeignet moderat stringente Bedingungen schließen ein Vor-Waschen in einer Lösung von 5 × SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); Hybridisieren bei 50°C–65°C, 5 × SSC, über Nacht; gefolgt von zweimaligem Waschen bei 65°C für 20 Minuten mit jeweils 2 ×, 0,5 × und 0,2 × SSC (enthaltend 0,1% SDS) ein. Solche hybridisierenden DNA-Sequenzen sind ebenso innerhalb des Umfangs dieser Erfindung. Der Effekt von irgendwelchen solchen Modifikationen auf die Fähigkeit eines HER-2/neu-Polypeptids, eine Immunantwort zu erzeugen, kann in leichter Weise bestimmt werden (z.B. durch Analysieren der Fähigkeit des mutierten HER-2/neu-Polypeptids, eine T-Zell-Antwort zu induzieren, unter Verwendung von z.B. den hierin beschriebenen Verfahren).

[0030] Im allgemeinen können Aminosäuresubstitutionen in einer Vielzahl von Arten durchgeführt werden, um andere Ausführungsformen von Varianten innerhalb der vorliegenden Erfindung bereitzustellen. Als erstes können z.B. Aminosäuresubstitutionen konservativ gemacht werden; d.h. eine Austauschaminosäure ersetzt eine Aminosäure, die ähnliche Eigenschaften hat, so daß ein Fachmann der Peptidchemie erwarten würde, daß die Sekundärstruktur und Hydrophathie-Eigenschaften des Polypeptids im wesentlichen unverändert bleiben. In allgemeinen stellen die folgenden Gruppen von Aminosäuren konservative Veränderungen dar; (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; und (5) phe, tyr, trp, his. Ein Beispiel einer nicht-konservativen Veränderung ist das Ersetzen einer Aminosäure einer Gruppe mit einer Aminosäure von einer anderen Gruppe.

[0031] Eine weitere Art, um Aminosäuresubstitutionen durchzuführen, um Varianten der vorliegenden Erfindung zu erzeugen, ist es, Aminosäuren in T-Zellmotiven mit einem Potential, an Klasse-II-MHC-Moleküle (für eine CD4+-T-Zellenantwort) oder an Klasse-I-MHC-Moleküle (für eine CD8+-T-Zellenantwort) zu binden, zu identifizieren und zu ersetzen. Peptidsegmente (eines HER-2/neu-Polypeptids) mit einem Motiv mit einem theoretischen Potential, an Klasse-II-MHC-Moleküle zu binden, können mittels Computeranalyse identifiziert werden. Zum Beispiel kann ein Proteinsequenzanalysepaket, T Sites, das verschiedene Computeralgorithmen eingebaut hat, die darauf angelegt sind, potentielle Stellen für die T-Zell-Erkennung zu unterscheiden, verwendet werden (Feller and de la Cruz, *Nature* 349: 720–721, 1991). Zwei Suchalgorithmen werden verwendet: (1) der AMPHI-Algorithmus beschrieben von Margalit (Feller and de la Cruz, *Nature* 349: 720–721, 1991; Margalit et al., *J. Immunol.* 138: 2213–2229, 1987) identifiziert Epitopmotive entsprechend einer alpha-helicalen Periodizität und Amphipathizität; (2) der Rothbard- und Taylor-Algorithmus identifiziert Epitopmotive entsprechend dem Ladungs- und Polaritätsmuster (Rothbard and Taylor, *EMBO* 7: 93–100, 1988). Segmente mit beiden Motiven sind am geeignetsten für die Bindung an Klasse-II-MHC-Moleküle. CD8+-T-Zellen erkennen Peptide, gebunden an Klasse-I-MHC-Moleküle. Falk et al. haben herausgefunden, daß Peptide, die an bestimmte MHC-Moleküle binden, unterscheidbare Sequenzmotive gemeinsam haben (Falk et al., *Nature* 351: 290–296, 1991). Ein Peptidmotiv für die Bindung in der Furche von HLA-A2.1 ist mittels Edmann-Abbau von Peptiden definiert worden, die von HLA-A2.1-Molekülen einer kultivierten Zelllinie (Tabelle 2 von Falk et al., oben) gestreift worden sind („stripped“). Das Verfahren identifizierte das typische oder durchschnittliche HLA-A2.1 Bindungspeptid dahingehend, daß es 9 Aminosäuren lang ist, wobei dominante Ankerreste an den Positionen 2 (L) und 9 (V) auftreten. Häufig vorkommende starke Bindungsreste sind an Positionen 2 (M), 4 (E, K), 6 (V) und 8 (K) identifiziert worden. Das identifizierte Motiv stellt den Durchschnitt von vielen Bindungspeptiden dar.

Das HLA-A2.1-beschränkte Motiv

	Aminosäureposition	Punktzuordnung
	1 2 3 4 5 6 7 8 9	
Dominanter Bindungsankerrest	L V	+3
Starker Bindungsrest	M E V K K	+2
Schwacher Bindungsrest	I A G I I A E L L Y P K L Y S F F D Y T H K P T N M M G Y S V H	+1

[0032] Das abgeleitete Peptidmotiv, wie gegenwärtig definiert, ist nicht besonders stringent. Einige HLA-A2.1-Bindungspeptide enthalten nicht beide dominanten Ankerreste und die Aminosäuren, die die dominanten Ankerreste flankieren, spielen wesentliche Rollen beim Ermöglichen oder Verhindern einer Bindung. Nicht jedes Peptid mit dem gegenwärtig beschriebenen Bindungsmotiv wird binden, und einige Peptide ohne das Motiv werden ebenfalls binden. Jedoch ist das gegenwärtige Motiv genügend gültig, um eine Identifizierung von einigen Peptiden zu ermöglichen, die zur Bindung in der Lage sind. Man beachte, daß das das gegenwärtige HLA-A2.1-Motiv 6 Aminosäuren zwischen die dominanten Anker-Aminosäuren an Resten 2 und 9 plaziert.

[0033] Nach der Identifizierung von Peptidmotiven innerhalb eines HER-2/neu-Polypeptids können Aminosäuresubstitutionen konservativ oder nicht-konservativ durchgeführt werden. Der letztere Typ an Substitutionen soll ein verbessertes Polypeptid erzeugen, das potenter und/oder in breiterer Weise kreuzreaktiv ist (MHC-Polymorphismus). Ein Beispiel für ein potenteres Polypeptid ist eines, das mit höherer Affinität an dasselbe MHC-Molekül wie ein natürliches Polypeptid bindet, ohne ein Erkennen durch T-Zellen, die für natürliches Polypeptid spezifisch sind, zu beeinträchtigen. Ein Beispiel für ein Polypeptid mit einer breiteren Kreuzreaktivität ist eines, das in breiterer Weise kreuzreaktive Immunantworten induziert, (d.h. an eine größere Vielzahl von MHC-Molekülen bindet) als das natürliche Polypeptid. In ähnlicher Weise können ein oder mehrere Aminosäuren, die zwischen Peptidmotiven liegen und eine Spacer-Funktion haben (die z.B. nicht mit einem MHC-Molekül oder einem T-Zellrezeptor Wechselwirken) konservativ oder nicht-konservativ substituiert werden. Es wird Fachleuten offensichtlich sein, daß Polypeptide, die ein oder mehrere Aminosäuresubstitutionen enthalten, auf vorteilhafte oder nachteilhafte immunologische Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Assays getestet werden können, einschließlich denjenigen, die hierin im Hinblick auf die Fähigkeit zur Stimulation der T-Zellerkennung beschrieben sind.

[0034] Varianten innerhalb des Umfangs dieser Erfindung können ebenso oder alternativ andere Modifikationen enthalten, einschließlich der Deletion oder Addition von Aminosäuren, die einen minimalen Einfluß auf die erwünschten immunologischen Eigenschaften des Polypeptids haben. Es wird von Fachleuten erkannt werden, daß trunkierte Formen oder nicht-native verlängerte Formen eines HER-2/neu-Polypeptids verwendet werden können, vorausgesetzt, daß die erwünschten immunologischen Eigenschaften wenigstens grob äquivalent mit denjenigen eines nativen HER-2/neu-Polypeptids voller Länge sind. Cysteinreste können deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt werden, um eine Bildung von unkorrekten intramolekularen Disulfidbrücken bei der Renaturierung zu verhindern. Andere Ansätze für eine Mutagenese beinhalten die Modifizierung von angrenzenden dibasischen Aminosäureresten, um eine Expression in Hefesystemen zu verbessern, bei denen eine KEX2-Proteaseaktivität vorhanden ist.

[0035] Eine HER-2/neu-Polypeptid kann im allgemeinen unter Verwendung eines genomischen oder cDNA-Klons erhalten werden, der für das Protein kodiert. Eine genomische Sequenz, die für HER-2/neu in voller Länge kodiert, wird in SEQ ID NO: 1 gezeigt, und die abgeleitete Aminosäuresequenz wird in SEQ ID NO: 2 dargestellt. Solche Klone können durch Screenen einer geeigneten Expressionsbibliothek auf Klone isoliert werden, die HER-2/neu-Protein exprimieren. Die Bibliotheksherstellung und der Screen können im allgemeinen mit Verfahren durchgeführt werden, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, wie etwa Verfahren, beschrieben in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. Kurz gesagt, kann eine Bakteriophagenexpressionsbibliothek ausplattiert und auf Filter übertragen werden. Die Filter können dann mit einem Nachweisreagenz inkubiert werden. Im Kontext dieser Erfindung ist ein „Nachweisreagenz“ eine beliebige Verbindung, die in der Lage ist, an ein HER-2/neu-Protein zu binden, die dann mit einer Vielzahl von Mitteln nachgewiesen werden kann, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind. Typische Nachweisreagenzien enthalten ein „Bindungsmittel“, wie etwa Protein A, Protein G, IgG oder ein Lectin, das an eine Reportergruppe gekoppelt ist. Bevorzugte Reportergruppen schließen Enzyme, Substrate, Co-Factoren, Inhibitoren, Farbstoffe, Radionuklide, lumineszente Gruppen, fluoreszierende Gruppen und Biotin ein. Bevorzugter ist die Reportergruppe Meerettichperoxidase, die durch Inkubation mit einem Substrat nachgewiesen werden kann, wie etwa Tetramethylbenzidin oder 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure. Plaques, enthaltend genomische oder cDNA-Sequenzen, die HER-2/neu Protein exprimieren, werden mit Techniken isoliert und aufgereinigt, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind. Geeignete Verfahren können zum Beispiel in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 gefunden werden.

[0036] Varianten des Polypeptids, die die Fähigkeit beibehalten, eine Immunantwort zu stimulieren, können im allgemeinen durch Modifizieren der Sequenz in einem oder mehreren der oben beschriebenen Aspekte und durch Testen des resultierenden Polypeptids auf die Fähigkeit zur Stimulation einer Immunantwort, z.B. einer T-Zell-Antwort, identifiziert werden. Zum Beispiel können solche Assays im allgemeinen durchgeführt werden durch In-Kontakt-Bringen von T-Zellen mit dem modifizierten Polypeptid und durch Testen der Antwort. Natürlich vorkommende Varianten des Polypeptids können ebenso z.B. durch Screenen einer geeigneten cDNA- oder genomischen Bibliothek mit einer DNA-Sequenz isoliert werden, die für das Polypeptid oder eine Variante davon kodiert.

[0037] Die oben beschriebenen Sequenzmodifikationen können unter Verwendung von rekombinanten Standardtechniken oder mittels automatisierter Synthese des modifizierten Polypeptids eingeführt werden. Zum Beispiel können Mutationen an bestimmten Loci durch Synthetisieren von Oligonukleotiden eingeführt werden, die eine mutante Sequenz enthalten, flankiert von Restriktionsstellen, die eine Ligation an Fragmente der nativen Sequenz ermöglichen. Nach der Ligation kodiert die resultierende rekonstruierte Sequenz für ein Analog mit der erwünschten Aminosäureinsertion, -substitution oder -deletion.

[0038] Alternativ können Oligonukleotid-gesteuerte, ortsspezifische MutageneseprozEDUREN verwendet werden, um ein Gen bereitzustellen, bei dem bestimmte Codons entsprechend der erforderlichen Substitution, Deletion oder Insertion verändert sind. Beispielhafte Methoden zum Durchführen der oben dargestellten Veränderungen werden offenbart von Walder et al., *Gene* 42: 133, 1986; Bauer et al., *Gene* 37: 73, 1985; Craik, *BioTechniques*, Januar 1985, 12–19; Smith et al., *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981; und US-Patente Nr. 4,518,584 und 4,737,462.

[0039] Mutationen in Nukleotidsequenzen, die zur Expression von solchen HER-2/neu-Polypeptiden konstruiert sind, müssen natürlich den Leserahmen der kodierenden Sequenz bewahren und werden bevorzugt keine komplementären Regionen erzeugen, die hybridisieren könnten, um sekundäre mRNA-Strukturen zu erzeugen, wie etwa Schleifen oder Haarnadeln, die die Translation der mRNA nachteilig beeinflussen würden. Obwohl eine Mutationsstelle vorher bestimmt sein kann, ist es nicht notwendig, daß die Natur der Mutation per se vorbestimmt ist. Zum Beispiel kann, um optimale Eigenschaften von Mutanten an einer gegebenen Stelle auszuwählen, eine Zufallsmutagenese am Zielcodon durchgeführt werden und die exprimierten HER-2/neu-Polypeptidmutanten auf die erwünschte Aktivität untersucht werden.

[0040] Nicht alle Mutationen in einer Nukleotidsequenz, die für ein HER-2/neu-Polypeptid kodiert, werden im Endprodukt exprimiert werden. Zum Beispiel können Nukleotidsubstitutionen gemacht werden, um die Expression zu verbessern, hauptsächlich um Sekundärstrukturschleifen in der transkribierten mRNA zu verhindern (siehe z.B. Europäische Patentanmeldung Nr. 75,444A), oder um Codons bereitzustellen, die in leichterer Weise durch den ausgewählten Wirt translatiert werden können, wie etwa die wohlbekanntes E. coli-Präferenzcodons für die Expression in E. coli.

[0041] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung, sowohl natürlich vorkommend als auch modifiziert, werden bevorzugt mit rekombinanten DNA-Verfahren erzeugt. Solche Verfahren schließen das Inserieren einer DNA-Sequenz, die für ein HER-2/neu-Polypeptid kodiert, in einen rekombinanten Expressionsvektor und das Exprimieren der DNA-Sequenz in einem rekombinanten mikrobiellen, Säugetier- oder Insektenzell-Expressionssystem unter expressionsfördernden Bedingungen ein. DNA-Sequenzen, die für die Polypeptide kodieren, die durch diese Erfindung bereitgestellt werden, können aus cDNA-Fragmenten und kurzen Oligonukleotidlin-kern zusammengesetzt werden oder aus einer Reihe von Oligonukleotiden, um ein synthetisches Gen bereitzustellen, das in der Lage ist, in einen rekombinanten Expressionsvektor eingebaut und in einer rekombinanten Transkriptionseinheit exprimiert zu werden.

[0042] Rekombinante Expressionsvektoren enthalten eine DNA-Sequenz, die für ein HER-2/neu Polypeptid kodiert, das mit geeigneten transkriptionellen oder translationalen regulatorischen Elementen verknüpft ist, die aus Säugetier-, mikrobiellen, viralen oder Insektengenomen stammen. Solche regulatorischen Elemente schließen einen Transkriptionspromoter, eine fakultative Operatorsequenz zur Kontrolle der Transkription, eine Sequenz, die für geeignete mRNA-ribosomale Bindungsstellen kodiert, und Sequenzen ein, die die Termination der Transkription und Translation kontrollieren. Ein Replikationsursprung und ein selektierbarer Marker, um das Erkennen von Transformanten zu erleichtern, kann zusätzlich eingebaut sein.

[0043] DNA-Regionen sind in operabler Weise verknüpft, wenn sie funktionell miteinander in Beziehung stehen. Zum Beispiel wird DNA für ein Signalpeptid (sekretorischer Leader) in operabler Weise an eine DNA für ein Polypeptid geknüpft, wenn es als ein Vorläufer exprimiert wird, das bei der Sezernierung des Polypeptids teilnimmt; ein Promoter ist in operabler Weise mit einer kodierenden Sequenz verknüpft, wenn er die Transkription der Sequenz kontrolliert; oder eine Ribosomenbindungsstelle ist in operabler Weise mit einer kodierenden Sequenz verknüpft, wenn sie so positioniert ist, daß eine Translation ermöglicht wird. Im allgemeinen bedeutet in operabler Weise verknüpft aneinander angrenzend und, im Falle von sekretorischen Leaders, innerhalb des Leserahmens. DNA-Sequenzen, die für HER-2/neu Polypeptide kodieren, die in einem Mikroorganismus exprimiert werden sollen, werden bevorzugt keine Introns enthalten, die vorzeitig die Transkription der DNA in mRNA terminieren könnten.

[0044] Expressionsvektoren für eine bakterielle Verwendung können einen selektierbaren Marker und einen bakteriellen Replikationsursprung umfassen, abgeleitet aus kommerziell erhältlichen Plasmiden, umfassend genetische Elemente des gut bekannten Klonierungsvektors pBR322 (ATCC 37017). Solche kommerziellen Vektoren schließen zum Beispiel pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) ein. Diese pBR322 „Rückgrat“ Abschnitte werden mit einem geeigneten Promoter und der zu exprimierenden strukturellen Sequenz kombiniert. *E. coli* wird typischerweise unter Verwendung von pBR322-Derivaten transformiert, einem Plasmid, das aus einer *E. coli* Spezies stammt (Bolivar et al., *Gene* 2: 95, 1977). pBR322 enthält Gene für eine Ampicillin- und Tetrazyklin-Resistenz und stellt damit ein einfaches Mittel zum Identifizieren von transformierten Zellen bereit.

[0045] Promotoren, die häufig bei rekombinanten mikrobiellen Expressionsvektoren verwendet werden, schließen das β -Lactamase (Penicillinase)- und Lactose-Promoter-System (Chang et al., *Nature* 275: 615, 1987; und Goeddel et al., *Nature* 281: 544, 1979), das Tryptophan (*trp*)-Promoter-System (Goeddel et al., *Nucl. Acids Res.* 8: 4057, 1980; und Europäische Patentanmeldung 36,776) und den *tac*-Promoter (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Seite 412, 1982) ein. Ein besonders nützliches bakterielles Expressionssystem verwendet den Phagen λ P_L-Promoter und den *cl857ts*-thermolabilen Repressor. Plasmidvektoren, die von der American Type Culture Collection erhältlich sind, die Derivate des λ -P_L-Promoter enthalten, schließen Plasmid pHUB2, das in *E. coli* Stamm JMB9 (ATCC 37092) vorkommt, und pPLc28 ein, das in *E. coli* RR1 (ATCC53082) vorkommt.

[0046] Geeignete Promotersequenzen in Hefevektoren schließen die Promotoren für Metallothionein, 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255: 2073, 1980) oder andere glycolytische Enzyme (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7: 149, 1968; und Holland et al., *Biochem.* 17: 4900, 1978), wie etwa Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofruktokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase ein. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung in Hefeexpression werden weiter beschrieben in R. Hitzeman et al., Europäische Patentanmeldung Nr. 73,657.

[0047] Bevorzugte Hefevektoren können unter Verwendung von DNA-Sequenzen aus pBR322 für die Selektion und Replikation in *E. coli* (Amp^r-Gen und Replikationsursprung) und Hefe-DNA-Sequenzen zusammengesetzt werden, einschließlich eines Glucose-reprimierbaren ADH2-Promoter und eines α -Faktor Sekretionslea-

der. Der ADH2-Promoter ist von Russell et al. beschrieben worden (J. Biol. Chem. 258: 2674, 1982) und Beier et al. (Nature 300: 724, 1982). Der Hefe- α -Faktor-Leader, der die Sekretion von heterologen Proteinen steuert, kann zwischen dem Promoter und dem zu exprimierenden strukturellen Gen inseriert werden (siehe z.B. Kurjan et al., Cell 30: 933, 1982; und Bitter et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 81: 5339, 1984). Die Leader-Sequenz kann modifiziert werden, so daß sie nahe ihrem 3'-Ende eine oder mehrere nützliche Restriktionsstellen enthält, um die Fusion der Leader-Sequenz an Fremdgene zu erleichtern. Die transkriptionellen und translationalen Kontrollsequenzen in Expressionsvektoren, die beim Transformieren von Vertebraten-Zellen verwendet werden sollen, können von viralen Quellen bereitgestellt werden.

[0048] Zum Beispiel stammen häufig verwendete Promotoren und Enhancers aus Polyoma, Adenovirus 2, Simian Virus 40 (SV 40), und humanem Cytomegalovirus. DNA-Sequenzen, die aus dem SV40-viralen Genom stammen, z.B. der SV40-Ursprung, Early- und Late-Promoter, Enhancer-, Splice-, und Polyadenylierungsstellen können verwendet werden, um die anderen genetischen Elemente bereitzustellen, die für die Expression einer heterologen DNA-Sequenz erforderlich sind. Die Early- und Late-Promotoren sind besonders nützlich, weil beide in leichter Weise aus dem Virus als ein Fragment erhalten werden, das ebenfalls den SV40-viralen Replikationsursprung enthält (Fiers et al., Nature 273: 113, 1978). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können ebenso verwendet werden, vorausgesetzt, daß die näherungsweise 250 bp-Sequenz eingeschlossen ist, die sich von der HindIII-Stelle zu der Bgl-II-Stelle erstreckt, die sich in dem viralen Replikationsursprung befindet. Weiterhin können virale genomische Promotoren, Kontroll- und/oder Signalsequenzen verwendet werden, vorausgesetzt, daß solche Kontrollsequenzen mit der ausgewählten Wirtszelle kompatibel sind. Beispielhafte Vektoren können konstruiert werden wie von Okayama und Berg, Mol. Cell. Biol. 3: 280, 1983, offenbart.

[0049] Ein nützliches System für eine stabile Expression in hohen Konzentrationen von Säugetier-Rezeptor-cDNAs in C127-murinen Mammaepithelzellen kann konstruiert werden, wie im wesentlichen von Cosman et al. (Mol. Immunol. 23: 935, 1986) beschrieben. Ein bevorzugter eukaryotischer Vektor für die Expression von Lbelf4A-Protein-DNA ist pDC406 (McMahan et al., EMBO J. 10: 2821, 1991) und schließt regulatorische Sequenzen ein, die aus SV40, humanem Immunschwächevirus (HIV) und Epstein-Barr-Virus (EBV) stammen. Andere bevorzugte Vektoren schließen pDC409 und pDC410 ein, die aus pDC406 stammen. pDC410 stammte aus pDC406 durch Substituieren des EBV-Replikationsursprungs mit Sequenzen, die für das SV40-Large-T-Antigen kodieren. pDC409 unterscheidet sich von pDC406 dahingehend, daß eine Bgl-II-Restriktionsstelle außerhalb der vielfachen Klonierungsstelle deletiert worden ist, was die Bgl-II-Stelle innerhalb der multiplen Klonierungsstelle einzigartig macht.

[0050] Eine nützliche Zelllinie, die eine episomale Replikation der Expressionsvektoren ermöglicht, wie etwa pDC406 und pDC409, die den EBV-Replikationsursprung enthalten, ist CV-1/EBNA (ATTCC CRL 10478). Die CV-1/EBNA-Zelllinie wurde mittels Transfektion der CV-1-Zelllinie mit einem Gen erhalten, das für das Epstein-Barr-Virus-Kern-Antigen-I (EBNA-1) kodiert, und durch konstitutives Expressieren von EBNA-1, angetrieben von einem humanen CMV-immediate-early-Enhancer/Promoter.

[0051] Transformierte Wirtszellen sind Zellen, die mit Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert worden sind, die konstruiert wurden unter Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken und die Sequenzen enthalten, die für ein HER-2/neu-Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodieren. Transformierte Wirtszellen können das erwünschte HER-2/neu-Polypeptid exprimieren, aber Wirtszellen, die für Zwecke des Klonierens oder Amplifizierens von HER-2/neu-DNA transformiert worden sind, müssen das HER-2/neu-Polypeptid nicht exprimieren. Exprimierte Polypeptide werden bevorzugt in den Kulturüberstand sezerniert werden, abhängig von der ausgewählten DNA, können aber ebenso in der Zellmembran abgelagert werden.

[0052] Geeignete Wirtszellen für die Expression von rekombinanten Proteinen schließen Prokaryoten, Hefe oder höhere eukaryotische Zellen unter der Kontrolle von geeigneten Promotoren ein. Prokaryoten schließen Gram-negative oder Gram-positive Organismen, z.B. E. coli oder Bacilli, ein. Höhere eukaryotische Zellen schließen etablierte Zelllinien aus Insekten oder Säugetieren, wie unten beschrieben, ein. Zellfreie Translationssysteme können ebenso verwendet werden, um HER-2/neu-Polypeptide zu erzeugen, unter Verwendung von RNAs, die aus DNA-Konstrukten stammen. Geeignete Klonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung mit bakteriellen, Pilz-, Hefe- und Säugetierzell-Wirten werden z.B. beschrieben von Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985.

[0053] Prokaryotische Expressionswirte können zur Expression von HER-2/neu-Polypeptiden verwendet werden, die keine extensive proteolytische und Disulfid-Verarbeitung erfordern. Prokaryotische Expressionsvektoren umfassen im allgemeinen einen oder mehrere phänotypische selektierbare Marker z.B. ein Gen, das für Proteine kodiert, die eine Antibiotikaresistenz verleihen oder ein autotrophes Erfordernis liefern, und einen

Replikationsursprung, der vom Wirt erkannt wird, um eine Amplifikation innerhalb des Wirts sicherzustellen. Geeignete prokaryotische Wirte zur Transformation schließen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* und verschiedene Spezies innerhalb der Genera *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Staphylococcus* ein, obwohl andere Wirte ebenso verwendet werden können.

[0054] Rekombinante HER-2/neu-Polypeptide können ebenso in Hefewirten exprimiert werden, bevorzugt aus der *Saccharomyces*-Spezies, wie etwa *S. Cerevisiae*. Hefe von anderen Genera, wie etwa *Pichia* oder *Kluyveromyces*, können ebenso verwendet werden. Hefevektoren werden im allgemeinen einen Replikationsursprung aus dem 2 μ -Hefepiasmid oder einer autonom replizierenden Sequenz (ARS), einen Promoter, DNA- die für das HER-2/neu-Polypeptid kodiert, Sequenzen für die Polyadenylierung und Transkriptionstermination und ein Selektionsgen enthalten. Bevorzugt werden Hefevektoren einen Replikationsursprung enthalten und auswählbare Marker, die die Transformation von sowohl Hefe als auch *E. coli* ermöglichen, z.B. das Ampicillinresistenzgen von *E. coli* und das *S. Cerevisiae*-*trp1*-Gen, das einen Selektionsmarker für einen mutanten Hefestamm bereitstellt, dem die Fähigkeit fehlt, in Tryptophan zu wachsen, und einen Promoter, der aus einem stark exprimierten Hefegen stammt, um die Transkription einer strukturellen Sequenz stromabwärts zu induzieren. Die Anwesenheit der *trp1*-Läsion in dem Hefe-Wirtszellgenom stellt dann eine effektive Umgebung zum Nachweis der Transformation durch Wachstum in der Abwesenheit von Tryptophan bereit.

[0055] Geeignete Hefetransformationsprotokolle sind Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Eine beispielhaft Technik, beschrieben von Hind et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75/1929, 1978), beinhaltet, das Selektionieren auf *Trp*⁺-Transformanten in einem selektiven Medium, bestehend aus 0,67% Hefe-Stickstoffbase, 0,5% Casamino-Säuren, 2% Glucose, 10 mg/ml Adenin und 20 mg/ml Uracil. Wirtstämme, die durch Vektoren transformiert sind, umfassend den ADH2-Promotor, können zur Expression in einem reichen Medium wachsen gelassen werden, bestehend aus 1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 1% Glukose, supplementiert mit 80 mg/ml Adenin und 80 mg/ml Uracil. Die Derepression des ADH2-Promoter findet nach Aufbrauchen der Glukose im Medium statt. Rohe Hefeüberstände werden mittels Filtration geerntet und bei 4°C vor der weiteren Aufreinigung gehalten.

[0056] Verschiedene Säugetier- oder Insekten- (z.B. *Spodoptera* oder *Trichoplusia*) – Zellkultursysteme können ebenso verwendet werden, um rekombinantes Polypeptid zu exprimieren. Baculovirussysteme zur Produktion von heterologen Polypeptiden in Insektenzellen werden z.B. in einem Review-Artikel von Luckow und Summers behandelt, *Bio/Technology* 6: 47, 1988. Beispiele für geeignete Säugetier-Wirszelllinien schließen die COS-7-Linien von Affennierenzellen, beschrieben von Gluzman (*Cell* 23: 175, 1981), und andere Zelllinien ein, die in der Lage sind, einen geeigneten Sektor zu exprimieren, einschließlich z.B. CV-1/EBNA (ATTC CRL 10478), L-Zellen, C127, 3T3, Chinesische Hamstereierstock (CHO), COS, NS-1, HeLa und BHK-Zelllinien. Säugetierexpressionsvektoren können nicht-transkribierbare Elemente umfassen, wie etwa einen Replikationsursprung, einen geeigneten Promoter und Enhancer, verknüpft mit dem zu exprimierenden Gen, und andere 5'- oder 3'-flankierende, nicht-transkribierbare Sequenzen, und 5'- oder 3'-nicht-translatierbare Sequenzen, wie etwa notwendige Ribosomen-Bindungsstellen, eine Polyadenylierungsstelle, Splice-Donor- und -Akzeptor-Stellen und transkriptionale Terminationssequenzen.

[0057] Aufgereinigte HER-2/neu-Polypeptide können hergestellt werden durch Kultivieren von geeigneten Wirten/Vektorsystemen, um die rekombinanten Translationsprodukte der DNAs der vorliegenden Erfindung zu exprimieren, die dann aus Kulturmedien oder Zellextrakten aufgereinigt werden. Zum Beispiel können Überstände aus Systemen, die rekombinantes Polypeptid in Kulturmedien sezernieren, zuerst unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Proteinkonzentrationsfilters aufkonzentriert werden, wie etwa einer Amicon- oder Millipore-Pellicon-Ultrafiltrationseinheit. Nach dem Konzentrationsschritt kann das Konzentrat auf eine geeignete Aufreinigungsmatrix aufgebracht werden. Zum Beispiel kann eine geeignete Affinitätsmatrix ein Gegenstrukturprotein (d.h. ein Protein, an das ein HER-2/neu-Polypeptid in einer spezifischen, strukturbasierenden Wechselwirkung bindet) oder Lectin oder ein Antikörpermolekül umfassen, das an einen geeigneten Träger gebunden ist. Alternativ kann ein Anionenaustauschharz verwendet werden, z.B. eine Matrix oder ein Substrat mit anhängenden Diethylaminoethylgruppen (DEAE). Die Matrices könne Acrylamid, Agarose, Dextran, Zellulose oder andere Typen sein, die häufig bei der Proteinaufreinigung verwendet werden. Alternativ kann ein Kationenaustauschschritt verwendet werden. Geeignete Kationenaustauscher schließen verschiedene unlösliche Matrices ein, umfassend Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen. Sulfopropylgruppen werden bevorzugt. Gelfiltrationschromatographie stellt ebenso ein Mittel zum Aufreinigen eines HER-2/neu bereit.

[0058] Affinitätschromatographie ist ein bevorzugtes Verfahren zum Aufreinigen von HER-2/neu-Polypeptiden. Zum Beispiel können monoklonale Antikörper gegen das HER-2/neu-Polypeptid ebenso in Affinitätschromatographieaufreinigung nützlich sein, durch Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet gut bekannt

sind.

[0059] Schließlich können ein oder mehrere Umkehrphasen-Hochleistungschromatographieschritte (RP-HPLC) angewandt werden, die hydrophobe RP-HPLC-Medien, (z.B., Silicagel mit anhängenden Methyl- oder anderen aliphatischen Gruppen) verwenden, um eine HER-2/neu-Polypeptidzusammensetzung weiter aufzureinigen. Einige oder alle der vorhergehenden Aufreinigungsschritte in verschiedenen Kombinationen können ebenso verwendet werden, um ein homogenes rekombinantes Polypeptid bereitzustellen.

[0060] Rekombinantes HER-2/neu-Polypeptid, das in bakterieller Kultur erzeugt wird, wird bevorzugt durch anfängliche Extraktion aus Zellpellets isoliert, gefolgt von einem oder mehreren Konzentrations-, Aussalzungs-, wäßrigen Ionenaustausch- oder Größenausschlußchromatographieschritten. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) kann für letzte Aufreinigungsschritte verwendet werden. Microbielle Zellen, die bei der Expression von rekombinanten Lbelf4A-Proteinen verwendet werden, können mit einem beliebigen herkömmlichen Verfahren aufgebrochen werden, einschließlich Einfrier-Auftau-Cyclen, Beschallung, mechanischer Zerstörung oder der Verwendung von Zell-Lyse-Mitteln.

[0061] Die Fermentation von Hefe, die HER-2/neu-Polypeptid als ein sezerniertes Protein exprimiert, vereinfacht die Aufreinigung in starker Weise. Sezerniertes rekombinantes Protein, das aus einer Fermentation in großem Maßstab resultiert, kann mit Verfahren aufgereinigt werden, die denjenigen analog sind, die von Urdal et al. offenbart werden (J. Chromatog. 296: 171, 1984). Diese Literaturstelle beschreibt zwei sequentielle Umkehrphasen-HPLC-Schritte zur Aufreinigung von rekombinantem humanem GM-CSF auf einer präparativen HPLC-Säule.

[0062] Zubereitungen von HER-2/neu-Polypeptiden, die in rekombinanter Kultur synthetisiert worden sind, können Zellbestandteile enthalten, die nicht HER-2/neu sind, einschließlich Proteinen, in Mengen und einer Art, die von den unternommenen Aufreinigungsschritten abhängen, um das HER-2/neu-Polypeptid aus der Kultur zu gewinnen. Diese Bestandteile werden üblicherweise aus Hefe, Prokaryoten oder nicht-humanen Eukaryoten stammen. Solche Zubereitungen sind üblicherweise frei von anderen Proteinen, die normalerweise mit dem HER-2/neu-Protein assoziiert sind, wie es normalerweise in der Natur in seiner üblichen Spezies gefunden wird.

[0063] Eine automatisierte Synthese bietet ein alternatives Verfahren zum Herstellen von Polypeptiden dieser Erfindung. Zum Beispiel kann eine der kommerziell erhältlichen Festphasentechniken verwendet werden, wie etwa das Festphasensyntheseverfahren nach Merrifield, bei dem Aminosäuren sequentiell an eine wachsende Aminosäurekette angehängt werden. (Siehe Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963). Die Ausrüstung für eine automatisierte Synthese von Polypeptiden ist kommerziell erhältlich von Herstellern, wie etwa Applied Biosystems, Inc., aus Foster City, CA, und können im allgemeinen gemäß den Anweisungen des Herstellers betrieben werden.

[0064] In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung kann die Verwendung eines HER-2/neu-Polypeptids (oder eines DNA-Moleküls, das die Expression eines solchen Peptids steuert), um eine Immunantwort auf das HER-2/neu-Protein zu erzeugen (einschließlich demjenigen, das bei einer bösartigen Erkrankung exprimiert wird, bei der ein HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist), nachgewiesen werden. Repräsentative Beispiele für solche bösartigen Erkrankungen schließen Brust-, Ovarial-, Colon-, Lungen- und Prostatakrebs ein. Eine Immunantwort auf das HER-2/neu-Protein, wenn sie von einem HER-2/neu-Polypeptid erzeugt worden ist, kann langlebiger sein und kann lange nach einer Immunisierung nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob das Protein im Körper zum Zeitpunkt des Testens anwesend oder abwesend ist. Eine Immunantwort auf das HER-2/neu-Protein, erzeugt durch Reaktion auf ein HER-2/neu-Polypeptid, kann durch Untersuchungen auf Anwesenheit oder Abwesenheit oder durch eine Verstärkung der spezifischen Aktivierung von CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden. Genauer werden T-Zellen, die aus einem immunisierten Individuum mit Routinetechniken isoliert worden sind (wie etwa mittels Ficoll/Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation von peripheren Blutlymphocyten), mit HER-2/neu-Protein inkubiert. Zum Beispiel können T-Zellen in vitro für 2-9 Tage (typischerweise 4 Tage) bei 37°C mit HER-2/neu-Protein inkubiert werden (typischerweise 5 µg/ml des ganzen Proteins oder eine bemessene Anzahl an Zellen, die HER-2/neu-Protein synthetisieren). Es mag wünschenswert sein, ein weiteres Aliquot einer T-Zellprobe in der Abwesenheit von HER-2/neu-Protein zu inkubieren, um als eine Kontrolle zu dienen.

[0065] Eine spezifische Aktivierung von CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen kann in einer Vielzahl von Arten nachgewiesen werden. Verfahren zum Nachweisen von einer spezifischen T-Zell-Aktivierung schließen den Nachweis der Proliferation von T-Zellen, die Produktion von Cytokinen (z.B. Lymphokinen) oder die Erzeugung von cyto-

lytischer Aktivität (d.h. Erzeugung von cytotoxischen T-Zellen, die für HER-2/neu-Protein spezifisch sind) ein. Für CD4⁺-T-Zellen ist ein bevorzugtes Nachweisverfahren spezifischer T-Zell-Aktivierung der Nachweis der Proliferation von T-Zellen. Für CD8⁺-T-Zellen ist ein bevorzugtes Nachweisverfahren spezifischer T-Zellen-Aktivierung der Nachweis der Erzeugung von cytolytischer Aktivität.

[0066] Der Nachweis der Proliferation von T-Zellen kann mit einer Vielzahl von bekannten Techniken erreicht werden. Zum Beispiel kann eine T-Zellproliferation durch Messen der DNA-Syntheserate nachgewiesen werden. T-Zellen, die stimuliert worden sind, um zu proliferieren, weisen eine erhöhte DNA-Syntheserate auf. Ein typischer Weg, um die DNA-Syntheserate zu messen, ist z.B. das Puls-Markieren von T-Zellkulturen mit tritiiertem Thymidin, einem Nukleosid-Vorläufer, der in neu-synthetisierte DNA eingebaut wird. Die Menge an tritiiertem Thymidin, die eingebaut ist, kann unter Verwendung eines Flüssig-Scintillations-Spectrophotometers bestimmt werden. Andere Arten, um eine T-Zellproliferation nachzuweisen, schließen das Messen von Zunahmen der Interleukin-2 (IL-2)-Produktion, des Ca²⁺-Flusses oder der Farbstoffaufnahme, wie etwa 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium ein. Alternativ kann eine Synthese von Lymphokinen (wie etwa Interferon-Gamma) gemessen werden, oder die relative Anzahl von T-Zellen, die auf intaktes p185^{HER-2/neu}-Protein antworten können, kann quantifiziert werden.

[0067] Durch Verwendung oder Expression eines HER-2/neu-Polypeptids können T-Zellen, die das HER-2/neu-Protein erkennen, in vivo proliferiert werden. Zum Beispiel kann ein Medikament zur Immunisierung mit einem HER-2/neu-Peptid (d.h. als ein Vaccin) eine kontinuierliche Expansion in der Anzahl von T-Zellen induzieren, die für einen therapeutischen Angriff gegen einen Tumor notwendig sind, bei dem das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist. Typischerweise werden ungefähr 0,01 µg/kg bis ungefähr 100 mg/kg Körpergewicht auf intradermale, subkutane oder intravenöse Route verabreicht. Eine bevorzugte Dosierung ist ungefähr 1 µg/kg bis 1 mg/kg, wobei ungefähr 5 µg/kg bis ungefähr 200 µg/kg besonders bevorzugt sind.

[0068] Es wird Fachleuten klar sein, daß die Anzahl und Frequenz der Verabreichung von der Antwort des Patienten abhängen wird. Es kann wünschenswert sein, das HER-2/neu-Polypeptid repetitiv zu verabreichen. Es wird für Fachleute klar sein, daß mehr als 1 HER-2/neu-Polypeptid verabreicht werden kann, entweder simultan oder sequentiell. Bevorzugte Peptide zur Verwendung in einem Medikament zur Immunisierung sind diejenigen, die die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2, beginnend bei ungefähr dem Lysinrest bei Aminosäureposition 676 und sich erstreckend bis ungefähr zu dem Valinrest bei Aminosäureposition 1255, einschließen. Es wird von Fachleuten erkannt werden, daß die vorliegende Erfindung die Verwendung eines intakten HER-2/neu-Polypeptids ebenso wie eine Aufteilung eines solchen Polypeptids in eine Vielzahl von Peptiden in Erwägung zieht. Weder intaktes p185^{HER-2/neu}-Protein noch ein Peptid mit der Aminosäuresequenz seiner ganzen extrazellulären Domäne (d.h. einem Peptid mit einer Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Aminosäureposition 1 bis Aminosäureposition 650, ± ungefähr 1–5 Positionen, und mit oder ohne die ersten 21 Aminosäurepositionen) werden alleine zur Immunisierung verwendet.

[0069] Ein HER-2/neu-Polypeptid (oder Nukleinsäure) wird bevorzugt zur Verwendung in den obigen Verfahren als eine pharmazeutische Zusammensetzung formuliert (z.B. Vaccin). Pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen im allgemeinen ein oder mehrere Polypeptide in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger, Bindemittel oder Verdünnungsmittel. Solche Träger werden gegenüber Empfängern in den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen nicht-toxisch sein. Die Verwendung eines HER-2/neu-Polypeptids in Verbindung mit chemotherapeutischen Mitteln wird ebenso in Erwägung gezogen.

[0070] Zusätzlich zu dem HER-2/neu-Polypeptid (das als ein Antigen funktioniert), kann es wünschenswert sein, andere Bestandteile in dem Vaccin einzuschließen, wie etwa einen Träger für die Antigenabgabe und immunstimulatorische Substanzen, die darauf angelegt sind, die Immunogenizität des Proteins zu verbessern. Beispiele für Träger zur Antigenabgabe schließen Aluminiumsalze, Wasser-in-Öl-Emulsionen, bio-abbaubare Ölträger, Öl-in-Wasser-Emulsionen, bio-abbaubare Microkapseln und Liposomen ein. Beispiele für immunstimulatorische Substanzen (Adjuvantien) schließen N-Acetylmuramyl-L-Alanin-D-Isoglutamin (MDP), Lipopolysaccharide (LPS), Glucan, IL-12, GM-CSF, Gamma-Interferon und IL-15 ein. Es wird Fachleuten klar sein, daß ein HER-2/neu-Polypeptid zur Verwendung als ein Vaccin synthetisch hergestellt oder aus natürlichem Ursprung gewonnen werden kann.

[0071] Während ein beliebiger geeigneter Träger, der Fachleuten auf dem Gebiet bekannt ist, bei den pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung verwendet werden kann, wird der Typ des Trägers in Abhängigkeit von dem Verabreichungsmodus und davon, ob eine verzögerte Freisetzung erwünscht ist, variieren. Für eine parenterale Verabreichung, wie etwa eine subkutane Injektion, umfaßt der Träger bevorzugt Wasser, Salzlösung, Alkohol, ein Fett, ein Wachs oder einen Puffer. Für eine orale Verabreichung kann ein beliebiger

der obigen Träger oder einen fester Träger wie etwa Mannitol, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natrium-saccharin, Talkum, Zellulose, Glukose, Saccharose und Magnesiumcarbonat, verwendet werden. Bio-abbaubare Microsphären (z.B. Polymilchsäuregalaktid) können ebenso als Träger für die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung verwendet werden. Geeignete bioabbaubare Microsphären werden z.B. in US-Patent Nr. 4,897,268 und 5,075,109 offenbart.

[0072] Ein HER-2/neu-Polypeptid kann in der bioabbaubaren Mikrosphäre verkapselt oder mit der Oberfläche der Mikrosphäre assoziiert sein. Zum Beispiel wird in einer bevorzugten Ausführungsform ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Aminosäure 76 bis Aminosäure 1255 innerhalb einer bioabbaubaren Mikrosphäre verkapselt. In dieser Hinsicht ist es bevorzugt, daß die Mikrosphäre größer als näherungsweise 25 Mikron ist.

[0073] Pharmazeutische Zusammensetzungen (einschließlich Vakzinen) können ebenso Verdünnungsmittel, wie etwa Puffer, Antioxidantien, wie etwa Ascorbinsäure, Polypeptide mit niedrigem Molekulargewicht (weniger als ungefähr 10 Reste), Proteine, Aminosäuren, Kohlenhydrate, einschließlich Glucose, Saccharose oder Dextrine, chelierende Mittel, wie etwa EDTA, Glutathion und andere Stabilisatoren und Bindemittel enthalten. Neutral-gepufferte Salzlösungen oder Salzlösungen, die mit nicht-spezifischem Serumalbumin gemischt sind, sind beispielhafte geeignete Verdünnungsmittel. Bevorzugt wird das Produkt als ein Lyophilisat unter Verwendung von geeigneten Bindemittellösungen (z.B. Saccharose) als Verdünnungsmittel formuliert.

[0074] Als eine Alternative zur Präsentation von HER-2/neu-Polypeptiden schließt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen ein, die in der Lage sind, Nukleinsäuremoleküle, die für ein HER-2/neu-Polypeptid kodieren, abzugeben. Solche Zusammensetzungen schließen rekombinante virale Vektoren (z.B. Retroviren (siehe WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 und WO 94/03622), Adenovirus (siehe Berkner, Biotechniques, 6: 616–627, 1988; Li et al., Hum. Gene Ther. 4: 403–409, 1993; Vincent et al., Nat. Genet. 5: 130–134, 1993; und Kolis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 215–219, 1994), Pockenvirus (siehe US-Patent Nr. 4,769,330, US-Patent Nr. 5,017,487 und WO 89/01973)), nackte DNA (siehe WO 90/11092), Nukleinsäuremoleküle, die mit einem polykationischen Molekül komplexiert sind (siehe WO 93/03709), und Nukleinsäure, die mit Liposomen assoziiert ist (siehe Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7851, 1987) ein. In bestimmten Ausführungsformen kann die DNA mit abgetötetem oder inaktiviertem Adenovirus verknüpft sein (siehe Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3: 147–154, 1992; Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6094, 1992). Andere geeignete Zusammensetzungen schließen DNA-Ligand (siehe Wu et al., J. Biol. Chem. 264: 16985–16987, 1989) und Lipid-DNA-Kombinationen (siehe Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413–7417, 1989) ein. Zusätzlich kann die Effizienz der Aufnahme von nackter DNA in Zellen durch Auftragen der DNA auf bioabbaubare Kügelchen erhöht werden.

[0075] Zusätzlich zu direkten in-vivo-Prozeduren können ex-vivo-Prozeduren verwendet werden, bei denen Zellen einem Tier entnommen, modifiziert und in dasselbe oder ein anderes Tier eingebracht werden. Es wird klar sein, daß man eine der obigen aufgeführten Zusammensetzungen zum Einführen von HER-2/neu-Nukleinsäuremolekülen in Gewebezellen in einem ex-vivo-Kontext verwenden kann. Protokolle für virale, physikalische und chemische Aufnahmeverfahren sind auf dem Gebiet gut bekannt.

[0076] Entsprechend ist die vorliegende Erfindung zum Verbessern oder Auslösen einer zellulären Immunantwort in einem Patienten oder einer Zellkultur nützlich (z.B. die Erzeugung von Antigen-spezifischen cytolytischen T-Zellen). Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Patient“ auf jedes warmblütige Tier, bevorzugt einen Menschen. Ein Patient kann von Krebs betroffen sein, wie etwa Brustkrebs, oder kann normal sein (d.h. frei von nachweisbarer Erkrankung und Infektion). Eine „Zellkultur“ ist eine Zubereitung von T-Zellen oder isolierten Bestandteilmzellen (einschließlich, aber nicht beschränkt auf Makrophagen, Monocyten, B-Zellen und dendritischen Zellen). Solche Zellen können mit einer aus einer Vielzahl von Techniken isoliert werden, die Fachleuten auf dem Gebiet wohlbekannt sind (wie etwa Ficoll-Hypaque-Dichte-Zentrifugation). Die Zellen können (müssen aber nicht) aus einem Patienten isoliert worden sein, der von einer mit HER-2/neu-assoziierten bösartigen Erkrankung betroffen ist, und können in einen Patienten nach der Behandlung erneut eingeführt werden.

[0077] Die vorliegende Erfindung offenbart ebenso, daß HER-2/neu-Polypeptid zusätzlich dazu, daß es gegenüber T-Zellen immunogen ist, B-Zellen zu stimulieren scheint, um Antikörper zu erzeugen, die in der Lage sind, HER-2/neu-Polypeptid zu erkennen. Antikörper, die für HER-2/neu-Protein spezifisch sind (d.h., die eine Bindungsaffinität von ungefähr 10^7 Liter/Mol oder besser aufweisen), können in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten gefunden werden, einschließlich Seren und Ascites. Kurz gesagt, wird eine Körperflüssigkeitsprobe aus einem warmblütigen Tier, wie etwa einem Menschen, isoliert, für den es wünschenswert ist, zu bestimmen,

ob Antikörper vorhanden sind, die für HER-2/neu-Polypeptid spezifisch sind. Die Körperflüssigkeit wird mit HER-2/neu-Polypeptid unter Bedingungen und für eine Zeit inkubiert, die ausreicht, um die Bildung von Immunkomplexen zwischen dem Polypeptid und den für das Protein spezifischen Antikörpern zu ermöglichen. Zum Beispiel kann eine Körperflüssigkeit und HER-2/neu-Polypeptid bei 4°C für 24–48 Stunden inkubiert werden. Nach Inkubation wird die Reaktionsmischung auf die Anwesenheit von Immunkomplexen getestet. Der Nachweis von einem oder mehreren Immunkomplexen, der sich zwischen HER-2/neu-Polypeptid und für HER-2/neu-Polypeptid-spezifischen Antikörpern gebildet hat, kann durch eine Vielzahl von bekannten Techniken erreicht werden, wie etwa Radioimmunassays (RIA) und Enzym-verknüpfte immunsorbierende Assays (ELISA).

[0078] Geeignete Immunoassays schließen die doppel-monoklonale-Antikörper-Sandwich-Immunoassay-Technik von David et al. (US-Patent 4,376,110), monoklonal-polyklonal-Antikörper-Sandwich-Assays (Wilde et al., in Kirkham und Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. and S. Livingstone, Edinburgh, 1970); das "Western Blot"-Verfahren von Gordon et al. (US-Patent 4,452,901); Immunausfällung von markiertem Liganden (Brown et al., J. Biol. Chem. 255: 4980–4983, 1980); enzym-verknüpfte immunsorbierende Assays, wie zum Beispiel beschrieben von Raines and Ross (J. Biol. Chem. 257: 5154–5160, 1982); Immuncytochemische Techniken, einschließlich der Verwendung von Fluorochromen (Brooks et al., Clin. Exp. Immunol. 39: 477, 1980); und Neutralisierung der Aktivität [Bowen-Pope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2396–2400 (1984)] ein, die alle hierbei durch Bezugnahme aufgenommen werden. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Immunoassays steht eine Anzahl von anderen Immunoassays zur Verfügung, einschließlich denjenigen, die in US-Patent Nr. beschrieben sind: 3,817,827; 3,850,752; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; und 4,098,876, die alle hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden.

[0079] Für Nachweiszwecke kann das HER-2/neu-Polypeptid („Antigen“), entweder markiert oder nicht-markiert sein. Wenn es nicht markiert ist, findet das Antigen Verwendung in Agglutinationsassays. Zusätzlich kann nicht-markiertes Antigen in Kombination mit markierten Molekülen verwendet werden, die mit Immunkomplexen reaktiv sind, oder in Kombination mit markierten Antikörpern (zweiten Antikörpern), die mit dem Antikörper reaktiv sind, der gegen das HER-2/neu Peptid gerichtet ist, wie etwa Antikörper, die für Immunglobulin spezifisch sind. Alternativ kann das Antigen direkt markiert sein. Wenn es markiert ist, kann die Reportergruppe Radioisotope, Fluorophore, Enzyme, lumineszente Substanzen oder Farbstoffpartikel einschließen. Diese und andere Markierungen sind auf dem Gebiet wohlbekannt und sind zum Beispiel beschrieben in den folgenden US-Patenten: 3,766,162; 3,791,932; 3,817,837; 3,996,345 und 4,233,402.

[0080] Typischerweise wird in einem ELISA-Assay ein Antigen auf die Oberfläche eines Mikrotiternapfes adsorbiert. Verbleibende Proteinbindungsstellen auf der Oberfläche werden dann mit einem geeigneten Mittel blockiert, wie etwa bovinem Serumalbumin (BSA), Hitzeinaktiviertem normalem Ziegen Serum (NGS), oder BLOTTO (gepufferte Lösung einer fettfreien Trockenmilch, die ebenso ein Konservierungsmittel, Salze und ein Antischaummittel enthält). Der Napf wird dann mit einer Probe inkubiert, von der angenommen wird, daß sie spezifische Antikörper enthält. Die Probe kann unverdünnt aufgetragen werden, oder sie kann, was öfter vorkommt, verdünnt werden, gewöhnlich in einer gepufferten Lösung, die eine geringe Menge (0,1 Gew.-%–5,0 Gew.-%) an Protein enthält, wie etwa BSA, NGS oder BLOTTO. Nach Inkubieren für eine ausreichende Länge an Zeit, um eine spezifische Bindung stattfinden zu lassen, wird der Napf gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen, und dann mit einem anti-Spezies-spezifischen Immunglobulin-Antikörper inkubiert, der mit einer Reportergruppe markiert ist. Die Reportergruppe kann aus einer Vielzahl von Enzymen ausgewählt sein, einschließlich Meerrettichperoxidase, Beta-Galactosidase, alkalische Phosphatase und Glucoseoxidase. Es wird ausreichend Zeit gelassen, damit eine spezifische Bindung stattfinden kann, dann wird der Napf wieder gewaschen, um nicht-gebundenes Konjugat zu entfernen, und das Substrat für das Enzym wird zugegeben. Die Farbe läßt man sich entwickeln, und die optische Dichte des Inhalts des Napfes wird visuell oder instrumentell bestimmt.

[0081] In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Aspekts der vorliegenden Erfindung wird eine Reportergruppe an HER-2/neu-Protein gebunden. Der Schritt des Nachweises von Immunkomplexen beinhaltet das Entfernen von im wesentlichen jeglichen ungebundenen HER-2/neu-Protein und dann den Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit der Reportergruppe.

[0082] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird eine Reportergruppe an einen zweiten Antikörper gebunden, der in der Lage ist, an die für HER-2/neu-Protein spezifischen Antikörper zu binden. Der Schritt des Nachweises der Immunkomplexe beinhaltet (a) Entfernen von im wesentlichen jeglichen ungebundenem Antikörper, (b) Zugabe des zweiten Antikörpers, (c) Entfernen von im wesentlichen jeglichen ungebundenem

zweiten Antikörper und dann (d) Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit der Reportergruppe. Wenn der Antikörper, der für HER-2/neu-Protein spezifisch ist, von einem Menschen stammt, ist der zweite Antikörper ein anti-humaner Antikörper.

[0083] In einer dritten bevorzugten Ausführungsform zum Nachweis von Immunkomplexen wird eine Reportergruppe an ein Molekül gebunden, das in der Lage ist, an die Immunkomplexe zu binden. Der Schritt des Nachweises beinhaltet (a) Zugabe des Moleküls, (b) Entfernen von im wesentlichen jeglichen ungebundenem Molekül und dann (c) Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit der Reportergruppe. Ein Beispiel für ein Molekül, das in der Lage ist, an die Immunkomplexe zu binden, ist Protein A.

[0084] Es wird für Fachleute offensichtlich sein, daß eine Vielzahl von Verfahren zum Nachweis der Immunkomplexe innerhalb der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann. Reportergruppen, die zur Verwendung in einem der Verfahren geeignet sind, schließen Radioisotope, Fluorophore, Enzyme, lumineszente Substanzen und Farbstoffpartikel ein.

[0085] In einem verwandten Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung kann der Nachweis von Immunkomplexen, die zwischen HER-2/neu-Polypeptid und Antikörpern in einer Körperflüssigkeit gebildet werden, die für HER-2/neu-Polypeptid spezifisch sind, dazu verwendet werden, um die Wirksamkeit einer Krebstherapie zu überwachen, die ein HER-2/neu-Polypeptid beinhaltet, für eine bösartige Erkrankung, bei der das HER-2/neu-Onkogen assoziiert ist. Körperflüssigkeitsproben, die einem Individuum vor und nach der Initiierung einer Therapie entnommen worden sind, können auf die Immunkomplexe durch die oben beschriebenen Methodologien analysiert werden. Kurz gesagt, die Anzahl an Immunkomplexen, die in beiden Proben nachgewiesen werden, werden verglichen. Eine wesentliche Veränderung in der Anzahl an Immunkomplexen in der zweiten Probe (nach Therapiebeginn), relativ zu der ersten Probe (vor der Therapie) reflektiert eine erfolgreiche Therapie.

[0086] Die folgenden Beispiele werden zu Illustrationszwecken dargeboten und nicht, um die Erfindung zu beschränken.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEM HUMANEM HER-2/NEU-POLYPEPTID

[0087] Das humane HER-2/neu-Polypeptid wurde mit dem PCR-Verfahren (z.B. US-Patent Nr. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159) aus einem Plasmid gewonnen, das gemäß Di Fiore et al. hergestellt worden ist (King et al., Science 229: 974–976, 1985; Di Fiore et al., Science 237: 178–182, 1987), unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern, die zusätzlich eine BssHII-Restriktionsstelle und eine Enterokinase-Protease-Stelle am 5'-Ende und eine EcoRI-Stelle an 3'-Ende einführte. Der Primer für das 5'-Ende war 5'-TCTGGCGCGCTGGATGACGATGACAAGAAACGACGGCAGCAGAAGATC-3' (SEQ ID NO: 3), während der Primer für das 3'-Ende 5'-TGAATTCTCGAGTCATTACACTGGCACGTCCAGACCCAG-3' (SEQ ID NO: 4) war. Das resultierende 1,8 kb-PCR-Fragment wurde in den T-Vektor von Novagen (Madison, WI, USA) subkloniert, und die Sequenz der ausgewählten Klone wurde auf dem automatisierten ABI 373-DNA-Sequenzierer bestimmt (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), unter Verwendung von überlappenden Sequenzierungs-Primern. PCR-Fragmente mit einer Sequenz, die der publizierten DNA-Sequenz für die humane HER-2/neu-cDNA entsprach (SEQ ID NO: 1; Coussens et al., Science 230: 132, 1985; Yamamoto et al., Nature 319: 230, 1986) wurden dann in dem korrekten Leserahmen über die BssHII-Stelle mit einer modifizierten E. coli Thioredoxin-Reduktase verbunden. Ein 6X-Histidin-Affinitätstag, der bei der Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung des exprimierten Fusionsproteins verwendet wird, wurde in den Thioredoxin-Reductase-Fusionspartner eingebaut. Diese cDNA für das trxA-humane HER-2/neu-Polypeptidfusionsprotein wurde in einen modifizierten pET-Expressionsvektor zur Expression in E. coli subkloniert.

[0088] Während berichtet worden ist, daß Thioredoxin-Reductase andere heterologe Proteine, die in E. coli exprimiert werden, stabilisiert und solubilisiert, scheint sie keinen signifikanten Vorteil für die Expression von humanem HER-2/neu-Polypeptid in E. coli zu bieten. Während ein signifikanter Anteil des trxA-HER-2/neu-Polypeptid-Fusionsproteins löslich war, wurde ein Hauptteil in Inclusion bodies exprimiert. Das Fusionsprotein wurde ebenso einem Abbau während der Expression in E. coli unterzogen. Die Anwesenheit des Thioredoxin-Reductase-Fusionspartners kann jedoch das Protein während der Aufreinigung stabilisieren. Die Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern gegen Thioredoxin-Reductase stellt einen bequemen Marker bereit, der

während der Aufreinigung verfolgt werden kann.

[0089] Für die Aufreinigung des humanen HER-2/neu-Polypeptids mit dem Thioredoxin-Reductase-Fusionspartner, enthaltend den 6 × His-Affinitätstag, wurde das E. coli-Pellet mit Proteaseinhibitoren und Lysozym resuspendiert und beschallt. Die Inclusion Bodies wurden mittels Zentrifugation isoliert und werden 3 × mit Deoxycholat gewaschen, wobei die letzte Waschung über Nacht stattfindet, um LPS zu entfernen. Die gewaschenen Inclusion Bodies werden in GuHCl für die Ni-Aufreinigung solubilisiert. Die Ni-Säule wurde mit Imidazol in Harnstoff eluiert und gegen 10 mM Tris pH8 dialysiert. Die Ausbeute an HER-2/neu-Polypeptid unter Verwendung dieses Protokolls betrug von 80%–95% des reinen Vollängenproteins, wobei die Hauptkontaminante abgebautes Protein war. Aus 500 ml Fermentation wurden 20 mg gewonnen. Es war > 98% HER-2/neu-Polypeptid. Die hierin verwendeten Techniken sind Fachleuten wohlbekannt und sind z.B. beschrieben worden in J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Cold Spring Harbor, New York, USA.

BEISPIEL 2

DENDRITISCHE ZELLEN KÖNNEN HUMANES HER-2/NEU-POLYPEPTID AUSLÖSEN („Prime“)

A. Erzeugung von DC-Kulturen aus Knochenmark

[0090] DC-Kulturen wurden aus hämatopoietischen CD34+-Progenitorzellen (HPC) erzeugt. CD34+-Zellen wurden aus Knochenmark von normalen Spendern unter Verwendung des Zelltrennungssystems Ceprate LC Kit aufgereinigt (CellPro, Bothell, WA, USA). Die Reinheit der gewonnenen CD34+-Zellen wurde anhand von flußzytometrischer Analyse auf 80% bis 95% bestimmt. CD34+-Zellen wurden in Serum-freiem Medium kultiviert (X-VIVO 10, Biowhittaker, Inc., Walkersville, MD, USA), supplementiert mit L-Glutamin (584 µg/l), Penicillin (10 IU/ml), Streptomycin (100 µg/ml), 100 ng/ml humanem rGM-CSF und 50 ng/ml humanem rIL-6 (ImmuneX, Seattle, WA, USA). Nach 0 bis 17 Tagen Kultivierungszeit wurden Zellen geerntet und zum Phänotypisieren und in T-Zell-Stimulationsassays verwendet. Es ist beschrieben worden, daß GM-CSF alleine und in Kombination mit IL-4 oder TNFα das In-Vitro-Wachstum von DC induziert. In Experimenten unter Verwendung von KLH und OVA als Antigen, um naive T-Zellen zu primen, ergab GM-CSF plus IL-6 in konsistenter Weise eine vergleichbare Gesamtstimulation, aber mit einem niedrigeren Hintergrund und damit einen höheren Stimulationsindex im Vergleich zu GM-CSF plus IL-4 oder TNFα.

B. T-Zell-Priming-Assay

[0091] Aus Knochenmark stammende CD34+HPC, die in Serum-freiem Medium, enthaltend GM-CSF und IL-6, kultiviert wurden, wurden als APC nach einer Kultivationsperiode von 0–17 Tagen verwendet. Die Fähigkeit der DC zum Priming wurde durch Kultivieren mit autologen, naiven T-Lymphocyten in Anwesenheit oder Abwesenheit des Protein-Antigen-rekombinanten humanen HER-2/neu-Polypeptids (hHNP) (10 µg/ml) bestimmt. CD4+-T-Lymphocyten wurden aus peripheren mononukleären Blutzellen durch positive Selektion unter Verwendung von Immunaффinitätssäulen isoliert (CellPro, Inc., Bothell, WA, USA). CD4+CD45RA+ (naive) T-Lymphocyten wurden aus CD4+-T-Lymphocyten unter Verwendung eines anti-CD45RA-mAb selektioniert, der direkt an FITC konjugiert war (Immunotech, Westbrook, ME, USA), durch flußzytometrisches Sortieren. Die CD4+CD45RA+-T-Zellen, die erhalten wurden, waren 99% rein. DC-Kulturen wurden in 96-Napf-Rundbodenplatten (Corning, Corning, NY, USA) in verschiedenen Konzentrationen ausplattiert und für 16–18 Stunden mit hHNP 10 µg/ml Endkonzentration inkubiert. Antigen-gepulste DC wurden bestrahlt (10 Gy), und autologe CD4+CD45RA+-T-Lymphocyten wurden zugegeben (5×10^4 /Napf). Eine proliferative Antwort der T-Zellen wurde anhand der Aufnahme von (3 H) Thymidin (1 µCi/Napf) gemessen, das am Tag 6 für 16–18 Stunden zugegeben worden war. Proliferationsassays wurden in serumfreien und cytokin-freien Medium durchgeführt. Die Resultate werden in [Fig. 1](#) gezeigt. [Fig. 2](#) zeigt die Ergebnisse des Testens von CD4+-T-Zellen aus einem normalen Donor auf Antworten auf hHNP. Ähnliche Daten wurden mit T-Zellen aus neun von zehn normalen Individuen erhalten.

BEISPIEL 3

ASSAY ZUM NACHWEIS VON LYMPHOCYTEN-VORLÄUFERN MIT NIEDRIGER FREQUENZ

[0092] Drei Assays können zum Nachweis von CD4+-Antworten verwendet werden: Ein Standard-Proliferationsassay, ein Screeningverfahren für Ereignisse mit niedriger Frequenz, und ein limitierender Verdünnungsassay (LDA). Herkömmliche proliferative Assays sind in der Lage, in leichter Weise ausgelöste („primed“) Ant-

worten nachzuweisen. Der proliferative Antwort-Stimulationsindex stellt eine grobe Korrelation mit einer Vorläuferfrequenz an Antigen-reaktiven T-Zellen bereit. Jede spezifische proliferative Antwort, die aa PBL nachgewiesen wird, wird als eine ausgelöste Antwort angesehen.

[0093] Um eine quantitativere Interpretation von CD4⁺-T-Zellantworten bereitzustellen, wird das Assaysystem verwendet, das zum Nachweis von niedrigen Lymphocyt-Vorläufer-Frequenz-Antworten entwickelt worden ist (unten beschrieben). Dieser Assay ist einfach und kosteneffektiv. Unter Umständen, bei denen eine größere Präzision benötigt wird, wird die Vorläuferfrequenz durch limitierende Verdünnungsassays validiert (Bishop and Orosz, Transplantation 47: 671–677, 1989).

[0094] Antworten, die größer sind als diejenigen, die in normalen Individuen nachgewiesen werden, werden als eine ausgelöste Antwort definiert und implizieren eine existierende Immunität. Niedrige Antworten, die nur anhand von LDA-Bedingungen nachweisbar sind, werden als nicht-ausgelöste Antworten betrachtet. Eine abwesende Antwort anhand von LDA oder eine Antwort, die niedriger ist als diejenige, die durch die normale Populationsanalyse definiert wird, wird als Toleranz/Anergie („anergy“) angesehen.

[0095] Im allgemeinen können ausgelöste CD4⁺-T-Zellantworten in herkömmlichen proliferativen Assays nachgewiesen werden, während nicht-ausgelöste Antworten in denselben Assays nicht nachweisbar sind. Der Nachweis einer geringen Anzahl von nicht-ausgelösten-T-Zellen ist beschränkt durch Mischung einer Hintergrund-Thymidin-Aufnahme, einschließlich der autologen gemischten Lymphocytantwort (AMLR) auf Selbst-MHC-Antigen plus Antworten auf verarbeitete Selbst-Serumproteine und exogen zugegebene Serumproteine.

[0096] Um nicht-ausgelöste („unprimed“) T-Zellen auszulösen und nachzuweisen, wurde ein Assaysystem für Niedrigfrequenzantworten verwendet, basierend auf Poissonprobenstatistiken (In: Pinnacles, Chiron Corporation, 1: 1–2, 1991). Dieser Typ von Analyse ist insbesondere auf Ereignisse mit niedriger Frequenz dahingehend anwendbar, daß, wenn die Vorläuferfrequenz weniger als die Anzahl von Zellen in einer Replikakultur ist, viele Replikate erforderlich sind, um eine statistisch signifikante Anzahl an Positiven nachzuweisen. Theoretisch wird die Analyse im Hinblick auf autologe Antworten eine Korrektur durchführen, indem eine bekannte positive Kontrolle (wie etwa PHA oder Tetanustoxoid) und eine bekannte negative Kontrolle (kein Antigen) erstellt wird und durch Bewerten aller Datenpunkte vom niedrigsten bis zum höchsten, unabhängig von der experimentellen Gruppe, zu der sie gehören. Ein Cutoff-Wert wird berechnet, basierend auf dem Gleichungscutoff = $M + (F + SD)$, wobei M = arithmetischer Mittelwert, F = 3,29, ein Faktor aus Tabellen einer standardisierten Normalverteilung, der so ausgewählt ist, daß nicht mehr als 0,1% der „echten Negativen“ eines normalverteilten Hintergrundes oberhalb des Cutoff sein werden, und SD = Standardabweichung. In diesem Screening-Assay werden Nüpfen oberhalb des Cutoff als echte Positive angesehen, die potentiell einen Lymphocytentenvorläuferfrequenz möglich sind unter Verwendung dieses Verfahrens, erfordert eine genaue Bestimmung eine formale LDA-Analyse.

BEISPIEL 4

HER-2/NEU-POLYPEPTID-BASIERENDES VACCIN LÖST EINE IMMUNITÄT GEGEN HER-2/NEU-PROTEIN AUS

A. Tiere

[0097] Ratten, die in dieser Studie verwendet wurden, waren Ratten vom Fischer-Stamm 344 (CDF (F-344)/Cr1BR) (Charles River Laboratories, Portage MI). Die Tiere wurden in den Animal-Facilities der University of Washington unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gehalten und routinemäßig für experimentelle Studien im Alter zwischen 3 und 4 Monaten verwendet.

B. Immunisierung

[0098] Fischer-Ratten wurden mit einem rekombinanten Ratten-HER-2/neu-Polypeptid (rHNP) in einer Vielzahl von Adjuvantien (MPL, Vacci; Rib, Bozeman, MT, USA) immunisiert. Tiere erhielten 50 µg rHNP subkutan, gemischt mit einem Adjuvans. 20 Tage später wurden die Tiere mit einer zweiten Immunisierung von 50 µg rHNP geboostet, das auf dieselbe Weise verabreicht wurde. 20 Tage nach der Booster-Immunisierung wurden die Tiere auf die Anwesenheit von Antikörpern getestet, die gegen Ratten-HER-2/neu-Protein (neu) gerichtet waren.

C. Zelllinien

[0099] Zwei Zelllinien wurden als eine Quelle von neu-Proteinen verwendet. SKBR3, eine humane Brustkrebszelllinie, die ein bemerkenswerter Überexprimierer von Ratten-HER-2/neu ist (American Type Culture Collection, Rockville, MD), wurde in Kultur in 10% fötalem bovinem Serum (FBS) (Gemini Bioproducts, Inc., Calabasas, CA) und RPMI gehalten. DHFR-G8, eine NIH/3T3-Zelllinie, die mit cneu-p und psV2-DHFR co-transfiziert worden war (American Type Culture Collection, Rockville, MD), wurde als eine Quelle für nicht-transformierendes Ratten-HER-2/neu-Protein verwendet (Bernards et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6854–6858, 1987). Diese Zelllinie wurde in 10% FBS und Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium mit 4,5 g/L-Glukose gehalten. DHFR-GB-Zellen wurden durch das selbe Medium passagiert, das mit 0,3 µM Methotrexat bei jeder dritten Passage supplementiert war, um den neu-Transfektanten beizubehalten.

D. Herstellung von Zelllysaten

[0100] Lysate von sowohl SKBR3 als auch DHFR-GS wurden hergestellt und als eine Quelle von neu-Protein verwendet. Kurz gesagt wurde ein Lysepuffer, bestehend aus tris-Base, Natriumchlorid und Triton-X (1%), pH 7,5, hergestellt. Protease-Inhibitoren wurden zugegeben; Aprotinin (1 µg/ml), Benzamidin (1 mM) und PMSF (1 mM). 1 ml des Lysepuffer wurde verwendet, um 10^7 Zellen zu suspendieren. Die Zellen wurden für 15 Sekunden alle 10 Minuten über eine Stunde gevortext, bis sie aufgebrochen waren. Alle Prozeduren wurden auf Eis in einem Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Nach Aufbrechen wurden die Zellen bei 4°C für 20 Minuten mikrozentrifugiert. Der Überstand wurde von den Zelltrümmern entfernt und in kleinen Aliquots bei -70°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Anwesenheit von humanem und Ratten-neu in den Lysaten wurde mittels Western-Blot-Analyse dokumentiert.

E. ELISA für Ratten-neu-Antikörper-Antworten

[0101] 96-Napf-Immulon-4-Platten (Baxter SP, Redmond, WA: Dynatech Laboratories) wurden über Nacht bei 4°C mit einem Ratten-neu-spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert (Oncogene Science), 7.16.4, bei einer Konzentration von 10 µg/ml verdünnt in Carbonatpuffer (äquimolare Konzentration von Na₂CO₃ und NaHCO₃, pH 9,6). Nach Inkubation wurden alle Nöpfe mit PBS-1% BSA (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), 100 µl/Napf für 3 Stunden bei Zimmertemperatur blockiert. Die Platte wurde mit PBS-0,5% Tween gewaschen, und Lysate von DHFRG8, einer murinen Zelllinie, die mit Ratten-neu-DNA transfiziert ist (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), eine Quelle von Ratten-neu-Protein, wurden zu alternierenden Reihen zugegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde dann mit PBS-0,5% Tween gewaschen, und experimentelle Seren wurden in folgenden Verdünnungen zugegeben: 1:25–1:200. Die Seren wurden in PBS-1% BSA-1% FBS-25 µg/ml Maus-IgG-0,01% NaN₃ verdünnt und dann seriell in PBS-1% BSA. 50 µl verdünnte Seren wurden zugegeben/Napf und 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Jedes experimentelle Serum wurde zu einem Napf mit Ratten-neu und einem Napf ohne Ratten-neu zugegeben. Schaf-anti-Ratten-Ig-F(ab')₂-Menettichperoxidase (HRP) wurde zu den Nöpfen in einer 1:5000-Verdünnung in PBS-1% BSA zugegeben und für 45 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert (Amersham Co., Arlington Heights, IL, USA). Nach der letzten Waschung wurde TMB (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) -Entwicklungsreagenz zugegeben. Eine Farbreaktion wurde bei einer optischen Dichte von 450 nm abgelesen. Die OD jeder Serumverdünnung wurde als die OD der Ratten-neu-beschichteten Nöpfen minus der OD der PBS-1% BSA-beschichteten Nöpfen berechnet. Seren aus Tieren, die mit den Adjuvantien alleine immunisiert sind, und einem Tier, das mit hHNP immunisiert war (Fremdprotein), wurden ebenso auf eine ähnliche Weise bewertet. Die Resultate werden in [Fig. 3](#) gezeigt.

F. T-Zell-Proliferations-Assay

[0102] Für die Analyse von HER-2/neu-Polypeptid-spezifischen Antworten: frische Milz- oder Lymphknoten-zellen werden mittels mechanischem Aufbrechen und Passage durch ein Drahtgeflecht geerntet und gewaschen. 2×10^5 Milzzellen/Napf und 1×10^5 Lymphknoten-zellen/Napf werden in 96-Napf-Rundboden-Microtiterplatten ausplattiert (Corning, Corning, NY) mit 6 Replika pro experimenteller Gruppe. Das Medium besteht aus EHAA 120 (Biofluids) mit L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, 2-Mercaptoethanol und 5% FBS. Die Zellen werden mit Polypeptiden inkubiert. Nach 4 Tagen werden die Nöpfe mit 1 µCi [³H]Thymidin für 6–8 Stunden gepulst und gezählt. Die Daten werden als ein Stimulationsindex (SI) ausgedrückt, der als der Mittelwert der experimentellen Nöpfe, geteilt durch den Mittelwert der Kontrollnöpfe (kein Antigen), definiert ist. Für die Analyse der HER-2/neu-Protein-spezifischen Antworten: Milz- oder Lymphknoten-zellen werden für 3 in-vitro-Stimulationen kultiviert. Zum Zeitpunkt der Analyse werden 1×10^5 kultiviert Milz- oder Lymphknoten-T-Zellen in 96-Napf-Microtiterplatten, wie oben beschrieben, ausplattiert. Zellen werden mit 1 µg/ml-Immunaффinitätssäule-aufge reinigt

tem-Ratten-neu (aus DHFR-G8-Zellen als die Quelle von Ratten-neu) inkubiert. Nach 4 Tagen werden die Näpfe mit 1 μCi an [^3H]-Thymidin für 6–8 Stunden gepulst und gezählt. Die Daten werden als ein Stimulationsindex ausgedrückt, der als der Mittelwert der experimentellen Näpfe, geteilt durch den Mittelwert der Kontrollnapfe (kein Antigen), definiert ist.

BEISPIEL 5

AUSGELÖSTE ANTWORTEN AUF HUMANES HER-2/NEU-POLYPEPTID KÖNNEN IN PATIENTEN MIT BRUSTKREBS NACHGEWIESEN WERDEN:

[0103] Heparinisiertes Blut wurde aus einem Patienten mit HER-2/neu-überexprimierendem Brustkrebs im Stadium II erhalten. Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden mittels einer Ficoll-Hypaque-Dichte-Zentrifugation abgetrennt. PBMC wurde bei einer Konzentration von 2×10^5 /Napf in 96-Napf-Rundbodenplatten ausplattiert (Corning, Corning, NY, USA). 24-Napf-Replika wurden für jede experimentelle Gruppe durchgeführt. Antigene, bestehend aus HER-2/neu-abgeleiteten Peptiden (15–20 Aminosäuren lang, wobei die Nummer der ersten Aminosäure in der Sequenz aufgelistet ist) 25 $\mu\text{g/ml}$, humanes HER-2/neu-Polypeptid (hHNP) 1 $\mu\text{g/ml}$, Tetanustoxoid 1 $\mu\text{g/ml}$, und p30, einem Peptid, das aus Tetanus stammt, 25 $\mu\text{g/ml}$, wurden zu jedem 24-Napf-Replikat zugegeben. Der Assay wurde in Medium durchgeführt, enthaltend 10% humane Serum. Eine proliferative Antwort von T-Zellen wurde anhand der Aufnahme von (^3H)-Thymidin (1 μCi /Napf) gemessen, das am Tag 4 für 10 Stunden zugegeben wurde. Positive Näpfe, Antigen-reaktive Näpfe, wurden als positiv bewertet, wenn der cpm größer als der Mittelwert und 3 Standardabweichungen der Näpfe ohne Antigen war. Die Resultate werden in [Fig. 4](#) gezeigt. Dieser Brustkrebspatient im Stadium II hat eine signifikante Antwort auf rekombinantes hHNP.

[0104] Anhand des vorgehenden wird es klar sein, daß, obwohl spezifische Ausführungsformen der Erfindung hierin aus Illustrationszwecken beschrieben worden sind, verschiedene Modifikationen gemacht werden können, ohne vom Geist und Umfang der Erfindung abzuweichen.

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: University of Washington

(ii) TITLE OF INVENTION: COMPOUNDS FOR ELICITING OR ENHANCING IMMUNE REACTIVITY TO HER-2/*neu* PROTEIN FOR PREVENTION OR TREATMENT OF MALIGNANCIES IN WHICH THE HER-2/*neu* ONCOGENE IS ASSOCIATED.

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

- (A) ADDRESSEE: SEED and BERRY LLP
- (B) STREET: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue
- (C) CITY: Seattle
- (D) STATE: Washington
- (E) COUNTRY: USA
- (F) ZIP: 98104-7092

(v) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER:
- (B) FILING DATE: 28-MAR-1996
- (C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

- (A) NAME: Sharkey, Richard G.
- (B) REGISTRATION NUMBER: 32.629
- (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 920010.448PC

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

- (A) TELEPHONE: (206) 622-4900
- (B) TELEFAX: (206) 682-6031

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 3768 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 1..3765

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

ATG GAG CTG GCG GCC TTG TGC CGC TGG GGG CTC CTC CTC GCC CTC TTG	48
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu	
1 5 10 15	
CCC CCC GGA GCC GCG AGC ACC CAA GTG TGC ACC GGC ACA GAC ATG AAG	96
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys	
20 25 30	
CTG CGG CTC CCT GCC AGT CCC GAG ACC CAC CTG GAC ATG CTC CGC CAC	144
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His	
35 40 45	
CTC TAC CAG GGC TGC CAG GTG GTG CAG GGA AAC CTG GAA CTC ACC TAC	192
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr	
50 55 60	
CTG CCC ACC AAT GCC AGC CTG TCC TTC CTG CAG GAT ATC CAG GAG GTG	240
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val	
65 70 75 80	
CAG GGC TAC GTG CTC ATC GCT CAC AAC CAA GTG AGG CAG GTC CCA CTG	288
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu	
85 90 95	
CAG AGG CTG CGG ATT GTG CGA GGC ACC CAG CTC TTT GAG GAC AAC TAT	336
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr	
100 105 110	
GCC CTG GCC GTG CTA GAC AAT GGA GAC CCG CTG AAC AAT ACC ACC CCT	384
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro	

115	120	125	
GTC ACA GGG GCC TCC CCA GGA GGC CTG CGG GAG CTG CAG CTT CGA AGC			432
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser			
130	135	140	
CTC ACA GAG ATC TTG AAA GGA GGG GTC TTG ATC CAG CGG AAC CCC CAG			480
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln			
145	150	155	160
CTC TGC TAC CAG GAC ACG ATT TTG TGG AAG GAC ATC TTC CAC AAG AAC			528
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn			
165	170	175	
AAC CAG CTG GCT CTC ACA CTG ATA GAC ACC AAC CGC TCT CGG GCC TGC			576
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys			
180	185	190	
CAC CCC TGT TCT CCG ATG TGT AAG GGC TCC CGC TGC TGG GGA GAG AGT			624
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser			
195	200	205	
TCT GAG GAT TGT CAG AGC CTG ACG CGC ACT GTC TGT GCC GGT GGC TGT			672
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys			
210	215	220	
GCC CGC TGC AAG GGG CCA CTG CCC ACT GAC TGC TGC CAT GAG CAG TGT			720
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys			
225	230	235	240
GCT GCC GGC TGC ACG GGC CCC AAG CAC TCT GAC TGC CTG GCC TGC CTC			768
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu			
245	250	255	
CAC TTC AAC CAC AGT GGC ATC TGT GAG CTG CAC TGC CCA GCC CTG GTC			816
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val			
260	265	270	
ACC TAC AAC ACA GAC ACG TTT GAG TCC ATG CCC AAT CCC GAG GGC CGG			864
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg			
275	280	285	
TAT ACA TTC GGC GCC AGC TGT GTG ACT GCC TGT CCC TAC AAC TAC CTT			912
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu			
290	295	300	

TCT	ACG	GAC	GTG	GGA	TCC	TGC	ACC	CTC	GTC	TGC	CCC	CTG	CAC	AAC	CAA	960
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln	
305					310					315					320	
GAG	GTG	ACA	GCA	GAG	GAT	GGA	ACA	CAG	CGG	TGT	GAG	AAG	TGC	AGC	AAG	1008
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys	
				325					330						335	
CCC	TGT	GCC	CGA	GTG	TGC	TAT	GGT	CTG	GGC	ATG	GAG	CAC	TTG	CGA	GAG	1056
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu	
			340						345						350	
GTG	AGG	GCA	GTT	ACC	AGT	GCC	AAT	ATC	CAG	GAG	TTT	GCT	GGC	TGC	AAG	1104
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys	
		355						360							365	
AAG	ATC	TTT	GGG	AGC	CTG	GCA	TTT	CTG	CCG	GAG	AGC	TTT	GAT	GGG	GAC	1152
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp	
	370						375								380	
CCA	GCC	TCC	AAC	ACT	GCC	CCG	CTC	CAG	CCA	GAG	CAG	CTC	CAA	GTG	TTT	1200
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe	
385					390					395					400	
GAG	ACT	CTG	GAA	GAG	ATC	ACA	GGT	TAC	CTA	TAC	ATC	TCA	GCA	TGG	CCG	1248
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro	
				405					410						415	
GAC	AGC	CTG	CCT	GAC	CTC	AGC	GTC	TTC	CAG	AAC	CTG	CAA	GTA	ATC	CGG	1296
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	
			420						425						430	
GGA	CGA	ATT	CTG	CAC	AAT	GGC	GCC	TAC	TCG	CTG	ACC	CTG	CAA	GGG	CTG	1344
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	
			435					440							445	
GGC	ATC	AGC	TGG	CTG	GGG	CTG	CGC	TCA	CTG	AGG	GAA	CTG	GGC	AGT	GGA	1392
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	
			450				455								460	
CTG	GCC	CTC	ATC	CAC	CAT	AAC	ACC	CAC	CTC	TGC	TTC	GTG	CAC	ACG	GTG	1440
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val	
465						470									480	

CCC TGG GAC CAG CTC TTT CGG AAC CCG CAC CAA GCT CTG CTC CAC ACT Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr 485 490 495	1488
GCC AAC CGG CCA GAG GAC GAG TGT GTG GGC GAG GGC CTG GCC TGC CAC Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His 500 505 510	1536
CAG CTG TGC GCC CGA GGG CAC TGC TGG GGT CCA GGG CCC ACC CAG TGT Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys 515 520 525	1584
GTC AAC TGC AGC CAG TTC CTT CGG GGC CAG GAG TGC GTG GAG GAA TGC Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys 530 535 540	1632
CGA GTA CTG CAG GGG CTC CCC AGG GAG TAT GTG AAT GCC AGG CAC TGT Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys 545 550 555 560	1680
TTG CCG TGC CAC CCT GAG TGT CAG CCC CAG AAT GGC TCA GTG ACC TGT Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys 565 570 575	1728
TTT GGA CCG GAG GCT GAC CAG TGT GTG GCC TGT GCC CAC TAT AAG GAC Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp 580 585 590	1776
CCT CCC TTC TGC GTG GCC CGC TGC CCC AGC GGT GTG AAA CCT GAC CTC Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu 595 600 605	1824
TCC TAC ATG CCC ATC TGG AAG TTT CCA GAT GAG GAG GGC GCA TGC CAG Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln 610 615 620	1872
CCT TGC CCC ATC AAC TGC ACC CAC TCC TGT GTG GAC CTG GAT GAC AAG Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys 625 630 635 640	1920
GGC TGC CCC GCC GAG CAG AGA GCC AGC CCT CTG ACG TCC ATC ATC TCT Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser 645 650 655	1968
GCG GTG GTT GGC ATT CTG CTG GTC GTG GTC TTG GGG GTG GTC TTT GGG	2016

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly 660 665 670	
ATC CTC ATC AAG CGA CGG CAG CAG AAG ATC CGG AAG TAC ACG ATG CGG Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg 675 680 685	2064
AGA CTG CTG CAG GAA ACG GAG CTG GTG GAG CCG CTG ACA CCT AGC GGA Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly 690 695 700	2112
GCG ATG CCC AAC CAG GCG CAG ATG CGG ATC CTG AAA GAG ACG GAG CTG Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu 705 710 715 720	2160
AGG AAG GTG AAG GTG CTT GGA TCT GGC GCT TTT GGC ACA GTC TAC AAG Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys 725 730 735	2208
GGC ATC TGG ATC CCT GAT GGG GAG AAT GTG AAA ATT CCA GTG GCC ATC Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile 740 745 750	2256
AAA GTG TTG AGG GAA AAC ACA TCC CCC AAA GCC AAC AAA GAA ATC TTA Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu 755 760 765	2304
GAC GAA GCA TAC GTG ATG GCT GGT GTG GGC TCC CCA TAT GTC TCC CGC Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg 770 775 780	2352
CTT CTG GGC ATC TGC CTG ACA TCC ACG GTG CAG CTG GTG ACA CAG CTT Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu 785 790 795 800	2400
ATG CCC TAT GGC TGC CTC TTA GAC CAT GTC CGG GAA AAC CGC GGA CGC Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg 805 810 815	2448
CTG GGC TCC CAG GAC CTG CTG AAC TGG TGT ATG CAG ATT GCC AAG GGG Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly 820 825 830	2496
ATG AGC TAC CTG GAG GAT GTG CGG CTC GTA CAC AGG GAC TTG GCC GCT Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala	2544

835	840	845	
CGG AAC GTG CTG GTC AAG AGT CCC AAC CAT GTC AAA ATT ACA GAC TTC			2592
Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe			
850	855	860	
GGG CTG GCT CGG CTG CTG GAC ATT GAC GAG ACA GAG TAC CAT GCA GAT			2640
Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp			
865	870	875	880
GGG GGC AAG GTG CCC ATC AAG TGG ATG GCG CTG GAG TCC ATT CTC CGC			2688
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg			
885	890	895	
CGG CGG TTC ACC CAC CAG AGT GAT GTG TGG AGT TAT GGT GTG ACT GTG			2736
Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val			
900	905	910	
TGG GAG CTG ATG ACT TTT GGG GCC AAA CCT TAC GAT GGG ATC CCA GCC			2784
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala			
915	920	925	
CGG GAG ATC CCT GAC CTG CTG GAA AAG GGG GAG CGG CTG CCC CAG CCC			2832
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro			
930	935	940	
CCC ATC TGC ACC ATT GAT GTC TAC ATG ATC ATG GTC AAA TGT TGG ATG			2880
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met			
945	950	955	960
ATT GAC TCT GAA TGT CGG CCA AGA TTC CGG GAG TTG GTG TCT GAA TTC			2928
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe			
965	970	975	
TCC CGC ATG GCC AGG GAC CCC CAG CGC TTT GTG GTC ATC CAG AAT GAG			2976
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu			
980	985	990	
GAC TTG GGC CCA GCC AGT CCC TTG GAC AGC ACC TTC TAC CGC TCA CTG			3024
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu			
995	1000	1005	
CTG GAG GAC GAT GAC ATG GGG GAC CTG GTG GAT GCT GAG GAG TAT CTG			3072
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu			
1010	1015	1020	

GTA CCC CAG CAG GGC TTC TTC TGT CCA GAC CCT GCC CCG GGC GCT GGG Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly 1025 1030 1035 1040	3120
GGC ATG GTC CAC CAC AGG CAC CGC AGC TCA TCT ACC AGG AGT GGC GGT Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly 1045 1050 1055	3168
GGG GAC CTG ACA CTA GGG CTG GAG CCC TCT GAA GAG GAG GCC CCC AGG Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg 1060 1065 1070	3216
TCT CCA CTG GCA CCC TCC GAA GGG GCT GGC TCC GAT GTA TTT GAT GGT Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly 1075 1080 1085	3264
GAC CTG GGA ATG GGG GCA GCC AAG GGG CTG CAA AGC CTC CCC ACA CAT Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His 1090 1095 1100	3312
GAC CCC AGC CCT CTA CAG CGG TAC AGT GAG GAC CCC ACA GTA CCC CTG Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu 1105 1110 1115 1120	3360
CCC TCT GAG ACT GAT GGC TAC GTT GCC CCC CTG ACC TGC AGC CCC CAG Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln 1125 1130 1135	3408
CCT GAA TAT GTG AAC CAG CCA GAT GTT CGG CCC CAG CCC CCT TCG CCC Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro 1140 1145 1150	3456
CGA GAG GGC CCT CTG CCT GCT GCC CGA CCT GCT GGT GCC ACT CTG GAA Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu 1155 1160 1165	3504
AGG CCC AAG ACT CTC TCC CCA GGG AAG AAT GGG GTC GTC AAA GAC GTT Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val 1170 1175 1180	3552
TTT GCC TTT GGG GGT GCC GTG GAG AAC CCC GAG TAC TTG ACA CCC CAG Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln 1185 1190 1195 1200	3600

GGA GGA GCT GCC CCT CAG CCC CAC CCT CCT CCT GCC TTC AGC CCA·GCC 3648
 Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala
 1205 1210 1215

TTC GAC AAC CTC TAT TAC TGG GAC CAG GAC CCA CCA GAG CGG GGG GCT 3696
 Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala
 1220 1225 1230

CCA CCC AGC ACC TTC AAA GGG ACA CCT ACG GCA GAG AAC CCA GAG TAC 3744
 Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

CTG GGT CTG GAC GTG CCA GTG TGA 3768
 Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1255 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
 275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430
 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
 965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu
 1010 1015 1020

Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly
 1025 1030 1035 1040

Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly
 1045 1050 1055

Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg
 1060 1065 1070

Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly
 1075 1080 1085

Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His
 1090 1095 1100

Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu
 1105 1110 1115 1120

Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln
 1125 1130 1135

Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro
 1140 1145 1150

Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu
 1155 1160 1165

Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val
 1170 1175 1180

Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln
 1185 1190 1195 1200

Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala
 1205 1210 1215

Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala
 1220 1225 1230

Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 48 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

TCTGGCGCGC TGGATGACGA TGACAAGAAA CGACGGCAGC AGAAGATC

48

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 39 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

TGAATTCTCG AGTCATTACA CTGGCACGTC CAGACCCAG

39

Patentansprüche

1. Eine Zusammensetzung, umfassend einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel in Kombination mit einem Polypeptid, das von einer DNA-Sequenz der Nukleotide 2026 bis 3765 von SEQ ID NO: 1 kodiert wird, zur Immunisierung eines warmblütigen Tieres gegen eine bösartige Erkrankung, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Lysin, Aminosäure 676, bis Valin, Aminosäure 1255, hat, oder eine Variante davon, die wenigstens eine äquivalente Immunantwort erzeugt.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Aminosäure 676 bis Aminosäure 1255 hat.

4. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eines Polypeptids der Zusammensetzung zur Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines warmblütigen Tieres gegen eine bösartige Erkrankung, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist.

5. Ein Nukleinsäuremolekül zur Immunisierung durch Transfizieren der Zellen eines warmblütigen Tieres mit dem Nukleinsäuremolekül, wobei besagtes Nukleinsäuremolekül die Expression eines Polypeptids steuert, das von einer DNA-Sequenz der Nukleotide 2026 bis 3765 von SEQ ID NO: 1 kodiert ist.

6. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5, wobei die Zellen ex vivo transfiziert werden, zur darauffolgenden Verabreichung an das Tier.

7. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls zur Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines warmblütigen Tieres gegen eine bösartige Erkrankung, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist, wobei besagtes Nukleinsäuremolekül die Expression eines Polypeptids steuert, das von einer DNA-Sequenz der Nu-

kleotide 2026 bis 3765 von SEQ ID NO: 1 kodiert wird.

8. Ein viraler Vektor zur Immunisierung durch Infizieren der Zellen eines warmblütigen Tieres mit dem Vektor, wobei besagter viraler Vektor die Expression eines Polypeptids steuert, das von einer DNA-Sequenz der Nukleotide 2026 bis 3765 von SEQ ID NO: 1 kodiert wird.

9. Viraler Vektor nach Anspruch 8, wobei die Zellen ex vivo infiziert werden, zur darauffolgenden Verabreichung an das Tier.

10. Verwendung eines viralen Vektors zur Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines warmblütigen Tieres gegen eine bösartige Erkrankung, bei der das HER-2/neu-Oncogen assoziiert ist, wobei besagter viraler Vektor die Expression eines Polypeptids steuert, das von einer DNA-Sequenz der Nukleotide 2026 bis 3765 von SEQ ID NO: 1 kodiert wird.

11. Eine Zusammensetzung, umfassend einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel in Kombination mit einem Polypeptid, das von einer DNA-Sequenz der Nukleotide 2026 bis 3765 von SEQ ID NO: 1 kodiert wird, zum Auslösen oder Verstärken einer Immunantwort auf das HER-2/neu-Protein.

12. Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Lysin, Aminosäure 676, bis Valin, Aminosäure 1255, hat, oder eine Variante davon, die wenigstens eine äquivalente Immunantwort erzeugt.

13. Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Aminosäure 676 bis Aminosäure 1255 hat.

14. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 11, 12 oder 13, zur Herstellung eines Medikaments zum Auslösen oder Verstärken einer Immunantwort auf HER-2/neu-Protein.

15. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5, zum Auslösen oder Verstärken einer Immunantwort auf HER-2/neu-Protein.

16. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 5 zur Herstellung eines Medikaments zum Auslösen oder Verstärken einer Immunantwort auf HER-2/neu-Protein.

17. Nukleinsäuremolekül oder Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 5 bis 7, 15 oder 16, wobei das kodierte Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Lysin, Aminosäure 676, bis Valin, Aminosäure 1255, hat, oder eine Variante davon, die wenigstens eine äquivalente Immunantwort erzeugt.

18. Nukleinsäuremolekül oder Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 5 bis 7, 15 oder 16, wobei das kodierte Polypeptid die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 von Aminosäure 676 bis Aminosäure 1255 hat.

19. Viraler Vektor nach Anspruch 8 zum Auslösen oder Verstärken einer Immunantwort auf HER-2/neu-Protein.

20. Verwendung eines viralen Vektor nach Anspruch 8 zur Herstellung eines Medikaments zum Auslösen oder Verstärken einer Immunantwort auf HER-2/neu-Protein.

21. Viraler Vektor oder Verwendung eines viralen Vektors nach einem der Ansprüche 8 bis 10, 19 oder 20, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Lysin, Aminosäure 676, bis Valin, Aminosäure 1255, hat, oder eine Variante davon, die wenigstens eine äquivalente Immunantwort erzeugt.

22. Viraler Vektor oder Verwendung eines viralen Vektors nach einem der Ansprüche 8 bis 10, 19 oder 20, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 von Aminosäure 676 bis Aminosäure 1255 hat.

23. Zusammensetzung oder Verwendung davon nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder 11 bis 14, wobei das Polypeptid mit einem Peptid oder einem Polypeptid verbunden ist.

24. Zusammensetzung oder Verwendung davon nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder 11 bis 14, wobei das Polypeptid trunkiert ist.

25. Zusammensetzung nach Anspruch 24, wobei das Polypeptid mit einem Peptid oder einem Polypeptid verbunden ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

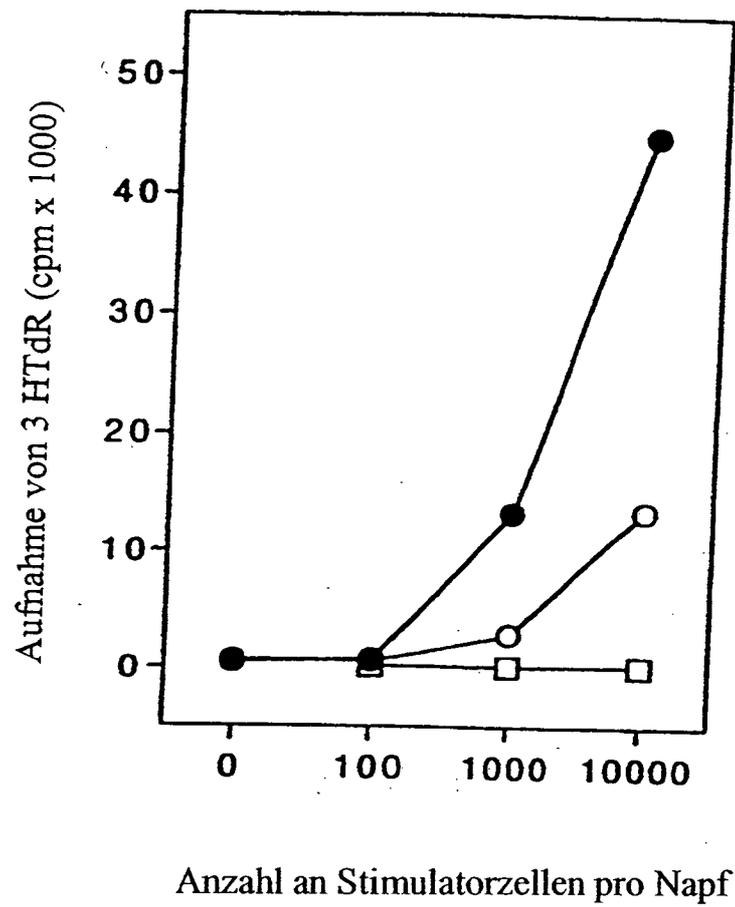


Fig. 1

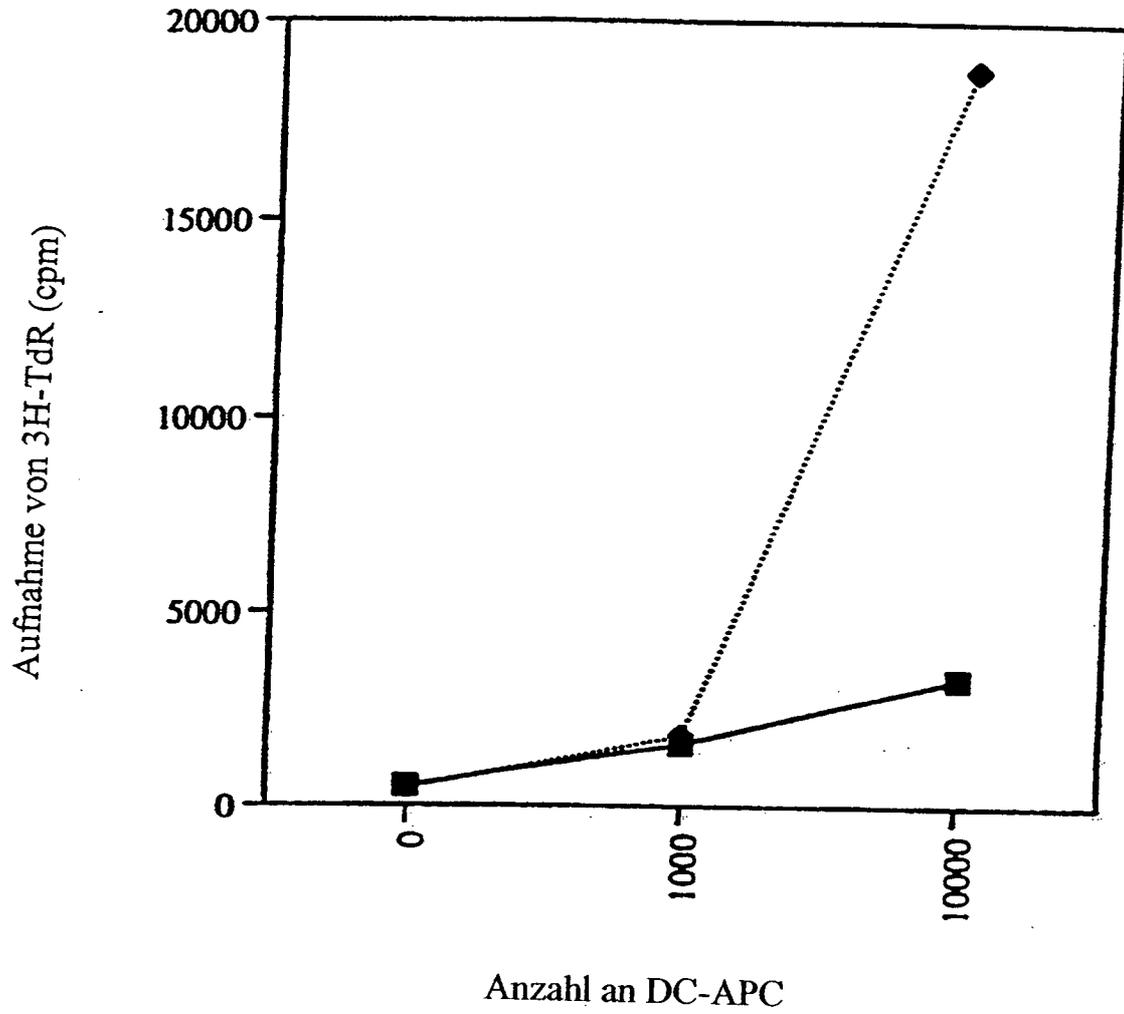


Fig. 2

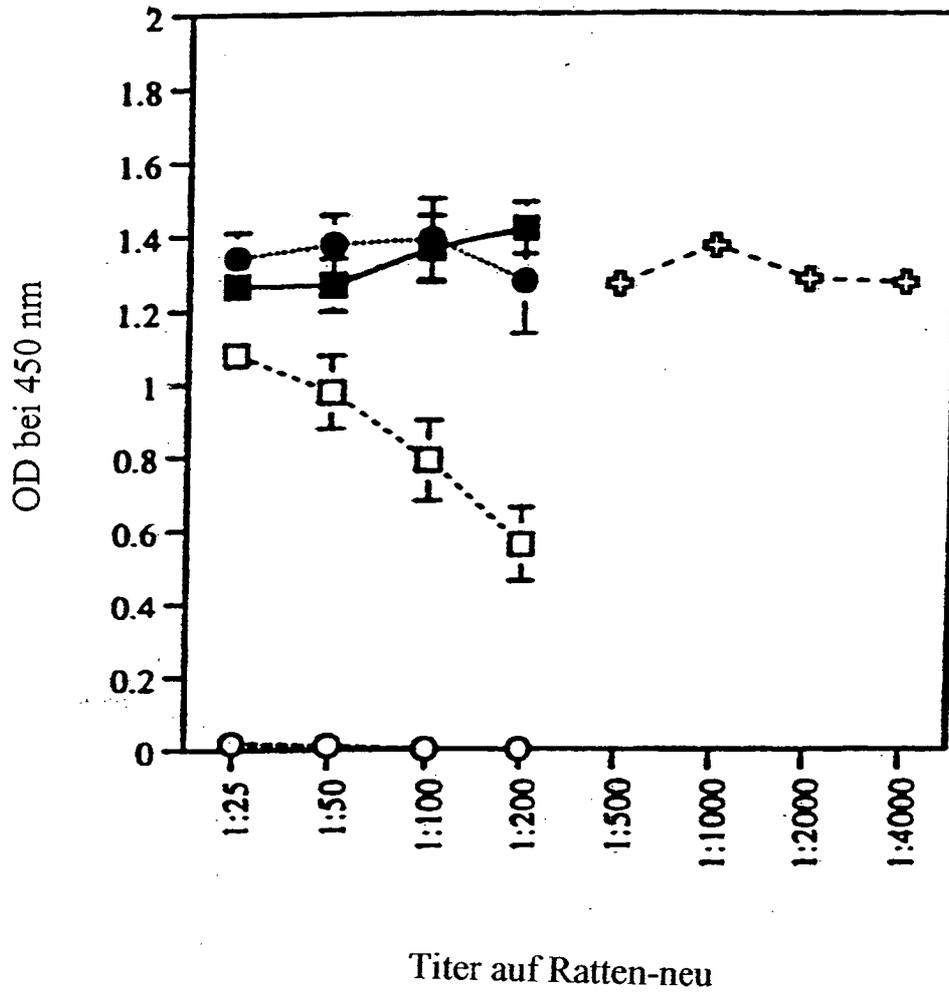


Fig. 3

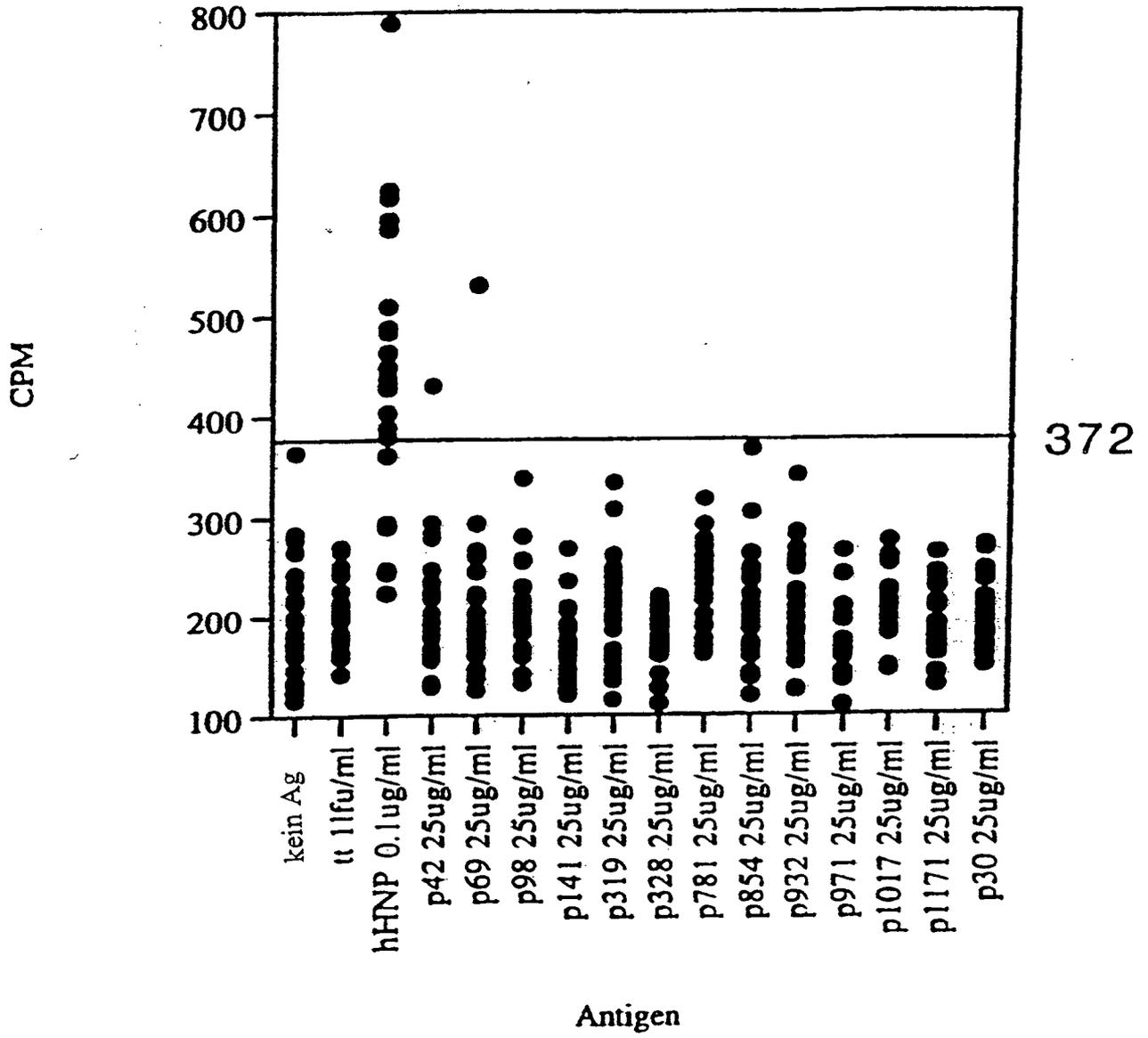


Fig. 4