

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508157

(P2005-508157A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 5 0
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 B O 6 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	4 B O 6 5
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 327 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-525655 (P2003-525655)	(71) 出願人	500553659
(86) (22) 出願日	平成14年8月30日 (2002.8.30)		アジェンシス、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月26日 (2004.2.26)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 904
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/027760		04, サンタ モニカ, 17ティーエイチ
(87) 国際公開番号	W02003/020954		ストリート 1545
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003.3.13)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/316, 664		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001.8.31)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	チャリッターイド, ビア エム.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 914
			36, エンチノ, モリソン ストリー
			ト 15745
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の処置および検出において有用な205P1B5との名称の核酸および対応するタンパク質

(57) 【要約】

新規遺伝子 (205P1B5 と称される) およびそのコードタンパク質が記載される。205P1B5 は、正常な成体組織における組織特異的発現を示すとはいえ、これは、前立腺癌において異常に発現される。その結果、205P1B5 は、癌に対する診断的、予後的、予防的および／または治療的な標的を提供する。205P1B5 遺伝子もしくはそのフラグメント、またはそれらのコードタンパク質もしくはそれらのフラグメントは、免疫応答を惹起するために使用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物であって、以下：

a) 図 2 (配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19 および 21) のタンパク質の状態を調節する物質、または b) 図 2 のタンパク質によって調節され、それによって図 2 のタンパク質を発現する細胞の状態が調節される分子を含む、組成物。

【請求項 2】

生理学的に受容可能なキャリアをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

ヒト単位用量形態で請求項 1 に記載の組成物を含む、薬学的組成物。

【請求項 4】

前記物質が、図 2 のタンパク質に関するタンパク質に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

モノクローナルである、請求項 4 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 6】

ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 4 に記載の抗体を産生する、非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項 9】

図 2 (配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19 および 21) のタンパク質を発現する細胞に細胞傷害性薬剤または診断剤を送達する方法であって、該方法は：請求項 4 に記載の抗体またはそのフラグメントに結合体化した該細胞傷害性薬剤または該診断剤を提供する工程；および該細胞を抗体－薬剤結合体またはフラグメント－薬剤結合体に曝露する工程を包含する、方法。

【請求項 10】

前記物質が、抗体またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含み、該抗体またはそのフラグメントのいずれかが、図 2 のタンパク質に免疫特異的に結合する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記物質が、図 2 のタンパク質に関するタンパク質を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

図 2 (配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19 および 21) に示されるアミノ酸配列全体に対して少なくとも 90% 相同性である、請求項 11 に記載のタンパク質。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記物質が以下：

a) 図 2 のタンパク質のうちの 8 個、9 個、10 個または 11 個連続したアミノ酸のペプチド；
b) 表 V～表 X V I I I (配列番号 46～1711) に記載のペプチド；
c) 表 X X I I ～表 X L V I I (配列番号 1712～12547) に記載のペプチド；または
d) 表 X L V I I I ～表 L I (配列番号 12548～15017) に記載のペプチドを含む、組成物。

【請求項 14】

前記物質が、図 2 (配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19 および 21

10

20

30

40

50

）のタンパク質のアミノ酸配列由来の C T L ポリペプチドまたはそのアナログを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の組成物であって、ただし、エピトープは、図 2（配列番号）のアミノ酸配列全体ではない、組成物。

【請求項 1 6】

前記物質が、表 V～表 X V I I I（配列番号 4 6～1 7 1 1）に記載される C T L ポリペプチドを含む、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の組成物であって、ただし、前記ポリペプチドは、図 2（配列番号 3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9 および 2 1）のタンパク質のアミノ酸配列全体ではない、組成物。 10

【請求項 1 8】

前記物質が、図 2（配列番号 3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9 および 2 1）のアミノ酸配列由来の抗体ポリペプチドエピトープを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の組成物であって、ただし、前記エピトープは、図 2（配列番号 3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9 および 2 1）のアミノ酸配列全体ではない、組成物。

【請求項 2 0】

前記抗体エピトープが、前記ペプチドの末端まで任意の整数で増える、図 2（配列番号 3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9 および 2 1）のうちの少なくとも 5 アミノ酸のペプチド領域を含み、ここで該エピトープが、以下： 20

- a) 図 5 のヒドロパシープロファイルにおいて 0. 5 よりも大きい値を有するアミノ酸位置；
 - b) 図 6 のヒドロパシープロファイルにおいて 0. 5 よりも小さい値を有するアミノ酸位置；
 - c) 図 7 の接触可能残基の % のプロファイルにおいて 0. 5 よりも大きい値を有するアミノ酸位置；
 - d) 図 8 の平均可焼性プロファイルにおいて 0. 5 よりも大きい値を有するアミノ酸位置 30
 - e) 図 9 の β -ターンプロファイルにおいて 0. 5 よりも大きい値を有するアミノ酸位置；
 - f) a) ～ e) のうちの少なくとも 2 つの組み合わせ；
 - g) a) ～ e) のうちの少なくとも 3 つの組み合わせ；
 - h) a) ～ e) のうちの少なくとも 4 つの組み合わせ；または
 - i) a) ～ e) のうちの 5 つの組み合わせ；
- から選択されるアミノ酸位置を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の組成物であって、ただし、前記エピトープは、図 2（配列番号 3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9 および 2 1）のアミノ酸配列全体ではない、組成物。 40

【請求項 2 2】

請求項 1 1 に記載のタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2 3】

図 2 に記載の核酸分子を含む、請求項 2 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 に記載のポリヌクレオチドであって、ただし、前記コードされたタンパク質は、図 2（配列番号 3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9 および 2 1）のアミノ酸配列全体ではない、ポリヌクレオチド。 50

【請求項 25】

T が U で置換されている、請求項 22 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 26】

前記物質が、図 2（配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 および 20）の核酸配列のコード配列を含むポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 27】

請求項 11 に記載のさらなるタンパク質をコードするさらなるヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 22 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項 22 に記載のポリヌクレオチドに対して完全に相補的であるポリヌクレオチドを含む、組成物。 10

【請求項 29】

請求項 25 に記載のポリヌクレオチドに完全に相補的であるポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 30】

請求項 27 に記載のポリヌクレオチドに完全に相補的であるポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 31】

前記物質が、a) 205 P1 B5 コード配列を有するポリヌクレオチドを切断するリボザイム、または b) 該リボザイムをコードする核酸分子；および生理学的に受容可能なキャリアを含む、請求項 1 に記載の組成物。 20

【請求項 32】

前記物質がヒト T 細胞を含み、該 T 細胞が、特定の HLA 分子の状況において 205 P1 B5 ペプチド部分配列を特異的に認識する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 33】

図 2 のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法が、該細胞に請求項 1 に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 34】

図 2 のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する請求項 33 に記載の方法であって、該方法が： 30

該細胞に、抗体またはそのフラグメントを投与する工程を包含し、該抗体またはそのフラグメントのいずれかが、205 P1 B5 関連タンパク質に特異的に結合する、方法。

【請求項 35】

図 2 のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する請求項 33 に記載の方法であって、該方法は：

該細胞に、205 P1 B5 関連タンパク質を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 36】

図 2 のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する請求項 33 に記載の方法であって、該方法は： 40

該細胞に、205 P1 B5 関連タンパク質のコード配列を含むポリヌクレオチド、または 205 P1 B5 関連タンパク質のコード配列に相補的であるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項 37】

図 2 のタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する請求項 33 に記載の方法であって、該方法は：

該細胞に、図 2 のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを切断するリボザイムを投与する工程

を包含する、方法。

【請求項 38】

図 2 のタンパク質および特定の H L A 分子を発現する癌細胞の増殖を阻害する請求項 33 に記載の方法であって、該方法は：

ヒト T 細胞を該癌細胞に投与する工程であって、該 T 細胞が図 2 のタンパク質のペプチド部分配列を特異的に認識する一方で、該部分配列が特定の H L A 分子の状況にある、工程を包含する、方法。

【請求項 39】

請求項 33 に記載の方法であって、該方法が：

単鎖モノクローナル抗体をコードするヌクレオチドを送達するベクターを投与し、それにより、該コードされた単鎖抗体が、図 2 のタンパク質を発現する癌細胞内で細胞内発現される、工程を包含する、方法。 10

【請求項 40】

図 2 のタンパク質に対する哺乳動物免疫応答を生じる方法であって、該方法は：
該哺乳動物の免疫系の細胞を、以下：

a) 205P1B5 関連タンパク質および／または

b) 該タンパク質をコードするヌクレオチド配列

の一部分に曝露し、それにより、該タンパク質に対する免疫応答が生じる工程を包含する、方法。 20

【請求項 41】

請求項 40 に記載の免疫応答を生じる方法であって、該方法は：

少なくとも 1 つの T 細胞エピトープまたは少なくとも 1 つの B 細胞エピトープを含む 205P1B5 関連タンパク質を提供する工程；および

該エピトープを哺乳動物免疫系の T 細胞または B 細胞とそれぞれ接触させ、それによって該 T 細胞または B 細胞が活性化される工程、
を包含する、方法。

【請求項 42】

前記免疫系細胞が B 細胞であり、それによって誘導された B 細胞が前記 205P1B5 関連タンパク質に特異的に結合する抗体を生成する、請求項 41 に記載の方法。 30

【請求項 43】

前記免疫系細胞が、細胞傷害性 T 細胞 (C T L) である T 細胞であり、それによって活性化された C T L が、前記 205P1B5 関連タンパク質を発現する自己細胞を殺傷する、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

前記免疫系細胞が、ヘルパー T 細胞 (H T L) である T 細胞であり、それによって前記活性化 H T L が、細胞傷害性 T 細胞 (C T L) の細胞傷害活性または B 細胞の抗体産生活性を促進するサイトカインを分泌する、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 45】

サンプル中の 205P1B5 関連タンパク質または 205P1B5 関連ポリヌクレオチドの存在を検出するための方法であって、該方法は： 40

該サンプルを、205P1B5 関連タンパク質または 205P1B5 関連ポリヌクレオチドとそれぞれ特異的に結合する請求項 1 に記載の物質と接触させる工程；および

それぞれ該物質と該 205P1B5 関連タンパク質との複合体、または該物質と該 205P1B5 関連ポリヌクレオチドとの複合体が存在するか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項 46】

サンプル中の 205P1B5 関連タンパク質の存在を検出するための請求項 45 に記載の方法であって、該方法は：

該サンプルを、抗体またはそのフラグメントと接触させる工程であって、該抗体またはそ 50

のフラグメントのいずれかが該 2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質と特異的に結合する、工程；および

該抗体またはそのフラグメントと該 2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質との複合体が存在するか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項 4 7】

癌を有しているかまたは癌を有する疑いのある患者からサンプルを採取する工程をさらに包含する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

サンプル中の図 2 のタンパク質の m R N A の存在を検出するための請求項 4 5 に記載の方法であって、該方法は： 10

少なくとも 1 つのプライマーを用いた逆転写によって該サンプルから c D N A を生成する工程；

2 0 5 P 1 B 5 ポリヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして使用してこのように生成された c D N A を増幅させる工程であって、該センスプライマーおよび該アンチセンスプライマーとして使用された該 2 0 5 P 1 B 5 ポリヌクレオチドが、2 0 5 P 1 B 5 c D N A を増幅させるために役立つ、工程；ならびに

該増幅された 2 0 5 P 1 B 5 c D N A の存在を検出する工程、
を包含する、方法。

【請求項 4 9】

20

癌を有しているかまたは癌を有する疑いのある患者由来の生物学的サンプルにおいて 1 つ以上の 2 0 5 P 1 B 5 遺伝子産物をモニタリングするための請求項 4 5 に記載の方法であって、該方法は：

個体由来の組織サンプル中の細胞によって発現される 1 つ以上の 2 0 5 P 1 B 5 遺伝子産物の状態を決定する工程；

このように決定された状態を、対応する正常なサンプルにおける 1 つ以上の 2 0 5 P 1 B 5 遺伝子産物の状態と比較する工程；および

該正常なサンプルに対する該サンプル中の 2 0 5 P 1 B 5 の 1 つ以上の異常な遺伝子産物の存在を同定する工程、

を包含する、方法。

30

【請求項 5 0】

2 0 5 P 1 B 5 m R N A または 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の 1 つ以上の上昇した遺伝子産物が存在するか否かを決定する工程をさらに包含し、それによって前記正常な組織サンプルと比較した前記試験サンプル中の 1 つ以上の上昇した遺伝子産物の存在が、癌の存在または状態を示す、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記癌が、表 I に記載の組織中で生じる、請求項 5 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

40

（発明の分野）

本明細書中に記載される発明は、2 0 5 P 1 B 5 と称される新規な遺伝子およびそのコードタンパク質、ならびに 2 0 5 P 1 B 5 を発現する種々の癌の管理において有用な診断方法および治療方法、ならびに組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

（発明の背景）

癌は、冠状動脈疾患（c o r o n a r y d i s e a s e）に次いで、ヒトの第 2 位の死因である。全世界では、数百万の人々が、毎年癌により死亡している。米国単独では、A m e r i c a n C a n c e r S o c i e t y によって報告されるように、癌は毎年 5 50

0万人をはるかに超える人々の死亡を引き起こしており、毎年120万あまりの新たな症例が診断されている。心臓疾患による死亡は顕著に減少している一方で、癌に起因する死亡は、一般に増加傾向にある。次世紀の初期には、癌は主な死因になると予測されている。

【0003】

全世界で、いくつかの癌が主要な死因(killer)として顕著である。特に、肺、前立腺、胸部、結腸、膵臓、および卵巣の癌腫は、癌による主な死因を代表する。これらおよび事実上全ての他の癌腫は、共通の致死的特徴を共有している。ごくわずかな例外はあるが、癌腫が原因の転移性疾患は、致命的である。さらに、初期段階ではその原発性癌を生き延びた癌患者についてすら、その生活が劇的に変化したという共通の経験が示されている。多くの癌患者は、再発または処置の失敗についての可能性を認識することによって駆り立てられる、強い不安を経験している。多くの癌患者は、処置後に肉体的衰弱を経験している。さらに、多くの癌患者は、再発を経験している。

10

【0004】

全世界で、前立腺癌は、男性において4番目に最も優勢な癌である。北アメリカおよび北欧では、前立腺癌は、男性において断然最も一般的な癌であり、そして男性における癌による死亡の第2位の原因である。米国単独では、肺癌に次いで、30,000人をはるかに超える男性がこの疾患で毎年死亡している。これらの数字の規模にもかかわらず、転移性の前立腺癌に対する有効な処置は未だ存在しない。外科的前立腺切除、放射線療法、ホルモン除去(hormone ablation)療法、外科的去勢および化学療法は、主要な処置様式であり続けている。不運にも、これらの処置は、多くの者にとって無効であり、かつしばしば、所望されない結果を伴う。

20

【0005】

診断現場において、初期段階の局所腫瘍を正確に検出し得る前立腺腫瘍マーカーが存在しないことは、この疾患の診断および管理における大きな限界を残している。血清の前立腺特異抗原(PSA)アッセイは非常に有用なツールであるが、その特異性および一般的有用性は、いくつかの重大な点が欠如していると広く考えられている。

【0006】

前立腺癌についてのさらなる特異的マーカーを同定することにおける進歩は、マウスにおいてこの疾患の異なる病期を再現し得る前立腺癌異種移植片の生成により改善されてきた。LAPC(Los Angeles Prostate Cancer)異種移植片は、重症複合型免疫不全(SCID)マウスにおける継代を生き延び、かつアンドロゲン依存性からアンドロゲン非依存性への移行を模倣する能力を示した、前立腺癌異種移植片である(Kleinら、1997、Nat. Med. 3:402)。より近年同定された前立腺癌マーカーとしては、以下が挙げられる:PCTA-1(Suら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7252)、前立腺特異膜(PSM)抗原(Pintoら、Clin Cancer Res 1996年9月2日(9):1445-51)、STEAP(Hubertら、Proc Natl Acad Sci USA 1999年12月7日;96(25):14523-8)および前立腺幹細胞抗原(PSCA)(Reiterら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1735)。

30

40

【0007】

PSA、PSM、PCTAおよびPSCAのような以前に同定されたマーカーは、前立腺癌を診断してこれを処置する取り組みを促進したが、診断および治療をさらに改善するために、前立腺癌および関連する癌に対するさらなるマーカーおよび治療標的を同定する必要がある。

【0008】

腎臓細胞癌腫(RCC)は、成人悪性疾患の約3%を占める。一旦、腺腫が直径2~3cmに到達すると、悪性疾患の潜在性が存在する。成人では、2つの主な悪性腎臓腫瘍は、腎臓細胞の腺腫および腎盂または尿管の移行細胞癌腫である。腎臓細胞腺癌の発生数は、

50

米国で29,000症例を超えると見積もられており、そして1998年にこの疾患によって11,600人を超える患者が死亡した。移行細胞癌腫は、それほど頻繁ではなく、米国において1年あたり約500症例ほどの発生数である。

【0009】

手術は、何十年もの間、腎臓細胞腺癌の主な治療法であった。近年まで、転移性疾患は、あらゆる全身性治療に対して難治性であった。全身治療（特に、免疫治療）の近年の開発に伴ない、転移性腎臓細胞癌腫は、耐久性のある応答の可能性を伴って、適切な患者において攻撃的にアプローチされ得る。それにもかかわらず、これらの患者に対する有効な治療の必要性が存在し続けている。

【0010】

米国における癌の全ての新しい症例のうち、膀胱癌は、男性において約5%（最も一般的な新生物の5番目）および女性において3%（最も一般的な新生物の8番目）に相当する。発生数はゆるやかに増加し、高齢人口の増加と一致する。1998年には、男性における39,500症例および女性における15,000症例を含め、推定54,500症例が存在した。米国における年齢調整された（age-adjusted）発生率は、男性について100,000人当たり32人、および女性において100,000人当たり8人である。3:1の歴史的な男性/女性比は、女性における喫煙パターンに関連して減少し得る。1998年に膀胱癌で推定11,000人が死亡した（男性7,800人および女性3,900人）。膀胱癌発生率および死亡率は、年齢に伴って大きく増加し、そして集団がより高齢化するにつれて問題も増す。

10

20

【0011】

大部分の膀胱癌は、膀胱中で再発する。膀胱癌は、膀胱の経尿道的切除術（TUR）と膀胱内化学療法または免疫療法との組み合わせを用いて管理される。膀胱癌の多病巣性の性質および再発性の性質は、TURの限界を指摘する。大部分の筋肉侵襲性癌は、TUR単独では治癒しない。根治的膀胱切除術および尿再交通（urinary diversion）は、癌を切除するための最も効果的な手段であるが、尿の機能および性的機能に対して否定できない影響を保有する。膀胱癌患者に有益な処置様式の顕著な必要性が存在し続けている。

【0012】

米国で2000年では、93,800症例の結腸癌および36,400症例の直腸癌を含め、推定130,200症例の結腸直腸癌が生じた。結腸直腸癌は、男性および女性における三番目に一般的な癌である。発生率は、1992年～1996年の間、有意に減少した（1年あたり-2.1%）。調査は、これらの減少が、ポリープが侵襲性癌へと進行するのを予防する、スクリーニングおよびポリープ除去の増加に起因していることを示唆する。2000年には推定56,300人の死亡者（47,700人は結腸癌、8,600人は直腸癌による）が存在し、米国での癌死亡者全体の約11%を占めた。

30

【0013】

現在、手術が、結腸直腸癌、および広がっていない癌のための最も一般的な治療形態であり、これは頻繁に治癒的である。化学療法または化学療法に加えての放射線照射は、癌が腸壁に深く穿孔しているかまたはリンパ節に広がっている大部分の患者に対して手術前または手術後に提供される。永久的な人工肛門形成（身体の排泄物を除去するための腹部開口部の形成）は、結腸癌について時折必要とされ、そして直腸癌については頻繁に要求される。結腸直腸癌についての効果的な診断様式および処置様式の必要性が存在し続けている。

40

【0014】

2000年には、肺癌および気管支癌の推定164,100の新たな症例が存在し、これは、米国癌診断全体の14%を占めた。肺癌および気管支癌の発生率は、1984年の100,000人中86.5人という高さから1996年の70.0人へと、男性において有意に減少している。1990年代、女性の間での増加率は低下し始めた。1996年には、女性における発生率は、100,000人中42.3人であった。

50

【0015】

肺癌および気管支癌は、2000年に推定156,900人の死亡者を生じ、これは、癌死亡者全体の28%を占めた。1992年～1996年の間、肺癌による死亡率は、男性の間で有意に減少した（1年当たり-1.7%）一方で、女性についての死亡率は依然として有意に増加している（1年当たり0.9%）。1987年以来、より多くの女性が乳癌よりも肺癌によって毎年死亡しており、40年よりも長期にわたって、女性における癌による死亡の主な原因であった。肺癌発生率および死亡率の減少は、過去30年にわたる喫煙率の減少に起因している可能性が最も高い；しかし、女性の間での喫煙パターンの減少は、男性の減少に遅れている。成体におけるタバコの使用の減少が鈍くなっているが、若者におけるタバコの使用が再度増加していることは、重大である。

10

【0016】

肺癌および気管支癌についての処置選択肢は、癌の型および病期によって決定され、選択肢としては、手術、放射線療法および化学療法が挙げられる。多くの局所癌については、手術が通常選り抜きの処置である。この疾患は、通常、発見されるときまでに広がっているので、放射線療法および化学治療が、手術と組み合わせてしばしば必要とされる。化学治療単独または放射線療法と組み合わせた化学療法は、小細胞肺癌についての選り抜きの処置であり；このレジメンでは、大きな%の患者が寛解を経験し、これはいくつかの場合において長く持続する。しかし、肺癌および気管支癌についての効果的な処置アプローチおよび診断アプローチの必要性が存在し続けている。

【0017】

乳癌の推定182,800の新しい侵襲性症例が、2000年の間に米国の女性の間で生じると予測された。さらに、乳癌の約1,400の新しい症例が、2000年に男性において診断されると予測された。1980年代における一年当たり約4%の増加後、女性における乳癌発生率は、1990年代に100,000人当たり約110.6症例に頭打ちとなった。

20

【0018】

米国単独で、乳癌に起因して、2000年に推定41,200人の死亡者が存在した（40,800人が女性、400人が男性）。乳癌は、女性における癌による死亡の2番目に主要なものである。最も最近のデータによると、死亡率は、1992年～1996年の間に有意に減少しており、白人および黒人の両方の若い女性の間で最も大きく減少していた。

30

【0019】

医学的環境および患者の好みを考慮にいと、乳癌の処置は、以下を含み得る：腫瘍摘除（腫瘍の局所的な除去）および脇下リンパ節の除去；乳房切除（乳房の外科的除去）および脇下リンパ節の除去；放射線療法；化学療法；またはホルモン療法。しばしば、2つ以上の方法が組み合わせて使用される。多数の研究が、初期段階の疾患について示されており、腫瘍切除に加えた放射線療法の後の長期生存率は、改変された根本的な乳房切除後の生存率に同様である。再構築技術における顕著な進歩は、乳房切除後の乳房再構築についていくつかの選択肢を提供する。近年、このような再構築は、乳房切除と同時に行われている。

40

【0020】

適切な量の周囲の正常胸部組織を伴うインサイチュの腺管癌腫（DCIS）の局所切除によって、DCISの局所的な再発を防ぎ得る。胸部への放射線照射および／またはタモキシフェンによって、残っている胸部組織におけるDCISの発生機会が低減され得る。未処置のままであるとDCISは発達して浸潤性乳癌になり得るので、このことは重要である。それにもかかわらず、これらの処置には、深刻な副作用または後遺症が存在する。それゆえ、有効な乳癌処置の必要性が存在する。

【0021】

2000年の米国において卵巣癌の推定23,100の新症例が存在した。卵巣癌は女性における全ての癌の4%を占め、婦人科癌において第2位に位置付けられている。199

50

2年～1996年の間において、卵巣癌の発生率は、有意に低下した。卵巣癌の結果として、2000年には推定14,000人の死亡者が存在した。卵巣癌は、女性生殖系の他のいかなる癌よりも多数の死亡者を生じる。

【0022】

手術、放射線療法、および化学療法は、卵巣癌についての処置選択肢である。外科的手術としては、通常、卵巣の一方または両方の切除、ファローピウス管の切除（卵管卵巣摘出術）、および子宮の切除（子宮摘出術）が挙げられる。いくつかの非常に初期の腫瘍において、子供を持つことを望む若い女性において特に、関与する卵巣のみが除去される。進行した疾患では、腹腔内の疾患全てを除去して化学療法の効果を増強することが試みられる。卵巣癌についての効果的な処置選択肢についての重要な必要性が存在し続ける。

10

【0023】

2000年の米国において膵臓癌の推定28,300の新症例が存在した。過去20年間にわたって、膵臓癌の割合は、男性において減少している。女性の間での割合は、おおよそ一定のままであるが、減少し始めるかもしれない。膵臓癌は、2000年に米国において推定28,200の死亡を引き起こした。過去20年間にわたって、男性における死亡率は僅かであるが有意に減少している（1年間で約-0.9%）が、その一方で、その割合が女性においては僅かに上昇した。

【0024】

手術、放射線療法、および化学療法は、膵臓癌についての処置選択肢である。これらの処置選択肢は、多くの患者において生存を長期化し得、そして／またはその症状を軽減し得るが、大部分の人に対して治癒を生み出すようではない。膵臓癌についてのさらなる治療選択肢および診断的選択肢に対しての重大な必要性が存在する。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0025】

（発明の要旨）

本発明は、205P1B5と称される遺伝子に関し、この遺伝子は、表Iに列举される癌において過剰発現される。205P1B5の2つの改変体が存在する（例えば、図2を参照のこと）；文脈が明らかそうではないことを示すのでない限り、205P1B5への本明細書中の言及は、これらの改変体のいずれをもいう。正常組織における205P1B5遺伝子発現のノーザンブロット発現分析は、成人組織における制限された発現パターンを示す。205P1B5のヌクレオチド配列（図2）およびアミノ酸配列（図2および図3）を提供する。正常成人組織における205P1B5の組織関連プロファイルは、前立腺腫瘍において観察された過剰発現とあわせて、205P1B5が少なくともいくつかの癌において異常に過剰発現されており、したがって、表Iで列举された組織のような組織の癌について有用な診断標的、予防標的、予後診断標的および／または治療標的として役立つことを示す。

30

【0026】

本発明は、以下を提供する：205P1B5の遺伝子、mRNAおよび／またはコード配列の全てまたは一部分に対応するかまたは相補的である（好ましくは単離された形態の）ポリヌクレオチド（これらとしては、以下が挙げられる：4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または25を超えて連続したアミノ酸の、205P1B5関連タンパク質および205P1B5関連フラグメントをコードするポリヌクレオチド）；少なくとも30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100または100を超えて連続したアミノ酸の205P1B5関連タンパク質、ならびにペプチド／タンパク質自体；205P1B5の遺伝子配列もしくはmRNA配列またはそれらの一部に対して相補的であるかまたは少なくとも90%の相同性を有する、DNA、RNA、DNA／RNAハイブリッド、および関連分子、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、ならびに205P1B5の遺伝子、mRNAまたは205P1B5コードポリ

40

50

ヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。205 P1B5をコードするcDNAおよび遺伝子を単離するための手段もまた提供される。205 P1B5ポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子、このような分子で形質転換または形質導入された細胞、および205 P1B5遺伝子産物の発現のための宿主－ベクター系もまた提供される。本発明はさらに、205 P1B5タンパク質およびそれらのポリペプチドフラグメントに結合する抗体を提供し、これらの抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、マウス抗体および他の哺乳動物抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および完全ヒト抗体、ならびに検出可能なマーカーで標識された抗体が挙げられる。特定の実施形態においては、ただし、図2の核酸配列の全体はコードされない、および／または図2のアミノ酸配列全体は調製されない。特定の実施形態では、図2の核酸配列全体がコードされ、そして／または図2のアミノ酸配列全体が調製され、これらのいずれかは、それぞれのヒト単位投薬形態である。

【0027】

本発明は、種々の生物学的サンプル中での205 P1B5のポリヌクレオチドおよびタンパク質の存在および状態を検出するための方法、ならびに205 P1B5を発現する細胞を同定するための方法をさらに提供する。本発明の代表的な実施形態は、癌のような何らかの形態の増殖調節不全を有するかまたはそれらを有する疑いのある組織サンプルまたは血液学的サンプルにおいて、205 P1B5遺伝子産物をモニタリングするための方法を提供する。

【0028】

本発明は、種々の免疫原性組成物または治療組成物、および205 P1B5を発現する癌（例えば、前立腺癌）を処置するためのストラテジー（205 P1B5の転写、翻訳、プロセッシングまたは機能を阻害することを目的とした治療を含む）ならびに癌ワクチンをさらに提供する。

【0029】

（発明の詳細な説明）

（節の概要）

I.) 定義

II.) 205 P1B5ポリヌクレオチド

II. A.) 205 P1B5ポリヌクレオチドの用途

II. A. 1.) 遺伝的異常のモニタリング

II. A. 2.) アンチセンスの実施形態

II. A. 3.) プライマーおよびプライマー対

II. A. 4.) 205 P1B5コード核酸分子の単離

II. A. 5.) 組換え核酸分子および宿主－ベクター系

III.) 205 P1B5関連タンパク質

III. A.) モチーフ保有タンパク質の実施形態

III. B.) 205 P1B5関連タンパク質の発現

III. C.) 205 P1B5関連タンパク質の改変

III. D.) 205 P1B5関連タンパク質の用途

IV.) 205 P1B5抗体

V.) 205 P1B5細胞免疫応答

VI.) 205 P1B5トランスジェニック動物

VII.) 205 P1B5の検出方法

VIII.) 205 P1B5関連遺伝子およびそれらの産物の状態をモニタリングするための方法

IX.) 205 P1B5と相互作用する分子の同定

X.) 治療法および組成物

X. A.) 抗癌ワクチン

X. B.) 抗体ベースの治療のための標的としての205 P1B5

X. C.) 細胞免疫応答についての標的としての 205P1B5

X. C. 1. ミニ遺伝子ワクチン

X. C. 2. CTL ペプチドとヘルパーペプチドとの組み合わせ

X. C. 3. CTL ペプチドと T 細胞プライミング剤との組み合わせ

X. C. 4. CTL ペプチドおよび／または HTL ペプチドでパルスされた DC を含むワクチン組成物

X. D.) 養子免疫療法

X. E.) 治療目的または予防目的のためのワクチンの投与

X I.) 205P1B5 の診断的实施形態および予後的実施形態

X I I.) 205P1B5 タンパク質機能の阻害

10

X I I. A.) 細胞内抗体を用いた 205P1B5 の阻害

X I I. B.) 組換えタンパク質を用いた 205P1B5 の阻害

X I I. C.) 205P1B5 の転写または翻訳の阻害

X I I. D.) 治療的戦略についての一般的考慮事項

X I I I.) キット。

【0030】

(I.) 定義

他に特に定義されていない限りは、本明細書中で使用される当該分野の全ての用語、記号、および他の科学的用語または専門用語は、本発明が関係している当業者によって一般的に理解されている意味を有するように意図される。いくつかの場合においては、一般的に理解されている意味を有する用語は、明確さおよび／または容易な参照のために本明細書中で定義され、そして本明細書中でのこのような定義の包含は、当該分野で一般的に理解されている意味を超える実質的な差異を示すようには決して解釈されないはずである。本明細書中に記載されるかまたは参照される技術および手順（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、(1989)編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y. に記載されている、広範囲に利用されている分子クローニング方法論）は、一般的に十分に理解されており、そして当業者によって、従来の方法論を用いて一般的に使用される。適切である場合には、商業的に入手可能なキットおよび試薬の使用を含む手順が、一般的には、製造業者によって定義されるプロトコルおよび／またはそうでなければ他に記載されているパラメーターに従って行われる。

20

30

【0031】

用語「進行した前立腺癌」、「局所的に進行した前立腺癌」、「進行した疾患」、および「局所的に進行した疾患」は、前立腺の莢膜を通じて拡大した前立腺癌を意味し、そして American Urological Association (AUA) システムのもとでのステージ C の疾患、Whitmore-Jewett システムのもとでのステージ C1～C2 の疾患、および TNM (腫瘍、節、転移 (tumor, node, metastasis)) システムのもとでのステージ T3～T4 および N+ の疾患を含むように意味される。一般的には、外科手術は、局所的に進行した疾患を有する患者については推奨されず、そしてこれらの患者は、臨床的に局在化した (器官に限定された) 前立腺癌を有している患者と比較して、実質的にあまり好ましくない結果を有する。局所的に進行した疾患は、前立腺の側縁を超えるしこり、あるいは前立腺の基部の上部の非対称性またはしこりの明白な証拠によって、臨床的に同定される。局所的に進行した前立腺癌は、現在は、腫瘍が前立腺の莢膜に侵入または浸潤するか、外科的な縁に伸びるか、あるいは精子の小包に侵入する場合には、根治的な前立腺切除後に病理学的に診断される。

40

【0032】

「ネイティブなグリコシル化パターンを改変すること」は、本明細書中の目的を意図し、ネイティブ配列の 205P1B5 において見出される 1 つ以上の炭水化物部分を除去すること (内在するグリコシル化部位を除去することによってか、または化学的手段および／

50

もしくは酵素的手段によってグリコシル化を除去することによってのいずれかで)、および／あるいはネイティブ配列の205P1B5に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。さらに、この句は、ネイティブタンパク質のグリコシル化の質的な変化を含み、種々の炭水化物部分の存在の性質および比率の変化に関する。

【0033】

用語「アナログ」は、構造的に類似するか、別の分子と類似する特性または一致する特性を共有する分子をいう（例えば、205P1B5関連タンパク質）。例えば、205P1B5タンパク質のアナログは、205P1B5に特異的に結合する抗体またはT細胞によって特異的に結合され得る。

【0034】

用語「抗体」は、最も広範な意味で使用される。従って、「抗体」は、天然に存在し得るか、または慣習なハイブリドーマ技術によって産生されるモノクローナル抗体のような人工であり得る。抗205P1B5抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体ならびに抗原結合ドメインおよび／またはこれらの抗体の1つ以上の相補的決定領域を含むフラグメントを含む。

【0035】

「抗体フラグメント」は、標的に結合する免疫グロブリン分子の可変領域の少なくとも一部分（すなわち、抗原結合領域）として定義される。1つの実施形態において、これは、単一の抗205P1B5抗体およびそのクローン（アゴニスト、アンタゴニストおよび中和抗体が挙げられる）ならびにポリエピトープの（polyepitopic）特異性を有する抗205P1B5抗体組成物を特に網羅する。

【0036】

用語「コドン最適化配列」は、少なくとも約20%の使用頻度を有する任意のコドンを置換することによって特定の宿主種を最適化するヌクレオチド配列をいう。偽ポリアデニル化配列の除去、エキソン／イントロンスプライシングシグナルの除去、トランスポソン様リピートの除去および／またはコドン最適化に加えてGC含量の最適化によって、所定の宿主種における発現について最適化されたヌクレオチド配列は、「発現増強配列」として本明細書中で参照される。

【0037】

用語「細胞傷害性薬剤」は、細胞の発現活性、細胞の機能を阻害するかまたは防止し、そして／あるいは細胞の破壊を引き起こす物質をいう。この用語は、放射活性同位体化学療法剤および毒素（例えば、低分子毒素または細菌起源、真菌起源、植物起源または動物起源の酵素的活性毒素）（フラグメントおよび／またはその改変体を含む）を含むことが意図される。細胞傷害性試薬の例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：マイタンシノイド（maytansinoid）、イットリウム、ビスマス、リシン、リシンA鎖、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、タキソール、エチジウムブロマイド、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン、ジフテリア毒素、Pseudomonas外毒素（PE）A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデシン（modecin）A鎖、 α -サルシン（sarcin）、ゲロニン（gelonin）、ミトゲリン（mitogellin）、レトストリクトシン（retstrictocin）、フェノマイシン、エノマイシン、クリシン（curicin）、クロチン（crotin）、カリケアマイシン（calicheamicin）、sapaonarialisインヒビター、およびグルココルチコイド、ならびに他の化学療法剤、ならびに放射性同位元素（例えば At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} およびLuの放射性同位体）。抗体はまた、活性形態にプロドラッグを変換し得る抗癌プロドラッグ活性化酵素に結合し得る。

【0038】

用語「ホモログ」は、別の分子と相同性を示す（例えば、対応する位置で同様かまたは類似である化学残基の配列を有する）分子をいう。

10

20

30

40

50

【0039】

「ヒト白血球抗原」または「HLA」は、ヒトのクラスIまたはクラスIIの主要組織適合抗原複合体(MHC)タンパク質である(例えば、Stitesら、IMMUNOLOGY, 第8編., Lange Publishing, Los Altos, CA(1994)を参照のこと)。

【0040】

ポリヌクレオチドの状況で使用される、用語「ハイブリダイズする(hybridize)」、「ハイブリダイズする(hybridizing)」、「ハイブリダイズする(hybridizes)」などは、従来のハイブリダイゼーション条件(好ましくは、例えば、50%のホルムアミド/6×SSC/0.1%のSDS/100μg/mlのssDNA中でのハイブリダイゼーション)をいうことが意味される。ここでは、ハイブリダイゼーションの温度は37℃を超え、そして0.1×SSC/0.1%のSDS中での洗浄のための温度は55℃より高い。

【0041】

句「単離された」または「生物学的に純粋」は、ネイティブな状態で見出されるような物質を通常伴う構成要素を実質的にまたは本質的に含まない物質をいう。従って、本発明に従う単離されたペプチドは、好ましくはインサイチュ環境においてペプチドに通常付随する物質を含まない。例えば、ポリヌクレオチドは、205P1B5遺伝子以外の遺伝子に対応するかまたは相補的であるか、または205P1B5遺伝子産物またはそのフラグメント以外のポリペプチドをコードする混入物のポリヌクレオチドから実質的に分離される場合、「単離される」と言われる。当業者は、単離された205P1B5ポリヌクレオチドを得るために核酸単離手順を容易に利用し得る。タンパク質は、例えば、物理的方法、機械的方法または化学的方法が、タンパク質に通常付随する細胞の成分から205P1B5タンパク質を除くするために利用される場合、「単離された」と言われる。当業者は、単離された205P1B5タンパク質を得るために標準的な精製方法を容易に利用し得る。あるいは、単離されたタンパク質は、化学的手段によって調製され得る。

【0042】

用語「哺乳動物」は、哺乳動物(マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよびヒトを含む)に分類される任意の生物をいう。本発明の1つの実施形態において、哺乳動物はマウスである。本発明の別の実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【0043】

用語「転移性の前立腺癌」および「転移性の疾患」は、局所的なリンパ節または離れた部位に拡大した前立腺癌を意味し、そしてAUAシステムのもとでのステージDの疾患、およびTNMシステムのもとでのステージT×N×M+を含むように意味される。局所的に進行した前立腺癌の症例における場合には、外科手術は、一般的には、転移性の疾患を有している患者については意図されず、そしてホルモン(アンドロゲンの切除)治療が、好ましい処置様式である。転移性の前立腺癌を有している患者は、最終的には、処置の開始の12~18ヶ月以内のアンドロゲン治療不応性状態を発症する。これらのアンドロゲン治療不応性の患者のほぼ半分が、その状態の発症後6ヶ月以内に死亡する。前立腺癌の転移の最も一般的な部位は骨である。前立腺癌の骨転移は、しばしば、骨溶解よりもむしろ骨芽細胞性(すなわち、正味の骨の形成を生じる)である。骨転移は、脊椎においても頻繁に見出され、大腿骨、骨盤、肋骨郭(rib cage)、頭蓋骨、および上腕骨が続く。他の一般的な転移の部位として、リンパ節、肺、肝臓、および脳が挙げられる。転移性の前立腺癌は、代表的には、開放性骨盤リンパ腺切除または腹腔鏡による骨盤リンパ腺切除、全身の放射性核種スキャン、骨格のレントゲン撮影、および/あるいは骨の病変の生検によって、診断される。

【0044】

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に同種の集団から得られる抗体(すなわち、少量存在する、天然に存在する可能性を除いて同一である集団を含む抗体)をいう。

【0045】

205P1B5 関連タンパク質の生物学的モチーフとしての「モチーフ」は、タンパク質の一次配列の一部を形成するアミノ酸の任意のパターン（特定の機能（例えば、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-DNA相互作用など）、または改変（例えば、リン酸化、グリコシル化、もしくはアミド化）、または局在（例えば、分泌配列、核局在化配列など）に関連する）、あるいは免疫原性（体液性または細胞性のいずれか）と関連する配列をいう。モチーフは、一般的に、特定の機能または特性に関連する特定の位置に隣接し得るか、または整列し得るかのいずれかである。HLAモチーフの文脈において、「モチーフ」とは、特定のHLA分子によって認識される、規定された長さのペプチドにおける残基（通常、クラスI HLAモチーフに対する約8～約13のアミノ酸、およびクラスII HLAモチーフに対する約6～約25のアミノ酸からのペプチド）のパターンをいう。HLA結合についてのペプチドモチーフは、代表的に、各ヒトHLA対立遺伝子によってコードされる各タンパク質について異なり、そして一次アンカー残基および二次アンカー残基のパターンにおいて異なる。

10

【0046】

「薬学的な賦形剤」とは、アジュバント、キャリア、pH調整剤および緩衝剤、等張剤、湿潤剤、保存剤などのような物質を含む。

【0047】

「薬学的に受容可能な」とは、非毒性、不活性および／またはヒトもしくは他の哺乳動物に生理学的に適合する組成物をいう。

【0048】

用語「ポリヌクレオチド」は、少なくとも10個の塩基または塩基対の長さのヌクレオチドの多型の形態（リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれか、あるいはいずれかのヌクレオチドの型の改変された形態）を意味し、そして一本鎖および二本鎖の形態のDNAおよび／またはRNAを含むことを意味する。当該分野において、この用語は、必要であれば、しばしば「オリゴヌクレオチド」と相互に使用される。ポリヌクレオチドは、本明細書中で開示されたヌクレオチド配列を含み得、ここでチミジン（T）（例えば、配列番号702に示されるような）はまたウラシル（U）であり得る。この説明は、DNAおよびRNAの化学的構造間の違い、特に4つの主な塩基のうち1つがRNAでは、チミジン（T）の代わりにウラシル（U）であるという知見に関連する。

20

【0049】

用語「ポリペプチド」は、少なくとも約4、5、6、7または8アミノ酸のポリマーを意味する。本明細書を通して、アミノ酸についての標準的な3文字表記または1文字表記が使用される。当該分野において、この用語は、しばしば「ペプチド」または「タンパク質」と相互に使用される。

30

【0050】

HLAの「一次アンカー残基」は、免疫ペプチドとHLA分子との間に接触点を提供することが理解される、ペプチド配列に沿う特定の位置でのアミノ酸である。1～3つ、通常2つの、規定された長さのペプチド内の一次アンカー残基は、一般的に、免疫原性ペプチドに対する「モチーフ」を規定する。これらの残基は、HLA分子のペプチド結合グループと、結合グループの特異的ポケットに埋め込まれるそれらの側鎖と密接に接触することが理解される。1つの実施形態において、例えば、HLAクラスI分子についての一次アンカー残基は、本発明に従って、（アミノ末端位置から）2位、そしてカルボキシ末端位置の残基ペプチドエピトープ8位、9位、10位、11位または12位に局在される。別の実施形態において、例えば、HLAクラスII分子に結合するペプチドの一次アンカー残基は、ペプチドの末端ではなく、互いに関連して間隔をおいて配置される。ここで、ペプチドは、一般に少なくとも9アミノ酸長である。各モチーフおよびスーパーモチーフ（supermotif）についての一次アンカー位置は、表IVに示される。例えば、アナログペプチドは、表IVに示される、一次アンカー位置および／または二次アンカー位置における特定の残基の存在または非存在を変更することによって作製され得る。このようなアナログは、特定のHLAモチーフまたはスーパーモチーフを含むペプチドの結合親

40

50

和性および／または集団範囲 (population coverage) を調整するために使用される。

【0051】

「組換え」DNA分子またはRNA分子は、インビトロでの分子操作に供されるDNA分子またはRNA分子である。

【0052】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般的には、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験的な計算である。一般的には、より長いプローブは、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、一方、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般的には、それらの融解温度以下の環境下に相補鎖が存在する場合に、変性された核酸が再度アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間での所望される相同性の程度が高ければ高いほど、使用され得る相対的な温度は高くなる。結果として、より高い相対的な温度が、反応条件をよりストリンジェントにする傾向があり、一方、より低い温度はあまりそうではないという結果になる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience Publishers (1995) を参照のこと。

【0053】

「ストリンジェントな条件」、または「高ストリンジェントな条件」は、本明細書中で定義される場合は、以下によって同定され得るがこれらに限定されない：(1) 洗浄のために低いイオン強度および高温（例えば、0.015Mの塩化ナトリウム／0.0015Mのクエン酸ナトリウム／0.1%のドデシル硫酸ナトリウム、50℃）を使用する；(2) 変性剤（例えば、ホルムアミド）をハイブリダイゼーションの間に使用する（例えば、0.1%のウシの血清アルブミンを有する50% (v/v) のホルムアミド／0.1%のFicoll／0.1%のポリビニルピロリドン／750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウムを有するpH6.5の50mMのリン酸ナトリウム緩衝液、42℃）；または(3) 50%のホルムアミド、5×SSC（0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理したサケの精子のDNA（50μg/ml）、0.1%のSDS、および10%のデキストラン硫酸を42℃で使用し、0.2×SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中で42℃で、そして50%のホルムアミド中で55℃で洗浄し、続いて55℃でEDTAを含有している0.1×SSCから構成される高ストリンジェンシーの洗浄が続く。「中程度のストリンジェントな条件」は、限定されないが、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、New York: Cold Spring Harbor Press、1989によって記載され、そして上記に記載されているハイブリダイゼーション条件よりもストリンジェントの低い洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度および% SDS）の使用を含む。中程度のストリンジェントの条件の例は、20%のホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸、および20mg/mLの変性された剪断されたサケの精子のDNAを含有している溶液中で37℃での一晚のインキュベーション、続く1×SSC中での約37℃～50℃でのフィルターの洗浄である。当業者は、プローブの長さなどの因子に順応させることが必要とされる場合には、温度、イオン強度などを調節するための方法を認識する。

【0054】

HLAの「スーパーモチーフ」は、2つ以上のHLA対立遺伝子によってコードされるHLA分子によって特異的に共有されるペプチド結合である。

10

20

30

40

50

【0055】

本明細書中で使用される場合、「処置すること」または「処置的な」および文法的に関連する用語は、疾患の任意の結果（例えば、延長した生存、より少ない罹患率、および／または副作用（代替的な治療形式の副産物；疾患の完全な撲滅が必要とされない））の任意の改善をいう。

【0056】

「トランスジェニック動物」（例えば、マウスまたはラット）は、導入遺伝子を含む細胞を有する動物であり、この導入遺伝子は、動物に導入されたか、または出生前（例えば、胚の段階）に動物の先祖に導入された。「導入遺伝子」は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノム中に組込まれるDNAである。

10

【0057】

本明細書中で使用する場合、HLAまたは細胞性免疫応答「ワクチン」は、本発明の1つ以上のペプチドを含むか、またはコードする組成物をいう。このようなワクチン（例えば1つ以上の別個のペプチドのカクテル；ポリエピトープペプチドによって含まれる、本発明の1つ以上のペプチド；あるいはこのような別個のペプチドまたはポリエピトープ（例えば、ポリエピトープペプチドをコードする小遺伝子）をコードする核酸）の多数の実施形態が存在する。「1つ以上のペプチド」は、1～150またはそれ以上（例えば、本発明の少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、もしくは150以上）の任意の全整数単位が挙げられ得る。ペプチドまたはポリペプチドは、必要に応じて、（例えば、脂質化、標的化配列または他の配列の付加によって）改変され得る。本発明のHLAクラスIペプチドは、細胞傷害性Tリンパ球およびヘルパーTリンパ球の両方の活性化を促進させるために、HLAクラスII分子と混合または連結され得る。HLAワクチンはまた、ペプチドパルス抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）を含み得る。

20

【0058】

用語「改変体」とは、記載される型または基準（例えば、特に記載されるタンパク質（例えば、図2または図3に示される205P1B5タンパク質）の対応部分に、1つ以上の異なるアミノ酸残基を有するタンパク質）からの改変を示す分子をいう。アナログは、改変タンパク質の例である。スプライシングアイソフォームおよびシングルヌクレオチド多型（SNP）は、さらなる改変体の例である。

30

【0059】

本発明の205P1B5関連タンパク質としては、本明細書中で特異的に同定されたタンパク質、ならびに対立遺伝子改変体、（本明細書中に概説される方法または当該分野で用意に利用可能な方法に従って実験を実施することなく、単離／生成され得、そして特徴付けられ得る）保存的置換改変体、アナログおよびホモログが挙げられる。異なる205P1B5タンパク質またはそのフラグメントの一部分に結合する融合タンパク質、ならびに205P1B5タンパク質および異種ポリペプチドの融合タンパク質もまた、含まれる。このような205P1B5タンパク質は、本発明のタンパク質である205P1B5関連タンパク質、または205P1B5として集合的に称される。用語「205P1B5関連タンパク質」とは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または25より多いか、あるいは、少なくとも30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525または529以上のアミノ酸の、ポリ

40

50

ペプチドフラグメントまたは 205P1B5 タンパク質配列をいう。

【0060】

(I I .) 205P1B5 ポリヌクレオチド)

本発明の 1 つの局面は、205P1B5 の遺伝子、mRNA および／またはコード配列の全てまたは一部に対応するかまたは相補的な、好ましくは単離形態のポリヌクレオチドを提供し、これには、205P1B5 関連タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそのフラグメント、DNA、RNA、DNA／RNA ハイブリッド、および関連分子、205P1B5 の遺伝子もしくは mRNA 配列に相補的なポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドまたはその一部、ならびに 205P1B5 の遺伝子、mRNA、もしくは 205P1B5 コードポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド (集合的に「205P1B5 ポリヌクレオチド」) が挙げられる。この節において参照される場合、全ての例において、T は、図 2 において、U でもあり得る。

10

【0061】

205P1B5 ポリヌクレオチドの実施形態としては、以下が挙げられる：図 2 に示される配列を有する 205P1B5 ポリヌクレオチド、図 2 に示されるような 205P1B5 スクレオチド配列 (ここで、T は U である)；図 2 に示されるような配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも 10 個連続するヌクレオチド；または図 2 に示される配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも 10 個連続するヌクレオチド (ここで、T は U である)。例えば、205P1B5 スクレオチドの実施形態は、限定ではなく、以下を含む：

(a) 図 2 に示されるような配列 (配列番号 _____) を含むか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド (ここで、T は U でもあり得る)；

20

(b) 図 2 に示されるような配列 (配列番号 _____) の、ヌクレオチド残基番号 555 ～ヌクレオチド残基番号 2144 を含むか、またはこのような配列からなる、ポリヌクレオチド (ここで、T は U でもあり得る)；

(c) 受託番号 _____ として、American Type Culture Collection に寄託された、_____ の名称のプラスミドに含まれる cDNA によってその配列がコードされる、205P1B5 関連タンパク質をコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 図 2 に示される全長アミノ酸配列 (配列番号 _____) に対して少なくとも 90 % 相同な 205P1B5 関連タンパク質をコードするポリヌクレオチド；

30

(e) 図 2 に示される全長アミノ酸配列 (配列番号 _____) に対して少なくとも 90 % 同一な 205P1B5 関連タンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 表 V ～ X V I I I に示される少なくとも 1 つのペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(g) 図 3 のペプチドの、図 5 の親水性プロファイルにおいて 0.5 より大きい値を有するアミノ酸位置を含む、少なくとも 5 アミノ酸から、529 までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(h) 図 3 のペプチドの、図 6 の疎水性プロファイルにおいて 0.5 未満の値を有するアミノ酸位置を含む、少なくとも 5 アミノ酸から、529 までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

40

(i) 図 3 のペプチドの、図 7 の接触可能残基の % のプロファイルにおいて 0.5 より大きい値を有するアミノ酸位置を含む、少なくとも 5 アミノ酸から、529 までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(j) 図 3 のペプチドの、図 8 の平均可撓性プロファイルにおいて 0.5 より大きい値を有するアミノ酸位置を含む、少なくとも 5 アミノ酸から、529 までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(k) 図 3 のペプチドの、図 9 の β -ターンプロファイルにおいて 0.5 より大きい値を有するアミノ酸位置を含む、少なくとも 5 アミノ酸から、529 までの任意の整数の増分のペプチド領域をコードする、ポリヌクレオチド；

(l) (a) ～ (k) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドに完全に相補的なポリヌクレオ

50

チド；

(m) (a) ~ (l) のポリヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(n) (a) ~ (k) のいずれかによってコードされるペプチド；ならびに

(o) 薬学的賦形剤と共にか、そして／またはヒト単位用量形態中の、(a) ~ (m) のいずれかのポリヌクレオチドまたは (n) のペプチド。

【0062】

本明細書中で使用する場合、ある範囲は、その全単位位置の全てを具体的に開示することが理解される。

【0063】

本明細書中に開示される発明の代表的な実施形態としては、205P1B5のmRNA配列の特定の部分をコードする205P1B5ポリヌクレオチド（およびこのような配列に相補的なポリヌクレオチド）が挙げられる（例えば、205P1B5の、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525または529個連続するアミノ酸の、タンパク質および／またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド）。

10

20

【0064】

例えば、本明細書中に開示される発明の代表的な実施形態としては、以下が挙げられる：図2または図3に示されるカルボキシ末端アミノ酸の最後に、約10アミノ酸の増分で、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸1～約アミノ酸10をコードする、ポリヌクレオチドおよびコードされたペプチド自体、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸10～約アミノ酸20をコードするポリヌクレオチド、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸20～約アミノ酸30をコードするポリヌクレオチド、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸30～約アミノ酸40をコードするポリヌクレオチド、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸40～約アミノ酸50をコードするポリヌクレオチド、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸50～約アミノ酸60をコードするポリヌクレオチド、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸60～約アミノ酸70をコードするポリヌクレオチド、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸70～約アミノ酸80をコードするポリヌクレオチド、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の約アミノ酸90～約アミノ酸100をコードするポリヌクレオチド。従って、205P1B5タンパク質のアミノ酸100～カルボキシ末端アミノ酸の、（約10アミノ酸の）アミノ酸配列の部分をコードするポリヌクレオチドは、本発明の実施形態である。ここで、各特定のアミノ酸位置は、±5アミノ酸残基の位置を開示することが理解される。

30

40

【0065】

205P1B5タンパク質の比較的長い部分をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明の範囲内である。例えば、図2または図3に示される205P1B5タンパク質の、約アミノ酸1（または20または30または40など）～約アミノ酸20（または30または40または50など）をコードするポリヌクレオチドは、当該分野で周知の種々の技術によって生成され得る。これらのポリヌクレオチドフラグメントは、図2または図3に示されるような205P1B5配列の任意の部分を含み得る。

【0066】

本明細書中に開示される発明のさらなる例示的实施形態としては、205P1B5タンパク質配列内に含まれる1以上の生物学的モチーフをコードする205P1B5ポリヌクレ

50

オチドフラグメントが挙げられ、これには、表V～X V I I Iに示される205 P 1 B 5タンパク質の、1以上のモチーフ保有部分配列が挙げられる。別の実施形態において、本発明の代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、既知の分子に対する相同性を示す205 P 1 B 5のタンパク質または改変体の、1以上の領域をコードする。本発明の別の実施形態において、代表的なポリヌクレオチドフラグメントは、205 P 1 B 5のタンパク質のN-グリコシル化部位、cAMP依存性およびcGMP依存性のプロテインキナーゼリン酸化部位、カゼインキナーゼI I リン酸化部位またはN-ミリスチル化部位、ならびにアミド化部位のうち1以上をコードし得る。

【0067】

(I I . A .) 205 P 1 B 5 ポリヌクレオチドの用途)

10

(I I . A . 1 .) 遺伝子異常のモニタリング)

上記段落のポリヌクレオチドは、多数の異なる特定の用途を有する。ヒト205 P 1 B 5遺伝子は、実施3に例示される染色体位置にマッピングされる。例えば、205 P 1 B 5遺伝子は、この染色体にマッピングされるので、205 P 1 B 5タンパク質の異なる領域をコードするポリヌクレオチドは、この染色体位置の細胞遺伝的異常（例えば、種々の癌に関連するとして同定された異常）を特徴付けるために使用される。特定の遺伝子において、再編成を含む種々の染色体異常が、多数の異なる癌における頻繁な細胞遺伝的異常として同定されている（例えば、K r a j i n o v i c ら、M u t a t . R e s . 382 (3-4) : 81-83 (1998) ; J o h a n s s o n ら、B l o o d 86 (10) : 3905-3914 (1995) および F i n g e r ら、P . N . A . S . 85 (23) : 9158-9162 (1988) を参照のこと）。従って、205 P 1 B 5タンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドは、悪性の表現型に寄与し得る、205 P 1 B 5をコードする染色体領域における細胞遺伝的異常を説明するために使用され得る、以前に可能であったツールよりもより正確な、新たなツールを提供する。この状況において、これらのポリヌクレオチドは、より微妙な染色体異常およびあまり一般的でない染色体異常を同定するために、染色体スクリーニングの感受性を拡大することについての、当該分野における必要性を満たす（例えば、E v a n s ら、A m . J . O b s t e t . G y n e c o l 171 (4) : 1055-1057 (1994) を参照のこと）。

20

【0068】

さらに、205 P 1 B 5は、前立腺癌および他の癌において高度に発現されることが示されているので、205 P 1 B 5ポリヌクレオチドは、正常組織 対 癌性組織における205 P 1 B 5遺伝子産物の状態を評価する方法において使用される。代表的に、205 P 1 B 5タンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドは、205 P 1 B 5遺伝子の特定の領域（例えば、1以上のモチーフを含むこのような領域）における乱れ（例えば、抗原の喪失などを生じる欠失、挿入、点変異または変更）の存在を評価するために使用される。例示的なアッセイとしては、R T - P C R アッセイおよび一本鎖コンホメーション多型 (S S C P) 分析（例えば、M a r r o g i ら、J . C u t a n . P a t h o l . 26 (8) : 369-378 (1999) を参照のこと）の両方が挙げられ、これらは両方とも、タンパク質内の特定の領域を試験するために、タンパク質内の特定の領域をコードするポリヌクレオチドを利用する。

30

40

【0069】

(I I . A . 2 .) アンチセンスの実施形態)

本明細書中に開示される発明の、他の具体的に企図された核酸に関する実施形態は、ゲノムDNA、cDNA、リボザイムおよびアンチセンス分子、ならびに天然供給源由来であるか合成であるかにかかわらない、代替的骨格に基づく核酸分子または代替的塩基を含む核酸分子であり、そしてこれには、205 P 1 B 5のRNA発現またはタンパク質発現を阻害し得る分子が含まれる。例えば、アンチセンス分子は、塩基対依存的な様式でDNAまたはRNAに特異的に結合する、ペプチド核酸 (PNA) または非核酸分子（例えば、ホスホロチオエート誘導体）を含む、RNAまたは他の分子であり得る。当業者は、本明細書中に開示される205 P 1 B 5のポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド配列を使

50

用して、これらのクラスの核酸分子を容易に獲得し得る。

【0070】

アンチセンス技術は、細胞内に位置する標的ポリヌクレオチドに結合する外因性オリゴヌクレオチドの投与を伴う。用語「アンチセンス」は、このようなオリゴヌクレオチドが、その細胞内標的（例えば、205P1B5）に相補的であるという事実をいう。例えば、Jack Cohen、Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression、CRC Press、1989；および Synthesis 1:1-5（1988）を参照のこと。本発明の205P1B5アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、誘導体（例えば、S-オリゴヌクレオチド（ホスホロチオエート誘導体またはS-オリゴ、Jack Cohen（前出）を参照のこと）が挙げられ、これは、増強された癌細胞増殖阻害活性を示す。S-オリゴ（ヌクレオシドホスホロチオエート）は、リン酸基の非架橋酸素原子が硫黄原子によって置換されている、オリゴヌクレオチド（O-オリゴ）の等電子アナログである。本発明のS-オリゴは、3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン-1, 1-ジオキシド（これは、硫黄転移試薬である）での対応するO-オリゴの処理によって調製され得る。例えば、Iyer, R. P. ら、J. Org. Chem. 55:4693-4698（1990）；および Iyer, R. P. ら、J. Am. Chem. Soc. 112:1253-1254（1990）。本発明のさらなる205P1B5アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、当該分野で公知のモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる（例えば、Partridge ら、1996、Antisense & Nucleic Acid Drug Development 6:169-175を参照のこと）。

【0071】

本発明の205P1B5アンチセンスオリゴヌクレオチドは、代表的に、205P1B5ゲノム配列または対応するmRNAの最初の100個の5'側コドンまたは最後の100個の3'側コドンに相補的であり、かつこれらと安定にハイブリダイズする、RNAまたはDNAであり得る。完全な相補性は必要ないが、高度な相補性が好ましい。この領域に相補的なオリゴヌクレオチドの使用によって、205P1B5 mRNAへの選択的なハイブリダイゼーションは可能になるが、プロテインキナーゼの他の調節サブユニットを指定するmRNAへの選択的なハイブリダイゼーションは可能にならない。1つの実施形態において、本発明の205P1B5アンチセンスオリゴヌクレオチドは、205P1B5 mRNAにハイブリダイズする配列を有するアンチセンスDNA分子の15〜30マーのフラグメントである。必要に応じて、205P1B5アンチセンスオリゴヌクレオチドは、205P1B5の最初の10個の5'側コドンまたは最後の10個の3'側コドン中の領域に相補的な30マーのオリゴヌクレオチドである。あるいは、このアンチセンス分子は、205P1B5発現の阻害においてリボザイムを使用するように改変される（例えば、L. A. Couture & D. T. Stinchcomb; Trends Genetics 12:510-515（1996）を参照のこと）。

【0072】

（II. A. 3.）プライマーおよびプライマー対）

本発明のこのヌクレオチドのさらに特定の実施形態としては、プライマーおよびプライマー対（これらは、本発明のポリヌクレオチドまたはその任意の特定の部分の特異的増幅を可能にする）、ならびにプローブ（これは、本発明の核酸分子またはその任意の部分に選択的にかまたは特異的にハイブリダイズする）が挙げられる。プローブは、検出可能なマーカー（例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生体発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素）で標識され得る。このようなプローブおよびプライマーは、サンプル中の205P1B5ポリヌクレオチドの存在を検出するため、および205P1B5タンパク質を発現する細胞を検出するための手段として使用される。

【0073】

このようなプローブの例としては、図2に示されるヒト205P1B5 cDNA配

列の全てまたは一部を含むポリヌクレオチドが挙げられる。205P1B5 mRNAを特異的に増幅し得るプライマー対の例もまた、実施例に記載される。当業者によって理解されるように、非常に多数の異なるプライマーおよびプローブが、本明細書中に提供される配列に基づいて調製され得、そして205P1B5 mRNAを増幅および／または検出するために有効に使用され得る。

【0074】

本発明の205P1B5ポリヌクレオチドは、種々の目的のために有用であり、その用途としては、限定ではなく以下が挙げられる：205P1B5の遺伝子、mRNAもしくはそのフラグメントの増幅および／または検出のためのプローブおよびプライマーとして；前立腺癌および他の癌の診断および／または予後のための試薬として；205P1B5ポリペプチドの発現を指向し得るコード配列として；205P1B5遺伝子の発現および／または205P1B5転写産物の翻訳を調節または阻害するためのツールとして；そして治療剤として。

10

【0075】

本発明は、天然に存在する供給源（例えば、ヒトまたは他の哺乳動物）由来の205P1B5核酸配列または205P1B5関連核酸配列を同定および単離するための、本明細書中に記載されるような任意のプローブの使用、ならびに単離された核酸配列自体（これは、使用されるプローブ中に見出される配列の全てまたはほとんどを含む）を包含する。

【0076】

（II. A. 4.）205P1B5コード核酸分子の単離）

20

本明細書中に記載される205P1B5 cDNA配列は、205P1B5遺伝子産物をコードする他のポリヌクレオチドの単離、ならびに205P1B5遺伝子産物ホモログ、選択的スプライシングされたアイソフォーム、対立遺伝子改変体および205P1B5遺伝子産物の変異形態をコードする他のポリヌクレオチドの単離、ならびに205P1B5関連タンパク質のアナログをコードするポリヌクレオチドの単離を可能にする。205P1B5遺伝子をコードする全長cDNAを単離するために使用され得る種々の分子クローニング方法が周知である（例えば、Sambrook, J. ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Press、New York、1989；Current Protocols in Molecular Biology、Ausubel ら、編、Wiley and Sons、1995を参照のこと）。例えば、λファージクローニング方法論は、市販のクローニングシステム（例えば、Lambda ZAP Express、Stratagene）を使用して、簡便に使用され得る。205P1B5遺伝子のcDNAを含むファージクローンは、標識された205P1B5 cDNAまたはそのフラグメントを用いて探索することによって、同定され得る。例えば、1つの実施形態において、205P1B5 cDNA（例えば、図2）またはその一部が、合成され得、そして205P1B5遺伝子に対する重複および205P1B5遺伝子に対応する全長cDNAを検索するためのプローブとして使用され得る。205P1B5遺伝子自体は、ゲノムDNAライブラリー、細菌人工染色体ライブラリー（BAC）、酵母人工染色体ライブラリー（YAC）などを、205P1B5 DNAのプローブまたはプライマーを用いてスクリーニングすることによって、単離され得る。

30

40

【0077】

（II. A. 5.）組換え核酸分子および宿主－ベクター系）

本発明はまた、205P1B5ポリヌクレオチド、そのフラグメント、アナログ、またはホモログを含む組換えDNA分子またはRNA分子（ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、YAC、BAC、ならびに当該分野で周知の種々のウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含むがこれらに限定されない）、およびこのような組換えDNA分子またはRNA分子で形質転換またはトランスフェクトされた細胞を提供する。このような分子を生成する方法は、周知である（例えば、Sambrook ら、1989、前出を参照のこと）。

50

【0078】

本発明はさらに、適切な原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞中に205P1B5ポリヌクレオチド、そのフラグメント、アナログ、またはホモログを含む組換えDNA分子を含む、宿主ベクター系を提供する。適切な真核生物宿主細胞の例としては、酵母細胞、植物細胞、または動物細胞（例えば、哺乳動物細胞または昆虫細胞（例えば、Sf9細胞またはHigh Five細胞のようなバキュロウイルス感染性細胞））が挙げられる。適切な哺乳動物細胞の例としては、種々の前立腺癌細胞株（例えば、DU145およびTsuPr1）、他のトランスフェクト可能または形質導入可能な前立腺癌細胞株、一次細胞（PrEC）、および組換えタンパク質の発現のために慣用的に使用される多くの哺乳動物細胞（例えば、COS細胞、CHO細胞、293細胞、293T細胞）が挙げられる。より詳細には、205P1B5のコード配列を含むポリヌクレオチド、またはそのフラグメント、アナログ、もしくはホモログは、当該分野で慣用的に使用され、そして広範に知られている多数の宿主ベクター系を用いて、205P1B5タンパク質またはそのフラグメントを生成するために使用され得る。

【0079】

205P1B5タンパク質またはそのフラグメントの発現に適切な広範な範囲の宿主ベクター系が利用可能である（例えば、Sambrookら、1989、前出；Current Protocols in Molecular Biology、1995、前出を参照のこと）。哺乳動物での発現に好ましいベクターとしては、pcDNA3.1myc-His-tag（Invitrogen）およびレトロウイルスベクターpSRαtkneo（Mullerら、1991、MCB 11:1785）が挙げられるがこれらに限定されない。これらの発現ベクターを用いて、205P1B5は、いくつかの前立腺癌細胞株および非前立腺細胞株（例えば、293、293T、rat-1、NIH3T3、およびTsuPr1を含む）において発現され得る。本発明の宿主ベクター系は、205P1B5タンパク質またはそのフラグメントを生成するのに有用である。このような宿主ベクター系は、205P1B5および205P1B5変異体もしくはアナログの機能的特性を研究するために使用され得る。

【0080】

組換えヒト205P1B5タンパク質またはそのアナログもしくはホモログもしくはフラグメントは、205P1B5関連ヌクレオチドをコードする構築物でトランスフェクトされた哺乳動物細胞により生成され得る。例えば、293T細胞は、205P1B5またはそのフラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする発現プラスミドでトランスフェクトされ得、205P1B5または関連タンパク質が、293T細胞中で発現され、そして組換え205P1B5タンパク質が、標準的な精製方法（例えば、抗205P1B5抗体を用いるアフィニティー精製）を用いて単離される。別の実施形態において、205P1B5コード配列は、レトロウイルスベクターpSRαMSVtkneo中にサブクロニングされ、そして205P1B5発現細胞株を確立するために、種々の哺乳動物細胞株（例えば、NIH3T3、TsuPr1、293、およびrat-1）を感染するために使用される。当該分野で周知の種々の他の発現系もまた、使用され得る。205P1B5コード配列にインフレームで連結されたリーダーペプチドをコードする発現構築物は、分泌形態の組換え205P1B5タンパク質の生成のために使用され得る。

【0081】

本明細書中で議論されるように、遺伝暗号の重複性は、205P1B5遺伝子配列におけるバリエーションを許容する。詳細には、特定の宿主種は、しばしば、特定のコドン優先性を有することが、当該分野で公知であり、従って、当業者は、開示された配列を、所望の宿主で優先されるよう適合し得る。例えば、優先されるアナログコドン配列は、代表的に、より高頻度のコドンと置きかえられた稀なコドン（すなわち、所望の宿主の公知の配列において約20%未満の使用頻度を有するコドン）を有する。特定種についてのコドン優先性は、例えば、インターネット上（例えば、URL www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html）で利用可能なコドン使用表を

用いることによって算出される。

【0082】

さらなる配列の改変は、細胞性宿主におけるタンパク質発現を増強することが知られている。これらとしては、偽ポリアデニル化シグナルをコードする配列の除去、エキソン／イントロンスプライス部位シグナル、トランスポゾン様反復、および／または遺伝子発現に対して有害な他のこのような十分特徴付けられた配列が挙げられる。配列のGC含量は、所定の細胞性宿主について平均的なレベル（その宿主細胞において発現される公知の遺伝子を参照することによって算出される）に調整される。可能な場合、配列は、予測されるヘアピン二次mRNA構造を回避するよう改変される。他の有用な改変としては、Kozak、Mol. Cell. Biol.、9：5073－5080（1989）に記載されるような、オープンリーディングフレームの開始点での翻訳開始コンセンサス配列の追加が挙げられる。当業者は、真核生物リボソームが5'近位のAUGコドンで排他的に翻訳を開始という一般的な役割が、稀な条件下でのみ排除されることを理解する（例えば、Kozak PNAS 92（7）：2662－2666、（1995）およびKozak NAR 15（20）：8125－8148（1987）を参照のこと）。 10

【0083】

（III）205P1B5関連タンパク質）

本発明の別の局面は、205P1B5関連タンパク質を提供する。205P1B5タンパク質の特定の実施形態は、図2または図3に示されるようなヒト205P1B5のアミノ酸配列の全てまたは一部を有するポリペプチドを包含する。あるいは、205P1B5タンパク質の実施形態は、図2または図3に示される205P1B5のアミノ酸配列中に変更を有する改変体、ホモログ、またはアナログポリペプチドを包含する。 20

【0084】

一般的に、ヒト205P1B5の天然に存在する対立遺伝子改変体は、高い程度の構造的同一性および相同性（例えば、90%以上の相同性）を共有する。代表的に、205P1B5タンパク質の対立遺伝子改変体は、本明細書中に記載される205P1B5配列中に保存的アミノ酸置換を含むか、または205P1B5のホモログにおいて対応する位置からのアミノ酸の置換を含む。205P1B5対立遺伝子の1つのクラスは、特定の205P1B5アミノ酸配列の少なくとも小部分と高い程度の相同性を共有するが、その配列由来の根本的な逸脱（例えば、非保存的置換、短縮、挿入、またはフレームシフト）をさらに含むタンパク質である。タンパク質配列の比較において、用語、類似性、同一性、および相同性は、各々、遺伝学分野で理解されるのと別個の意味を有する。さらに、オルソロジーおよびパラロジーは、ある生物における所定のタンパク質ファミリーのメンバーの、他の生物における同じファミリーのメンバーに対する関係を記載する重要な概念であり得る。 30

【0085】

アミノ酸略号は、表IIに提供される。保存的アミノ酸置換は、しばしば、そのタンパク質のコンホメーションまたは機能のいずれも変更することなくタンパク質中で起こり得る。本発明のタンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15の保存的置換を含み得る。このような変更としては、イソロイシン（I）、バリン（V）、およびロイシン（L）のいずれかの、これらの疎水性アミノ酸の他のいずれかでの置換；グルタミン酸（E）でのアスパラギン酸（D）の置換およびその逆；アスパラギン（N）でのグルタミン（Q）の置換およびその逆；ならびにスレオニン（T）でのセリン（S）の置換およびその逆が挙げられる。他の置換もまた、特定のアミノ酸の環境およびそのタンパク質の三次元構造におけるその役割に依存して、保存的であるとみなされ得る。例えば、グリシン（G）およびアラニン（A）は、しばしば、交換可能であり、アラニン（A）およびバリン（V）も同様であり得る。比較的疎水性のメチオニン（M）は、しばしば、ロイシンおよびイソロイシンと交換され得、そして時々、バリンと交換され得る。リジン（K）およびアルギニン（R）は、しばしば、そのアミノ酸残基の重要な特徴がその電荷であり、これら2つのアミノ酸残基の異なるpKが重要でない 40 50

位置で交換可能である。さらに他の変更は、特定の環境で「保存的」とであるとみなされ得る（例えば、本明細書中の表 I I I ; 13 ~ 15 頁「Biochemistry」第2版、Lubert Stryer 編 (Stanford University) ; Henikoff ら、PNAS 1992 Vol 89 10915-10919 ; Lei ら、J Biol Chem 1995 May 19 ; 270 (20) : 11882-6 を参照のこと）。

【0086】

本明細書中に開示される発明の実施形態として、205 P 1 B 5 タンパク質の広範な種々の当該分野で受け入れられる改変体またはアナログ（例えば、アミノ酸の挿入、欠失、および置換を有するポリペプチド）が挙げられる。205 P 1 B 5 改変体は、当該分野で公知の方法（例えば、部位特異的変異誘発、アラニンスキャンニング、および PCR 変異誘発）を用いて作製され得る。部位特異的変異誘発（Carter ら、Nucl. Acids Res.、13 : 4331 (1986) ; Zoller ら、Nucl. Acids Res.、10 : 6487 (1987)）、カセット変異誘発（Wells ら、Gene、34 : 315 (1985)）、制限選択変異誘発（Wells ら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A、317 : 415 (1986)）、または他の公知の技術が、205 P 1 B 5 改変体 DNA を生成するために、クローニングした DNA において実施され得る。

【0087】

スキャンニングアミノ酸分析はまた、特定の生物学的活性（例えば、タンパク質-タンパク質相互作用）に関連する連続配列に沿って1つ以上のアミノ酸を同定するのに使用され得る。比較的小さく、中性のアミノ酸が、好ましいスキャンニングアミノ酸に含まれる。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが挙げられる。アラニンは、代表的に、この群の中で好ましいスキャンニングアミノ酸である。なぜならば、アラニンは、β炭素の後ろの側鎖を排除し、そして改変体の主鎖のコンホメーションを変更する可能性がより低いからである。アラニンはまた、代表的に、それが、最も一般的なアミノ酸であるので好ましい。さらに、アラニンは、しばしば、埋もれた位置および露出した位置の両方において見出される（Creighton、The Proteins、(W. H. Freeman & Co.、N. Y.) ; Chothia、J. Mol. Biol.、150 : 1 (1976)）。アラニン置換が、十分な量の改変体を生じない場合、等比体積のアミノ酸が使用され得る。

【0088】

本明細書中で規定される場合、205 P 1 B 5 改変体、アナログ、またはホモログは、配列番号703のアミノ酸配列を有する205 P 1 B 5 タンパク質と「交叉反応性」である少なくとも1つのエピトープを有するという特徴的な特性を有する。この文で使用される場合、「交叉反応性」は、205 P 1 B 5 改変体に特異的に結合する抗体またはT細胞がまた、配列番号703に示されるアミノ酸配列を有する205 P 1 B 5 タンパク質に特異的に結合することを意味する。ポリペプチドは、205 P 1 B 5 タンパク質に特異的に結合する抗体またはT細胞により認識され得るいかなるエピトープも含まない場合、配列番号703に示すタンパク質の改変体でなくなる。当業者は、タンパク質を認識する抗体が、異なる大きさのエピトープに結合し、そして約4または5アミノ酸オーダーの一群（連続していようとしていまいと）が、最小エピトープにおける代表的な数のアミノ酸とみなされることを理解する。例えば、Nair ら、J. Immunol 2000 165 (12) : 6949-6955 ; Hebbes ら、Mol Immunol (1989) 26 (9) : 865-73 ; Schwartz ら、J Immunol (1985) 135 (4) : 2598-608 を参照のこと。

【0089】

別のクラスの205 P 1 B 5 関連タンパク質改変体は、配列番号703のアミノ酸配列またはそのフラグメントと、70%、75%、80%、85%、または90%以上の類似性を共有する。別の特定のクラスの205 P 1 B 5 タンパク質改変体またはアナログは、本

10

20

30

40

50

明細書中に記載されるかまたは当該分野で現在公知の 205P1B5 の生物学的モチーフの 1 つ以上を含む。従って、最初のフラグメントと比較して変更された機能的（例えば、免疫原性）特性を有する 205P1B5 フラグメント（核酸またはアミノ酸）のアナログは、本発明に包含される。現在当該分野の一部であるかまたは当該分野の一部となるモチーフが図 2 または図 3 の核酸配列またはアミノ酸配列に適用されることが理解される。

【0090】

本明細書中で議論されるように、本発明の実施形態は、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質の全長未満のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。例えば、本発明の代表的な実施形態は、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質の任意の 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上の連続するアミノ酸を有するペプチド／タンパク質を含む。

10

【0091】

さらに、本明細書中に開示される本発明の代表的な実施形態は、205P1B5 アミノ酸配列全体を通して、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 1 ～アミノ酸約 10 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 10 ～アミノ酸約 20 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 20 ～アミノ酸約 30 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 30 ～アミノ酸約 40 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 40 ～アミノ酸約 50 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 50 ～アミノ酸約 60 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 60 ～アミノ酸約 70 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 70 ～アミノ酸約 80 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 80 ～アミノ酸約 90 からなるポリペプチド、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 90 ～アミノ酸約 100 からなるポリペプチドなどを含む。さらに、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 タンパク質のアミノ酸約 1（または 20 または 30 または 40 など）～アミノ酸約 20（または 130 または 140 または 150 など）からなるポリペプチドが、本発明の実施形態である。この段落における開始位置および停止位置は、特定の位置およびプラス 5 残基マイナス 5 残基の位置をいう。

20

30

【0092】

205P1B5 関連タンパク質は、標準的なペプチド合成技術を用いてかまたは当該分野で周知の化学切断方法を用いて生成される。あるいは、組み換え方法が、205P1B5 関連タンパク質をコードする核酸分子を生成するのに使用され得る。1 つの実施形態において、核酸分子は、205P1B5 タンパク質（またはその改変体、ホモログ、またはアナログ）の規定されたフラグメントを生成する手段を提供する。

【0093】

（III. A.）モチーフ保有タンパク質の実施形態）

本明細書中に開示される本発明のさらなる例示の実施形態は、図 2 または図 3 に示される 205P1B5 ポリペプチド配列中に含まれる 1 つ以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む 205P1B5 ポリペプチドを包含する。種々のモチーフが当該分野で周知であり、そしてタンパク質は、多くの公に利用可能なインターネットサイト（例えば、URL アドレス：pfam.wustl.edu/；searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struct-predict.html；port.ims.u-tokyo.ac.jp/；www.cbs.dtu.dk/；www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html；www.expasy.ch/tools/scnpsitl.html；EpimatrixTM および EpimerTM、Brown University、www.brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix、

40

50

html; および B I M A S、b i m a s. d c r t. n i h. g o v /) により、このようなモチーフの存在について評価され得る。

【0094】

205P1B5 タンパク質のモチーフ保有部分配列は、表 X I X において示されそして同定される。

【0095】

表 X X は、p f a m サーチ (URL アドレス p f a m. w u s t l. e d u / を参照のこと) に基づくいくつかの頻繁に生じるモチーフを示す。表 X X のカラムは、(1) モチーフ名の略称、(2) このモチーフファミリーの異なるメンバーの間で見出された同一性 (%)、(3) モチーフ名または詳細、および (4) 最も一般的な機能を列挙し; 位置情報は、そのモチーフが位置に関連性がある場合に含まれる。

10

【0096】

先に議論された1つ以上の205P1B5モチーフを含むポリペプチドは、先に議論された205P1B5モチーフが増殖調節不全に関連するという観察の観点で、および205P1B5が特定の癌で過剰発現されるという理由から、悪性の表現型の特異的な特徴を説明するのに有用である (例えば、表 I を参照のこと)。カゼインキナーゼ I I、c A M P および c a m p 依存性プロテインキナーゼ、ならびにプロテインキナーゼ C は、例えば、悪性の表現型の発現に関連することが公知である酵素である (例えば、Chen ら、L a b I n v e s t.、78 (2): 165-174 (1998); G a i d d o n ら、E n d o c r i n o l o g y 136 (10): 4331-4338 (1995); H a l l ら、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 24 (6): 1119-1126 (1996); P e t e r z i e l ら、O n c o g e n e 18 (46): 6322-6329 (1999)、および O ' B r i a n、O n c o l. R e p. 5 (2): 305-309 (1998) を参照のこと)。さらに、グリコシル化およびミリスチル化の両方は、癌および癌の進行にも関連するタンパク質修飾である (例えば、D e n n i s ら、B i o c h e m. B i o p h y s. A c t a 1473 (1): 21-34 (1999); R a j u ら、E x p. C e l l R e s. 235 (1): 145-154 (1997) を参照のこと)。アミド化は、癌および癌の進行にも関連する別のタンパク質修飾である (例えば、T r e s t o n ら、J. N a t l. C a n c e r I n s t. M o n o g r. (13): 169-175 (1992) を参照のこと)。

20

30

【0097】

別の実施形態において、本発明のタンパク質は、当該分野で認知された方法に従って同定された1つ以上の免疫反応性エピトープ (例えば、表 V ~ X V I I I に示されるペプチド) を含む。C T L エピトープは、特定の H L A 対立遺伝子に最適に結合し得る205P1B5タンパク質中のペプチドを同定するための特別なアルゴリズムを用いて決定され得る (例えば、表 I V: E p i m a t r i x^{T M} および E p i m e r^{T M}、B r o w n U n i v e r s i t y、URL w w w. b r o w n. e d u / R e s e a r c h / T B - H I V _ L a b / e p i m a t r i x / e p i m a t r i x. h t m l ; および B I M A S、URL b m a s. d c r t. n i h. g o v /)。さらに、H L A 分子に対して十分な結合親和性を有し、そして免疫原性エピトープであることに関連するペプチドを同定するためのプロセスが当該分野で周知であり、そして過度の実験を行うことなく実施される。さらに、免疫原性エピトープであるペプチドを同定するためのプロセスが、当該分野で周知であり、そしてインビトロまたはインビボのいずれかで、過度の実験を行わずに実施される。

40

【0098】

免疫原性を調節するために、このようなエピトープのアナログを作製するための原理もまた、当該分野で公知である。例えば、当業者は、C T L または H T L モチーフ (例えば、表 I V の H L A クラス I および H L A クラス I I モチーフ / スーパーモチーフを参照のこと) を有するエピトープを用いて開始する。このエピトープは、特定の位置のうちの1つのアミノ酸を置換し、そしてそれをその位置のために特定された別のアミノ酸で置き換え

50

ることにより、アナログを作製される。例えば、当業者は、任意の他の残基（例えば、表 I V に規定されるような優先性の残基）に有利となるように、有害な残基を選択するか；優先性の低い残基を、表 I V に規定されるような優先性の残基で置換するか；または最初から存在する優先性の残基を、表 I V に規定されるような別の優先性の残基で置換し得る。置換は、ペプチド中の主要なアンカー位置または他の位置で生じ得る；例えば、表 I V を参照のこと。

【0099】

種々の参考文献は、目的のタンパク質およびそのアナログにおけるエピトープの同定および生成に関する技術を反映している。例えば、Chesnutらに対する WO 97/33602；Sette、Immunogenetics 1999 50（3-4）：201-212；Setteら、J. Immunol. 2001 166（2）：1389-1397；Sidneyら、Hum. Immunol. 1997 58（1）：12-20；Kondoら、Immunogenetics 1997 45（4）：249-258；Sidneyら、J. Immunol. 1996 157（8）：3480-90；および Falkら、Nature 351：290-6（1991）；Huntら、Science 255：1261-3（1992）；Parkerら、J. Immunol. 149：3580-7（1992）；Parkerら、J. Immunol. 152：163-75（1994）；Kastら、1994 152（8）：3904-12；Borras-Cuestaら、Hum. Immunol. 2000 61（3）：266-278；Alexanderら、J. Immunol. 2000 164（3）：164（3）：1625-1633；Alexanderら、PMID：7895164、UI：95202582；O'Sullivanら、J. Immunol. 1991 147（8）：2663-2669；Alexanderら、Immunity 1994 1（9）：751-761、および Alexanderら、Immunol. Res. 1998 18（2）：79-92を参照のこと。

【0100】

本発明の関連の実施形態は、表 X I X に示される異なるモチーフ、ならびに／または表 X V I I I 1つ以上の推定 C T L エピトープ、ならびに／または当該分野で公知の1つ以上の T 細胞結合モチーフの組み合わせを含むポリペプチドを包含する。好ましい実施形態は、このポリペプチドのモチーフまたは介在配列のいずれにも、挿入、欠失、または置換を含まない。さらに、これらのモチーフのいずれかの側に、多くの N 末端および／または C 末端アミノ酸残基のいずれかを含む実施形態が、望ましくあり得る（例えば、モチーフが位置するポリペプチド構造のより大きな部分を含むために）。代表的に、モチーフのいずれかの側の N 末端および／または C 末端アミノ酸残基の数は、約 1 ～ 約 100 アミノ酸残基の間、好ましくは、5 ～ 約 50 アミノ酸残基の間である。

【0101】

205 P 1 B 5 関連タンパク質は、多くの形態、好ましくは、単離された形態で具体化される。調製された 205 P 1 B 5 タンパク質分子は、抗体、T 細胞または他のリガンドへの 205 P 1 B 5 の結合を障害する、他のタンパク質または分子を、実質的に含まない。単離および精製の性質および程度は、意図される用途に依存する。205 P 1 B 5 関連タンパク質の実施形態は、精製された 205 P 1 B 5 関連タンパク質、および機能的な可溶性 205 P 1 B 5 関連タンパク質を含む。1つの実施形態において、機能的な可溶性 205 P 1 B 5 タンパク質またはそのフラグメントは、抗体、T 細胞または他のリガンドによって結合される能力を維持する。

【0102】

本発明はまた、図 2 または図 3 に示される 205 P 1 B 5 アミノ酸配列の生物学的に活性なフラグメントを含む 205 P 1 B 5 タンパク質を提供する。このようなタンパク質は、以下のような出発 205 P 1 B 5 タンパク質の特性を示す：205 P 1 B 5 タンパク質に関連するエピトープに特異的に結合する抗体の産生を誘発する能力；H T L または C T L の活性化を誘発する能力；ならびに／あるいは、この出発タンパク質にもまた特異的に結

合するH T LまたはC T Lによって認識される能力。

【0103】

特定の興味深い構造を含む205P1B5関連ポリペプチドは、当該分野で周知の種々の分析技術を使用してかまたは免疫原性に基づいて、予測および／または同定され得、これらの技術としては、Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Karplus-SchultzまたはJameson-Wolf分析の方法が挙げられる。このような構造を含むフラグメントは、サブユニット特異的な抗205P1B5抗体またはT細胞の作製において、あるいは、205P1B5に結合する細胞因子の同定において特に有用である。

【0104】

C T Lエピトープは、指定されたH L A対立遺伝子に必要な応じて結合し得る205P1B5タンパク質内のポリペプチドを同定するために、特定のアルゴリズムを使用して（例えば、World Wide Web URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com／のSYFPEITHIサイト；表IV（A）～（E）の表；Epimatrix^{T M}およびEpimer^{T M}、Brown University, URL (World Wide Web URL brown.edu／Research／TB-HIV_Lab／epimatrix／epimatrix.html)；ならびに、BIMAS, URL bimas.dcr.t.nih.gov／)を使用することによって決定され得る。これを例示すると、ヒトMHCクラスI分子の状況において示される205P1B5由来のペプチドエピトープ（H L A-A1、A2、A3、A11、A24、B7およびB35）が、予測された（例えば、表V～XVII）。具体的には、205P1B5タンパク質の完全なアミノ酸配列を、上記のBioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) ウェブサイトにおいて見出されるH L A Peptide Motif Searchアルゴリズムに入力した。H L Aペプチドモチーフ検索アルゴリズムは、H L AクラスI分子、特は、H L A-A2のグループにおける特定のペプチド配列の結合に基づいて、Dr. Ken Parkerによって開発された（例えば、Falkら、Nature 351: 290-6 (1991)；Huntら、Science 255: 1261-3 (1992)；Parkerら、J. Immunol. 149: 3580-7 (1992)；Parkerら、J. Immunol. 152: 163-75 (1994)を参照のこと）。このアルゴリズムは、H L A-A2および他の多くのH L AクラスI分子への予測される結合についての完全なタンパク質配列から、8マー、9マー、および10マーのペプチドを位置決定およびランク付けすることを可能にする。多数のH L AクラスI結合ペプチドは、8マー、9マー、10マーまたは11マーである。例えば、クラスI H L A-A2について、エピトープは、好ましくは、2位においてロイシン（L）またはメチオニン（M）を含み、そしてC末端においてバリン（V）またはロイシン（L）を含む（例えば、Parkerら、J. Immunol. 149: 3580-7 (1992)を参照のこと）。205P1B5予測結合ペプチドの選択結果は、本明細書中の表V～XVIIIに示される。表V～XVIIIにおいて、上位50の候補物である、各ファミリーメンバーに対する9マーおよび10マーが、それらの位置、各特定のペプチドのアミノ酸配列、および推定結合スコアとともに示される。この結合スコアは、37℃（pH 6.5）においてペプチドを含む複合体の解離の、推定半減時間に対応する。最も高い結合スコアを有するペプチドは、最良の期間にわたって、細胞表面上でH L AクラスIに最も密接して結合され、T細胞認識のための最良の免疫原性標的を示すと予測される。

【0105】

H L A対立遺伝子へのペプチドの実際の結合は、抗原プロセッシング欠損細胞株T2上でのH L A発現を安定化させることによって評価され得る（例えば、Xueら、Prostate 30: 73-8 (1997)およびPeshwaら、Prostate 36: 129-38 (1998)を参照のこと）。特定のペプチドの免疫原性は、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）の存在下におけるC D+8細胞障害性Tリンパ球（C T L）を刺激す

10

20

30

40

50

ることによって、インビトロで評価され得る。

【0106】

B I M A S サイト、E p i m e r^{T M} サイトおよび E p i m a t r i x^{T M} サイトによって予測されるか、あるいは当該分野で利用可能であるかまたは表 I V に示されるような分野の一部である、H L A クラス I モチーフまたは H L A クラス I I モチーフによって指定される（あるいは、W o r l d W i d e W e b s i t e U R L s y f p e i t h i . b m i - h e i d e l b e r g . c o m / を使用して決定される）、全てのエピトープは、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質に「適用」されることが理解される。この文脈において使用される場合、「適用される」とは、例えば、可視によってかまたは当業者によって理解されるような、コンピューターベースのパターン認定方法によって、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質が評価されることを意味する。H L A クラス I モチーフを保有する、8、9、1 0 もしくは 1 1 のアミノ酸残基の 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の全ての部分配列、または H L A クラス I I モチーフを保有する 9 アミノ酸残基以上の部分配列は、本発明の範囲内である。

【0107】

(I I I . B .) 2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質の発現)

以下の実施例において記載される実施形態において、2 0 5 P 1 B 5 は、市販の発現ベクター（例えば、C 末端 6 × H i s および M Y C タグ (p c D N A 3 . 1 / m y c H I S , I n v i t r o g e n または T a g 5 , G e n H u n t e r C o r p o r a t i o n , N a s h v i l l e T N) を用いて 2 0 5 P 1 B 5 をコードする、C M V 駆動発現ベクター) でトランスフェクトした細胞（例えば、2 9 3 T 細胞）中で簡便に発現され得る。T a g 5 ベクターは、I g G K 分泌シグナルを提供し、このシグナルを使用して、トランスフェクト細胞中の分泌される 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の生成を容易にし得る。培養培地中の分泌された H I S タグ化 2 0 5 P 1 B 5 は、例えば、標準技術を使用するニッケルカラムを使用して、精製され得る。

【0108】

(I I I . C .) 2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質の改変)

2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質の改変（例えば、共有結合的改変）は、本発明の範囲内に含まれる。共有結合的改変の 1 つの型は、2 0 5 P 1 B 5 ポリペプチドの標的化アミノ酸残基を、有機誘導体化因子（これは、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の選択される側鎖残基または N 末端もしくは C 末端の残基と反応し得る）と反応させることを包含する。本発明の範囲内に含まれる 2 0 5 P 1 B 5 ポリペプチドの共有結合的改変の別の型は、本発明のタンパク質のネイティブなグリコシル化パターンを変化させることを包含する。2 0 5 P 1 B 5 の共有結合的改変の別の型は、2 0 5 P 1 B 5 ポリペプチドを、種々の非タンパク様ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール (P E G) 、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン）のうちの 1 つに、米国特許第 4 , 6 4 0 , 8 3 5 号；同第 4 , 4 9 6 , 6 8 9 号；同第 4 , 3 0 1 , 1 4 4 号；同第 4 , 6 7 0 , 4 1 7 号；同第 4 , 7 9 1 , 1 9 2 ；または同第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号に記載される様式で連結させることを包含する。

【0109】

本発明の 2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質はまた、キメラ分子を形成するように改変され得、このキメラ分子は、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合された 2 0 5 P 1 B 5 を含む。このようなキメラ分子は、化学的にかまたは組換え的に、合成され得る。キメラ分子は、別の腫瘍関連抗原またはそのフラグメントに融合された本発明のタンパク質を有し得る。あるいは、本発明に従うタンパク質は、2 0 5 P 1 B 5 配列のフラグメントの融合体（アミノ酸または核酸）を含み得、その結果、その長さに起因して、図 2 または図 3 に示されるアミノ酸配列または核酸配列に直接的に相同でない分子が作製される。このようなキメラ分子は、2 0 5 P 1 B 5 の複数の同じ部分配列を含み得る。キメラ分子は、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質の、ポリヒスチジンエピトープタグとの融合体を含み得、これは、固定化されたニッケルが選択的に結合し得るエピトープに、サイトカインまた

は増殖因子を提供する。エピトープタグは、一般に、205P1B5のアミノ末端またはカルボキシル末端に位置される。代替の実施形態において、キメラ分子は、205P1B5関連タンパク質の、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合体を含み得る。二価の形態のキメラ分子（「免疫接着因子（immuno adhesion）とも呼ばれる」）について、このような融合体は、IgG分子のFc領域に対するものであり得る。このIg融合体は、好ましくは、Ig分子内の少なくとも1つの可変領域に代わる、可溶性（膜貫通ドメインを欠失または不活性化した）形態の205P1B5ポリペプチドでの置換を含む。好ましい実施形態において、免疫グロブリン融合体は、IgG分子のヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域、またはヒンジ領域、CH1領域、CH2領域およびCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の産生については、米国特許第5,428,130号（1995年6月27日発行）もまた参照のこと。

10

【0110】

（III.D.）205P1B5関連タンパク質の用途）

本発明のタンパク質は、多くの異なる特定の用途を有する。205P1B5が前立腺癌および他の癌において高度に発現される場合、205P1B5関連タンパク質は、癌組織に対して、正常な205P1B5遺伝子産物の状態を評価する方法において使用され、それによって悪性表現型が明らかになる。代表的には、205P1B5タンパク質の特定の領域由来のポリペプチドが、それらの領域（例えば、1つ以上のモチーフを含む領域）における摂動（例えば、欠失、挿入、点変異など）の存在を評価するために使用される。例示的なアッセイは、癌性組織に対して正常な領域の特徴を評価するか、またはエピトープに対する免疫応答を惹起させるために、抗体、または205P1B5ポリペプチド配列に含まれる1つ以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含むT細胞標的化205P1B5関連タンパク質を用いる。あるいは、205P1B5タンパク質において1つ以上の生物学的モチーフのアミノ酸残基を含む205P1B5関連タンパク質を使用して、205P1B5の領域と相互作用する因子についてスクリーニングする。

20

【0111】

205P1B5タンパク質フラグメント／部分配列は、ドメイン特異的抗体（例えば、205P1B5タンパク質の細胞外エピトープまたは細胞内エピトープを認識する抗体）を作製しそして特徴付ける際に、205P1B5またはその特定の構造ドメインに結合する薬剤または細胞因子を同定するために、そして種々の治療状況および診断状況（診断アッセイ、癌ワクチンおよびこのようなワクチンを調製する方法が挙げられるがこれらの限定されない）において、特に有用である。

30

【0112】

205P1B5遺伝子によってコードされるタンパク質、またはそれらのアナログ、ホモログもしくはフラグメントによってコードされるタンパク質は、種々の用途を有し、これらの用途としては、抗体の作製、ならびに205P1B5遺伝子産物に結合する、リガンドおよび他の薬剤および細胞構築物を同定するための方法が挙げられるがこれらに限定されない。205P1B5タンパク質またはそのフラグメントに対して惹起される抗体は、診断アッセイおよび予後アッセイ、ならびに205P1B5タンパク質の発現によって特徴付けられるヒト癌（例えば、表1に列挙されるような癌）の管理における画像化方法に有用である。このような抗体は、細胞内で発現され得、そしてこのような癌を有する患者を処置する方法において使用され得る。205P1B5関連核酸または205P1B5関連タンパク質はまた、HTL応答またはCTL応答を生じさせる際に使用される。

40

【0113】

205P1B5タンパク質を検出するために有用な種々の免疫学的アッセイが、使用され、これらのアッセイとしては、種々の型の放射免疫アッセイ、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光アッセイ（ELIFA）、免疫細胞化学方法などが挙げられるがこれらに限定されない。抗体は、205P1B5発現細胞を検出し得る免疫学的画像化試薬として（例えば、放射性核種（radioscintigraphic）画像化方法において）、標識および使用され得る。205P1B5タンパク質はまた

50

、本明細書中でさらに記載されるように、癌ワクチンを作製する際に、特に有用である。

【0114】

(I V .) 2 0 5 P 1 B 5 抗体)

本発明の別の局面は、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質に結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質に特異的に結合し、そして2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質ではないペプチドまたはタンパク質には結合しない（または弱く結合する）。例えば、2 0 5 P 1 B 5 に結合する抗体は、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質（例えば、それらのホモログまたはアナログ）に結合し得る。

【0115】

本発明の2 0 5 P 1 B 5 抗体は、癌の診断アッセイおよび予後アッセイ、および画像化方法論において、特に有用である。同様に、このような抗体は、2 0 5 P 1 B 5 がまた、他の癌において発現されるかまたは過剰に発現される程度まで、これらの他の癌を処置、診断および／または予後診断する際に有用である。さらに、細胞内で発現される抗体（例えば、一本鎖抗体）は、2 0 5 P 1 B 5 の発現が関与する癌（例えば、進行性または転移性の前立腺癌）の処置において、治療学的に有用である。

10

【0116】

本発明はまた、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質および変異2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質の検出および定量化のために有用な種々の免疫学的アッセイを提供する。このようなアッセイは、適切な場合、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質を認識および結合し得る、1 種以上の2 0 5 P 1 B 5 抗体を含み得る。これらのアッセイは、当該分野で周知の種々の免疫学的アッセイ様式の範囲内で実施され得、これらのアッセイとしては、種々の型の放射免疫アッセイ、酵素結合イムノソルベント検定法 (E L I S A)、酵素結合免疫蛍光アッセイ (E L I F A) などが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0117】

本発明の免疫学的非抗体アッセイはまた、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）ならびに主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) 結合アッセイも含む。

【0118】

さらに、2 0 5 P 1 B 5 を発現する前立腺癌および他の癌を検出し得る免疫学的画像化方法もまた、本発明によって提供され、これらとしては、標識された2 0 5 P 1 B 5 抗体を使用する、放射性核種画像化方法が挙げられるがこれらに限定されない。このようなアッセイは、2 0 5 P 1 B 5 を発現する癌（例えば、前立腺癌）の検出、モニタリング、および予後診断において、臨床学的に有用である。

30

【0119】

2 0 5 P 1 B 5 抗体はまた、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質を精製するための方法、ならびに2 0 5 P 1 B 5 ホモログおよび2 0 5 P 1 B 5 関連分子を単離するための方法において使用され得る。例えば、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質を精製する方法は、以下の工程を包含する：固体マトリクスに結合している2 0 5 P 1 B 5 抗体を、溶解物または2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質を含有する他の溶液とともに、2 0 5 P 1 B 5 抗体が2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質に結合することが可能な条件下でインキュベートする工程；この固体マトリクスを洗浄して、不純物を取り除く工程；ならびに、結合している抗体から、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質を溶出する工程。本発明に従う、2 0 5 P 1 B 5 抗体の他の用途としては、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質を模倣する抗イディオタイプ抗体を作製することが挙げられる。

40

【0120】

抗体を調製するための種々の方法が、当該分野で周知である。例えば、抗体は、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質、ペプチド、またはフラグメントを使用して、適切な哺乳動物宿主を免疫することによって、単離形態または免疫結合体化形態で、調製され得る (A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C S H P r e s s , 編, H a r l o w , a n d L a n e (1 9 8 8) ; H a r l o w , A n t i b o d i e s , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , N Y (1 9 8 9)) 。さらに、2 0

50

5 P 1 B 5 G S T 融合タンパク質のような 2 0 5 P 1 B 5 融合タンパク質もまた、使用され得る。特定の実施形態において、図 2 または図 3 のアミノ酸配列の全てまたは大部分を含む G S T 融合タンパク質が生成され、次いで、これを免疫原として使用して、適切な抗体を作製する。別の実施形態において、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質が合成され、そして免疫原として使用される。

【0121】

さらに、当該分野で公知の裸の D N A 免疫技術が使用され（精製された 2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質または 2 0 5 P 1 B 5 発現細胞を用いてかまたは用いずに）、そのコードされた免疫原に対する免疫応答が生じる（総説としては、D o n n e l l y ら、1 9 9 7, A n n . R e v . I m m u n o l . 1 5 : 6 1 7 - 6 4 8 を参照のこと）。

10

【0122】

図 2 または図 3 に示される 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質のアミノ酸配列を分析して抗体を作製するための、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の特定の領域を選択し得る。例えば、2 0 5 P 1 B 5 アミノ酸配列の疎水性分析および親水性分析を使用して、2 0 5 P 1 B 5 構造における親水性領域を同定する。免疫原構造を示す 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の領域、ならびに他の領域およびドメインは、当該分野で公知の種々の他の方法（例えば、C h o u - F a s m a n、G a r n i e r - R o b s o n、K y t e - D o o l i t t l e、E i s e n b e r g、K a r p l u s - S c h u l t z または J a m e s o n - W o l f 分析）を使用して、容易に同定され得る。従って、これらのプログラムまたは方法のいずれかによって同定される各領域は、本発明の範囲内である。2 0 5 P 1 B 5 抗体を作製するための方法は、本明細書中で提供される実施例によって、さらに例示される。免疫原として使用するためのタンパク質またはポリペプチドを調製するための方法は、当該分野で周知である。キャリア（例えば、B S K、K L H または他のキャリアタンパク質）とタンパク質との免疫原性結合体を調製するための方法もまた、当該分野で周知である。いくつかの状況において、例えば、カルボジイミド試薬を使用する直接的結合体化が使用され；他の例においては、P i e r c e C h e m i c a l C o . , R o c k f o r d , I L によって供給される結合試薬が有効である。2 0 5 P 1 B 5 免疫原の投与は、当該分野で理解されるように、適切な期間にわたって、適切なアジュバントを使用して注射することによって、しばしば行われる。免疫スケジュールの間、抗体の力価を収集して、抗体形成の妥当性を決定し得る。

20

30

【0123】

2 0 5 P 1 B 5 モノクローナル抗体は、当該分野で周知の種々の手段によって生成され得る。例えば、所望なモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株は、K o h l e r および M i l s t e i n の標準的なハイブリドーマ技術、または一般に公知のように、抗体産生 B 細胞を不死化する改変を使用して、調製される。所望な抗体を分泌する不死化細胞株は、免疫アッセイによってスクリーニングされる（このアッセイにおいて、抗原は、2 0 5 P 1 B 5 関連タンパク質である）。適切な不死化細胞培養物が同定された場合、この細胞が拡大され得、そしてインビトロ培養物または腹水のいずれかから、抗体が生成され得る。

【0124】

本発明の抗体またはフラグメントはまた、組換え手段によっても生成され得る。2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の所望な領域に特異的に結合する領域はまた、複数の種起源のキメラ抗体または相補性決定領域（C D R）グラフト化（g r a f t e d）抗体の状況下で産生され得る。ヒト化 2 0 5 P 1 B 5 抗体またはヒト 2 0 5 P 1 B 5 抗体もまた産生され得、そして治療的状況下での使用のために好ましい。1 つ以上の非ヒト抗体 C D R を、対応するヒト抗体配列と置換することによる、マウス抗体および他の非ヒト抗体をヒト化するための方法は、周知である（例えば、J o n e s ら、1 9 8 6、N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ; R i e c h m a n n ら、1 9 8 8、N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 ; V e r h o e y e n ら、1 9 8 8、S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6 を参照のこと）。C a r t e r ら、1 9 9 3、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S

40

50

A 89:4285、および Sims ら、1993、J. Immunol. 151:2296 もまた参照のこと。

【0125】

完全なヒトモノクローナル抗体を産生するための方法としては、ファージディスプレイ方法およびトランスジェニック方法が挙げられる（概要については、Vaughan ら、1998、Nature Biotechnology 16:535-539 を参照のこと）。完全なヒト 205P1B5 モノクローナル抗体は、大きいヒト Ig 遺伝子コンビナトリアルライブラリー（すなわち、ファージディスプレイ）を使用するクローニング技術を使用して生成され得る（Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications (Man. Clark, M. 編)、Nottingham Academic、45-64 頁（1993）の Griffiths および Hoogenboom、Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries; Burton および Barbas、Human Antibodies from combinatorial libraries (同書) 65-82 頁)。完全なヒト 205P1B5 モノクローナル抗体はまた、1997 年 12 月 3 日公開の PCT 特許出願 WO98/24893 (Kucheralapati および Jakobovits ら) に記載されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作されたトランスジェニックマウスを使用して産生され得る (Jakobovits、1998、Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):607-614; 米国特許第 6,162,963 号 (2000 年 12 月 19 日発行); 米国特許第 6,150,584 号 (2000 年 11 月 12 日発行); および米国特許第 6,114,598 号 (2000 年 9 月 5 日発行) もまた参照のこと)。この方法は、ファージディスプレイ技術に必要とされるインビトロ操作を回避し、そして高い親和性の真正ヒト抗体を効率的に産生する。

10

20

【0126】

205P1B5 抗体の 205P1B5 関連タンパク質との反応性は、多数の周知方法によって確立され得、これらの方法としては、適切な場合、205P1B5 関連タンパク質、205P1B5 発現細胞またはそれらの抽出物を使用する、ウェスタンブロット、免疫沈降、ELISA、および FACS 分析が挙げられるがこれらに限定されない。205P1B5 抗体またはそれらのフラグメントは、検出可能なマーカーで標識され得るか、または第二の分子に結合体化され得る。適切な検出可能なマーカーとしては、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、2つ以上の 205P1B5 エピトープに特異的な二重特異性 (bi-specific) 抗体が、当該分野で一般に公知の方法を使用して、作製される。ホモダイマー抗体もまた、当該分野で公知の架橋技術によって、作製され得る（例えば、Wolff ら、Cancer Res. 53:2560-2565）。

30

【0127】

(V.) 205P1B5 細胞免疫応答)

40

T 細胞が抗原を認識する機構は、解明されている。本発明の有効なペプチドエピトープワクチン組成物は、世界中の集団の非常に広範な区分において治療的免疫応答または予防的免疫応答を誘導する。細胞免疫応答を誘導する本発明の組成物の価値および効力の理解のために、免疫学関連技術の簡単な総説を示す。

【0128】

HLA 分子とペプチド抗原との複合体は、HLA 拘束 T 細胞によって認識されるリガンドとして作用する (Buus, S ら、Cell 47:1071, 1986; Babbitt, B. P. ら、Nature 317:359, 1985; Townsend, A. および Bodmer, H., Annu. Rev. Immunol. 7:601, 1989; Germain, R. N., Annu. Rev. Immunol. 11:403, 199

50

3)。単一のアミノ酸が置換された抗原アナログおよび内因性結合した天然でプロセシングされたペプチドの配列決定の研究を通して、HLA抗原分子への特異的結合に必要なモチーフに対応する重要な残基が、同定されており、表IVに記載される（例えば、Southwoodら、J. Immunol. 160:3363, 1998; Rammenseeら、Immunogenetics 41:178, 1995; Rammenseeら、SYFPEITHI (World Wide Webを介してURL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/にアクセスのこと); Sette, A. およびSidney, J. Curr. Opin. Immunol. 10:478, 1998; Engelhard, V. H., Curr. Opin. Immunol. 6:13, 1994; Sette, A. およびGrey, H. M., Curr. Opin. Immunol. 4:79, 1992; Sinigaglia, F. およびHammer, J. Curr. Biol. 6:52, 1994; Ruppertら、Cell 74:929-937, 1993; Kondoら、J. Immunol. 155:4307-4312, 1995; Sidneyら、J. Immunol. 157:3480-3490, 1996; Sidneyら、Human Immunol. 45:79-93, 1996; Sette, A. およびSidney, J. Immunogenetics 1999 nov; 50(3-4):201-12、総説を参照のこと）。

【0129】

さらに、HLA-ペプチド複合体のX線結晶学的分析は、対立遺伝子特異的様式においてペプチドリガンドにより保有される残基を収容するHLA分子のペプチド結合間隙／溝部内のポケットを明らかにし；次いで、これらの残基は、この残基が存在するペプチドのHLA結合能を決定する（例えば、Madden, D. R. Annu. Rev. Immunol. 13:587, 1995; Smithら、Immunity 4:203, 1996; Fremontら、Immunity 8:305, 1998; Sternら、Structure 2:245, 1994; Jones, E. Y. Curr. Opin. Immunol. 9:75, 1997; Brown, J. H. ら、Nature 364:33, 1993; Guo, H. C. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8053, 1993; Guo, H. C. ら、Nature 360:364, 1992; Silver, M. L. ら、Nature 360:367, 1992; Matsumura, M. ら、Science 257:927, 1992; Maddenら、Cell 70:1035, 1992; Fremont, D. H. ら、Science 257:919, 1992; Saper, M. A, Bjorkman, P. J. およびWiley, D. C., J. Mol. Biol. 219:277, 1991を参照のこと）。

【0130】

従って、クラスIおよびクラスIIの対立遺伝子特異的HLA結合モチーフ、またはクラスIおよびクラスIIのスーパーモチーフの定義は、特定のHLA抗原への結合と関連するタンパク質内の領域の同定を可能にする。

【0131】

従って、HLAモチーフの同定プロセスによって、エピトープベースのワクチンの候補が、同定されている；このような候補は、エピトープとその対応するHLA分子との会合の結合親和性および／または期間を決定するために、HLA-ペプチド結合アッセイによりさらに評価され得る。これらのワクチン候補の中から、集団適用範囲および／または免疫原性の観点で好ましい特徴を有するエピトープを選択するために、さらなる確証実験が行われ得る。

【0132】

種々のストラテジーが、細胞免疫原性を評価するために使用され得、これには以下が挙げられる：

1) 正常な個体由来の一次T細胞培養物の評価（例えば、Wentworth, P. A. ら、Mol. Immunol. 32:603, 1995; Celis, E. ら、Proc

. Natl. Acad. Sci. USA 91:2105, 1994; Tsai, V. ら、J. Immunol. 158:1796, 1997; Kawashima, I. ら、Human Immunol. 59:1, 1998を参照のこと)。この手順は、抗原提示細胞の存在下で、インビトロで数週間の期間にわたって、正常な被験体由来の末梢血リンパ球 (PBL) を試験ペプチドで刺激することを包含する。このペプチドに特異的なT細胞は、この時間の間に活性化され、そして例えば、ペプチドで感作された標的細胞を含むリンホカイン放出アッセイまたは⁵¹Cr放出アッセイを使用して、検出される。

【0133】

2) HLAトランスジェニックマウスの免疫 (例えば、Wentworth, P. A ら、J. Immunol. 26:97, 1996; Wentworth, P. A. ら、Int. Immunol. 8:651, 1996; Alexander, J. ら、J. Immunol. 159:4753, 1997を参照のこと)。例えば、このような方法において、不完全フロイントアジュバント中のペプチドが、HLAトランスジェニックマウスに皮下投与される。免疫の数週間後、脾細胞が取り出され、そして試験ペプチドの存在下で、約1週間インビトロで培養される。ペプチド特異的T細胞は、例えば、ペプチドで感作された標的細胞および内因的に生成された抗原を発現する標的細胞を含む、⁵¹Cr放出アッセイを使用して、検出される。

【0134】

3) 効果的にワクチン接種された免疫個体および／または慢性的に病気の患者のいずれか由来のリコールT細胞応答の証明 (例えば、Rehermann, B. ら、J. Exp. Med. 181:1047, 1995; Doolan, D. L. ら、Immunity 7:97, 1997; Bertoni, R. ら、J. Clin. Invest. 100:503, 1997; Threlkeld, S. C. ら、J. Immunol. 159:1648, 1997; Diepolder, H. M. ら、J. Virol. 71:6011, 1997を参照のこと)。従って、リコール応答は、疾患に起因して抗原に曝露され、従って「自然に」免疫応答を生成した被験体由来のPBL、または抗原に対してワクチン接種された患者由来のPBLを培養することによって、検出される。被験体由来のPBLは、試験ペプチド+抗原提示細胞 (APC) の存在下で1~2週間、インビトロで培養され、「未刺激」T細胞と比較して「記憶」T細胞の活性化を可能にする。この培養期間の最後に、T細胞活性が、ペプチドで感作した標的を含む⁵¹Cr放出、T細胞増殖またはリンホカイン放出を含むアッセイを使用して、検出される。

【0135】

(VI.) 205P1B5トランスジェニック動物)

205P1B5関連タンパク質をコードする核酸はまた、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物のいずれかを作製するために使用され得、この動物は、次いで、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である。確立された技術によって、205P1B5をコードするcDNAが、205P1B5をコードするゲノムDNAをクローン化するために使用され得る。次いで、このクローン化されたゲノム配列は、205P1B5をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。トランスジェニック動物 (特に、マウスまたはラットのような動物) を作製するための方法は、当該分野で通常になっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号 (1988年4月12日発行) および同第4,870,009号 (1989年9月26日発行) において記載されている。代表的には、特定の細胞が、組織特異的エンハンサーを用いる205P1B5導入遺伝子組込みのために標的化される。

【0136】

205P1B5をコードする1コピーの導入遺伝子を含むトランスジェニック動物は、205P1B5をコードするDNAの発現を増加する効果を試験するために使用され得る。このような動物は、例えば、その過剰発現に関連する病理学的状態からの防御を付与すると考えられる試薬についてのテスター動物として使用され得る。本発明のこの局面によると、動物は、試薬で処置され、そしてこの導入遺伝子を有する未処置の動物と比較して減

少しした病理学的状態の発生率は、この病理学的状態に対する潜在的な治療的介入を示す。

【0137】

あるいは、205P1B5の非ヒトホモログは、205P1B5「ノックアウト」動物を構築するために使用され得、この205P1B5「ノックアウト」動物は、205P1B5をコードする内在性遺伝子と、この動物の胚性細胞に導入された205P1B5をコードする変化したゲノムDNAとの間の相同組換えの結果として、205P1B5をコードする欠損遺伝子または変化した遺伝子を有する。例えば、205P1B5をコードするcDNAは、確立された技術に従って、205P1B5をコードするゲノムDNAをクローン化するために使用され得る。205P1B5をコードするゲノムDNAの一部は、欠失され得るか、または別の遺伝子（例えば、組込みをモニタリングするために使用され得る選択マーカーをコードする遺伝子）で置換され得る。代表的には、数千ベースの変化していない隣接DNA（5'末端と3'末端との両方）が、ベクター中に含まれる（例えば、相同組換えベクターの説明については、ThomasおよびCapecci, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと）。このベクターは、胚性幹細胞株に（例えば、エレクトロポレーションによって）導入され、そしてこの導入されたDNAが内因性DNAと相同組換えされた細胞が、選択される（例えば、Liら、Cell, 69:915 (1992)を参照のこと）。ついで、この選択された細胞は、動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞に注入されて、凝集キメラが形成される（例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編 (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152を参照のこと）。キメラ胚は、次いで、適切な偽妊娠雌性代理母動物に移植され得、そしてこの胚は、出産されて、「ノックアウト」動物が作製される。生殖細胞中に相同組換えされたDNAを有する子孫が、標準的な技術によって同定され得、そして全ての細胞が相同組み替えされたDNAを含む動物を育種させるために使用され得る。ノックアウト動物は、例えば、特定の病理学的状態に対して防御する能力について、または205P1B5ポリペプチドの非存在に起因する病理学的状態の発症について、特徴付けされ得る。

10

20

【0138】

(V I I.) 205P1B5の検出方法)

本発明の別の局面は、205P1B5ポリヌクレオチドおよび205P1B5関連タンパク質を検出するための方法、ならびに205P1B5を発現する細胞を同定するための方法に関する。205P1B5の発現プロファイルは、205P1B5を、転移した疾患についての診断マーカーにする。従って、205P1B5遺伝子産物の状態は、進行した病期の疾患に対する感受性、進行速度および／または腫瘍の攻撃性を含む種々の因子を推定するために有用な情報を提供する。本明細書中で詳細に議論されるように、患者サンプル中の205P1B5遺伝子産物の状態が、当該分野で周知の種々のプロトコルによって分析され得、このプロトコルとしては、免疫組織化学分析、種々のノーザンブロット技術（インサイチュハイブリダイゼーションを含む）、RT-PCR分析（例えば、レーザー捕捉微小解剖サンプルについて）、ウェスタンブロット分析および組織アレイ分析が挙げられる。

30

40

【0139】

より詳細には、本発明は、生物学的サンプル（例えば、血清、骨、前立腺および他の組織、尿、精液、細胞調製物など）中の205P1B5ポリヌクレオチドの検出のためのアッセイを提供する。検出可能な205P1B5ポリヌクレオチドとしては、例えば、205P1B5遺伝子またはそのフラグメント、205P1B5 mRNA、選択的スプライス改変体205P1B5 mRNA、および205P1B5ポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子またはRNA分子が挙げられる。205P1B5ポリヌクレオチドを増幅し、そして／または205P1B5ポリヌクレオチドの存在を検出するための多数の方法が、当該分野で周知であり、本発明のこの局面の実施において用いられ得る。

【0140】

50

一実施形態において、生物学的サンプル中の 205P1B5 mRNA を検出するための方法は、少なくとも 1 つのプライマーを使用して、逆転写によりこのサンプルから cDNA を生成する工程；センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして 205P1B5 ポリヌクレオチドを使用して、このようにして生成された cDNA を増幅して、その中の 205P1B5 cDNA を増幅する工程；およびこの増幅された 205P1B5 cDNA の存在を検出する工程、を包含する。必要に応じて、この増幅された 205P1B5 cDNA の配列が、決定され得る。

【0141】

別の実施形態において、生物学的サンプル中の 205P1B5 遺伝子を検出する方法は、第 1 に、このサンプルからゲノム DNA を単離する工程；センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして 205P1B5 ポリヌクレオチドを使用して、この単離された DNA を増幅する工程；およびこの増幅された 205P1B5 遺伝子の存在を検出する工程、を包含する。多数の適切なセンスプローブとアンチセンスプローブとの組合せが、205P1B5 について提供されるヌクレオチド配列（図 2）から設計され得、そしてこの目的のために使用され得る。

10

【0142】

本発明はまた、組織または他の生物学的サンプル（例えば、血清、精液、骨、前立腺、尿、細胞調製物など）中の 205P1B5 タンパク質の存在を検出するためのアッセイを提供する。205P1B5 関連タンパク質を検出するための方法もまた、周知であり、これには、例えば、免疫沈降、免疫組織化学分析、ウェスタンブロット分析、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFA などが挙げられる。例えば、生物学的サンプル中の 205P1B5 関連タンパク質の存在を検出する方法は、第 1 に、このサンプルと、205P1B5 抗体、その 205P1B5 反応性フラグメント、または 205P1B5 抗体の抗原結合領域を含む組換えタンパク質とを接触させる工程；次いで、このサンプル中の 205P1B5 関連タンパク質の結合を検出する工程、を包含する。

20

【0143】

205P1B5 を発現する細胞を同定するための方法もまた、本発明の範囲内である。一実施形態において、205P1B5 遺伝子を発現する細胞を同定するためのアッセイは、この細胞中の 205P1B5 mRNA の存在を検出する工程を包含する。細胞中の特定の mRNA を検出するための方法は、周知であり、そして例えば、相補的 DNA プローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、標識された 205P1B5 リボプローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーション、ノーザンブロットおよび関連の技術）、および種々の核酸増幅アッセイ（例えば、205P1B5 に対して特異的な相補的プライマーを使用する RT-PCR、および他の増幅型検出方法（例えば、分枝状 DNA、SISBA、TMA など））が挙げられる。あるいは、205P1B5 遺伝子を発現する細胞を同定するためのアッセイは、この細胞中に存在するか、またはこの細胞により分泌される 205P1B5 関連タンパク質の存在を検出する工程を包含する。タンパク質の検出のための種々の方法が、当該分野で周知であり、そして 205P1B5 関連タンパク質の検出のためおよび 205P1B5 関連タンパク質を発現する細胞の検出のために用いられる。

30

40

【0144】

205P1B5 発現分析はまた、205P1B5 遺伝子発現を調節する因子を同定および評価するための手段として有用である。例えば、205P1B5 発現は、前立腺癌において有意にアップレギュレートされ、そして表 I に列挙される組織の癌において発現される。癌細胞における 205P1B5 発現または 205P1B5 過剰発現を阻害する分子または生物学的因子の同定は、治療的価値を有する。例えば、このような因子は、RT-PCR、核酸ハイブリダイゼーションまたは抗体結合により 205P1B5 発現を定量するスクリーニングを使用することによって、同定され得る。

【0145】

(VII) 205P1B5 関連遺伝子およびそれらの産物の状態をモニタリングする

50

ための方法)

腫瘍形成は、細胞増殖が次第に調節不全になり、細胞が正常な生理学的状態から前癌状態まで進行し、次いで癌状態まで進行する、多段階プロセスであることが知られている（例えば、A l e r s ら、L a b I n v e s t . 7 7 (5) : 4 3 7 - 4 3 8 (1 9 9 7) および I s a a c s ら、C a n c e r S u r v . 2 3 : 1 9 - 3 2 (1 9 9 5) を参照のこと）。この状況において、生物学的サンプルを調節不全性の細胞増殖の証拠（例えば、癌における異常な 2 0 5 P 1 B 5 発現）について試験することにより、癌のような病理学的状態が、治療選択肢がより制限される段階まで進行する前、そして／または予後が悪化する前に、このような異常な生理学を早期に検出することが可能になる。このような試験において、目的の生物学的サンプル中の 2 0 5 P 1 B 5 の状態が、例えば、対応する正常なサンプル（例えば、病理により影響を受けていない、この個体または代替の別の個体由来のサンプル）中の 2 0 5 P 1 B 5 の状態と比較され得る。生物学的サンプル中の 2 0 5 P 1 B 5 の状態における（正常なサンプルと比較した場合の）変化は、調節不全性の細胞増殖の証拠を提供する。病理により影響を受けていない生物学的サンプルを正常なサンプルとして使用することに加えて、所定の規範値（例えば、mRNA 発現の所定の正常なレベル）（例えば、G r e v e r ら、J . C o m p . N e u r o l . 1 9 9 6 D e c 9 ; 3 7 6 (2) : 3 0 6 - 1 4 および米国特許第 5 , 8 3 7 , 5 0 1 号を参照のこと）もまた、サンプル中の 2 0 5 P 1 B 5 の状態を比較するために使用され得る。

10

【0146】

この文脈において、用語「状態」は、当該分野で認められた意味に従って使用され、遺伝子およびその産物の状態（c o n d i t i o n または s t a t e）をいう。代表的には、当業者は、多数のパラメーターを使用して、遺伝子およびその産物の状態（c o n d i t i o n または s t a t e）を評価する。これには、発現された遺伝子産物の位置（2 0 5 P 1 B 5 発現細胞の位置を含む）、ならびに発現された遺伝子産物（例えば、2 0 5 P 1 B 5 mRNA、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド）のレベルおよび生物学的活性が挙げられるが、これらに限定されない。代表的には、2 0 5 P 1 B 5 の状態における変化は、2 0 5 P 1 B 5 および／または 2 0 5 P 1 B 5 発現細胞の位置における変化、ならびに／あるいは 2 0 5 P 1 B 5 mRNA および／または 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の発現の増加を含む。

20

【0147】

サンプル中の 2 0 5 P 1 B 5 の状態は、当該分野で周知の多数の手段によって分析され得、この手段としては、免疫組織化学分析、インサイチュハイブリダイゼーション、レーザー捕捉微小解剖サンプルに対する RT-PCR 分析、ウェスタンブロット分析および組織アレイ分析が挙げられるが、これらに限定されない。2 0 5 P 1 B 5 遺伝子および遺伝子産物の状態を評価するための代表的なプロトコルは、例えば、A u s u b e l ら編、1 9 9 5 , C u r r e n t P r o t o c o l s I n M o l e c u l a r B i o l o g y , U n i t s 2 (N o r t h e r n B l o t t i n g) , 4 (S o u t h e r n B l o t t i n g) , 1 5 (I m m u n o b l o t t i n g) および 1 8 (P C R A n a l y s i s) に見出される。従って、生物学的サンプル中の 2 0 5 P 1 B 5 の状態は、当業者により使用される種々の方法によって評価され、これらの方法としては、ゲノムサザン分析（例えば、2 0 5 P 1 B 5 遺伝子中の変動（p e r t u r b a t i o n）を試験するため）、2 0 5 P 1 B 5 mRNA のノーザン分析および／または PCR 分析（例えば、ポリヌクレオチド配列または 2 0 5 P 1 B 5 mRNA の発現レベルにおける変化を試験するため）、ならびにウェスタン分析および／または免疫組織化学分析（例えば、ポリペプチド配列における変更、サンプル内のポリペプチドの局在化における変化、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の発現レベルにおける変化、および／または 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質とポリペプチド結合パートナーとの会合を試験するため）が挙げられるが、これらに限定されない。検出可能な 2 0 5 P 1 B 5 ポリヌクレオチドとしては、例えば、2 0 5 P 1 B 5 遺伝子またはそのフラグメント、2 0 5 P 1 B 5 mRNA、選択的スプライス改変体、2 0 5 P 1 B 5 mRNA、および 2 0 5 P 1 B 5 ポリヌクレオチドを含む組換え D

30

40

50

N A 分子または組換え R N A 分子が挙げられる。

【0148】

205 P 1 B 5 の発現プロファイルは、205 P 1 B 5 を局所疾患および／または転移性疾患についての診断マーカーとし、そして生物学的サンプルの増殖または腫瘍形成の可能性についての情報を提供する。特に、205 P 1 B 5 の状態は、特定の疾患段階、進行および／または腫瘍の攻撃性に対する感受性を推定するために有用な情報を提供する。本発明は、205 P 1 B 5 の状態を決定し、205 P 1 B 5 を発現する癌（例えば、表 I に列挙される組織の癌）を診断するための方法およびアッセイを提供する。例えば、205 P 1 B 5 m R N A は、正常な前立腺組織と比較して前立腺癌および他の癌において高度に発現されるので、生物学的サンプル中の 205 P 1 B 5 m R N A 転写産物または 205 P 1 B 5 タンパク質のレベルを評価するアッセイが、205 P 1 B 5 の調節不全と関連する疾患を診断するために使用され得、そして適切な治療選択肢を規定する際に有用な予後情報を提供し得る。

【0149】

205 P 1 B 5 の発現状態は、形成異常細胞、前癌状態の細胞および癌細胞の存在、病期および位置を含む、種々の段階の疾患に対する感受性を予測する情報、および／または腫瘍の攻撃性を評価するための情報を提供する。さらに、発現プロファイルは、205 P 1 B 5 を、転移性疾患のための画像化試薬として有用にする。結果的に、本発明の局面は、生物学的サンプル（例えば、調節不全性の細胞増殖により特徴付けられる病理（例えば、癌）に罹患している個体由来のサンプル、またはこのような病理に罹患している疑いのある個体由来のサンプル）中の 205 P 1 B 5 の状態を試験するための種々の分子予後方法および分子診断方法に関する。

【0150】

上記のように、生物学的サンプル中の 205 P 1 B 5 の状態は、当該分野で周知の多数の手順によって試験され得る。例えば、身体の特定の位置から採取された生物学的サンプル中の 205 P 1 B 5 の状態は、このサンプルを、205 P 1 B 5 発現細胞（例えば、205 P 1 B 5 m R N A または 205 P 1 B 5 タンパク質を発現する細胞）の存在または非存在について評価することによって、試験され得る。この試験は、例えば、205 P 1 B 5 発現細胞が、通常ではこのような細胞を含まない生物学的サンプル（例えば、リンパ節）中に見出された場合、調節不全性の細胞増殖の証拠を提供し得る。なぜなら、生物学的サンプル中の 205 P 1 B 5 の状態におけるこのような変化は、しばしば、調節不全性の細胞増殖に関連するからである。詳細には、調節不全性の細胞増殖の 1 つの指標は、起源の器官（例えば、前立腺）から身体の異なる領域（例えば、リンパ節）への癌細胞の転移である。この状況において、調節不全性の細胞増殖の証拠は、重要である。なぜなら、例えば、前立腺癌を有する患者のうちのかなりの比率において、潜伏性リンパ節転移が検出され得、そしてこのような転移は、疾患の進行の既知の予測因子と関連するからである（例えば、Murphy ら、Prostate 42 (4) : 315-317 (2000) ; Su ら、Semin. Surg. Oncol. 18 (1) : 17-28 (2000) および Freeman ら、J Urol 1995 Aug 154 (2 Pt 1) : 474-8 を参照のこと）。

【0151】

1 つの局面において、本発明は、調節不全性の細胞増殖に関連する疾患（例えば、過形成または癌）を有すると疑われる個体由来の細胞により発現される 205 P 1 B 5 遺伝子産物の状態を決定し、次いでこのように決定した状態を、対応する正常なサンプル中の 205 P 1 B 5 遺伝子産物の状態と比較することによって、205 P 1 B 5 遺伝子産物をモニタリングするための方法を提供する。正常なサンプルと比較して、試験サンプル中の異常な 205 P 1 B 5 遺伝子産物の存在は、個体の細胞内の調節不全性の細胞増殖の存在の指標を提供する。

【0152】

別の局面において、本発明は、個体における癌の存在を決定する際に有用なアッセイを提

10

20

30

40

50

供し、このアッセイは、対応する正常な細胞または正常な組織における発現レベルと比較して、試験細胞サンプルまたは試験組織サンプル中の 205 P 1 B 5 mRNA またはタンパク質の発現の有意な増加を検出する工程を包含する。例えば、205 P 1 B 5 mRNA の存在は、表 I に列挙される組織サンプルを包含するがそれに限定されない組織サンプルにおいて評価され得る。これらの組織のいずれかにおける有意な 205 P 1 B 5 発現の存在は、癌の発症、存在および／または重篤度を示すために有用である。なぜなら、対応する正常な組織は、205 P 1 B 5 mRNA を発現しないか、これを低レベルでしか発現しないからである。

【0153】

関連の実施形態において、205 P 1 B 5 の状態は、核酸レベルでよりもむしろタンパク質レベルで決定される。例えば、このような方法は、試験組織サンプル中の細胞により発現される 205 P 1 B 5 タンパク質のレベルを決定し、このように決定されたレベルを、対応する正常なサンプルにおいて発現される 205 P 1 B 5 のレベルと比較する工程を包含する。一実施形態において、205 P 1 B 5 タンパク質の存在は、例えば、免疫組織化学方法を使用して、評価される。205 P 1 B 5 タンパク質発現を検出し得る 205 P 1 B 5 抗体または 205 P 1 B 5 結合パートナーが、この目的のために、当該分野で周知の種々のアッセイ様式で使用される。

【0154】

さらなる実施形態において、生物学的サンプル中の 205 P 1 B 5 ヌクレオチド配列および 205 P 1 B 5 アミノ酸配列の状態が、これらの分子の構造における変動を同定するために、評価され得る。これらの変動としては、挿入、欠失、置換などが挙げられ得る。このような評価は、有用である。なぜなら、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における変動は、増殖調節不全性の表現型と関連する多数のタンパク質において観察されるからである（例えば、Marroggiら、1999, J. Cutan. Pathol. 26 (8) : 369-378 を参照のこと）。例えば、205 P 1 B 5 の配列における変異は、腫瘍の存在または発癌補助作用を示し得る。従って、このようなアッセイは、205 P 1 B 5 における変異が潜在的な機能喪失または腫瘍増殖の増加を示す場合、診断的価値および予測的価値を有する。

【0155】

ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における変動を観察するための広範な種々のアッセイが、当該分野で周知である。例えば、205 P 1 B 5 遺伝子産物の核酸配列またはアミノ酸配列のサイズおよび構造は、本明細書中で考察されるノーザンプロトコル、サザンプロトコル、ウェスタンプロトコル、PCR プロトコルおよび DNA 配列決定プロトコルにより観察される。さらに、ヌクレオチド配列および核酸配列における変動を観察するための他の方法（例えば、単鎖高次構造多型分析）が、当該分野で周知である（例えば、米国特許第 5,382,510 号（1999 年 9 月 7 日発行）および同第 5,952,170 号（1995 年 1 月 17 日発行）を参照のこと）。

【0156】

さらに、生物学的サンプル中の 205 P 1 B 5 遺伝子のメチル化状態が試験され得る。遺伝子の 5' 調節領域中の CpG アイランドの異常な脱メチル化および／または過剰メチル化が、しばしば、不死化細胞および形質転換細胞において生じ、種々の遺伝子の変化した発現を生じ得る。例えば、πクラスのグルタチオン S-トランスフェラーゼ（正常な前立腺において発現されるタンパク質であり、前立腺癌の 90% より多くにおいては発現されない）のプロモーター過剰メチル化は、この遺伝子の転写を永久的に止めるようであり、最も頻繁に検出される前立腺癌におけるゲノム変化である（De Marzoら、Am. J. Pathol. 155 (6) : 1985-1992 (1999)）。さらに、この変化は、高度な前立腺上皮内新形成（PIN）の症例のうちの少なくとも 70% において存在する（Brooksら、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7 : 531-536）。別の例において、LAG E-I 腫瘍特異的遺伝子の発現（これは、正常な前立腺においては発現されないが、前立腺癌の 20～5

0%において発現される)は、リンパ芽球細胞においてデオキシアザシチジンにより誘導され、このことは、腫瘍発現が脱メチル化に起因することを示唆している(Letthera, Int. J. Cancer 76(6):903-908(1998))。遺伝子のメチル化状態を試験するための種々のアッセイが、当該分野で周知である。例えば、サザンハイブリダイゼーションアプローチにおいて、メチル化されたCpG部位を含む配列を切断し得ないメチル化感受性制限酵素を使用して、CpGアイランドのメチル化状態を評価し得る。さらに、MSP(メチル化特異的PCR)は、所定の遺伝子のCpGアイランド中に存在する全てのCpG部位のメチル化状態を容易にプロファイルし得る。この手順は、亜硫酸水素ナトリウム(これはメチル化されていない全てのシトシンをウラシルに変換する)によりまずDNAを改変し、続いてメチル化されていないDNAに対してメチル化されたDNAに特異的なプライマーを使用して増幅することを包含する。メチル化干渉を含むプロトコルはまた、例えば、Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubelら編、1995において見出され得る。

10

【0157】

遺伝子増幅は、205P1B5の状態を評価するためのさらなる方法である。遺伝子増幅は、本明細書中で提供される配列に基づいて、例えば、適切に標識されたプローブを使用して、mRNAの転写を定量するための従来のサザンブロットティングまたはノーザンブロットティング(Thomas, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205)、ドットブロットティング(DNA分析)、またはインサイチュハイブリダイゼーションによってサンプル中で直接測定される。あるいは、特定の二重鎖(DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む)を認識する抗体が、使用される。次いで、この抗体は、標識され、そしてアッセイが実施され、このアッセイにおいて、この二重鎖は、表面に結合され、その結果、この表面上で二重鎖が形成されると、この二重鎖に結合した抗体の存在が、検出され得る。

20

【0158】

生検組織または末梢血が、例えば、ノーザン分析、ドットブロット分析またはRT-PCR分析を使用して、癌細胞の存在について簡便にアッセイされて、205P1B5発現が検出され得る。RT-PCR増幅可能な205P1B5 mRNAの存在は、癌の存在の指標を提供する。RT-PCRアッセイは、当該分野で周知である。末梢血中の腫瘍細胞のためのRT-PCR検出アッセイは、多数のヒト固形腫瘍の診断および管理において使用するために、現在評価されている。前立腺癌の分野において、このアッセイには、PSAおよびPSMを発現する細胞の検出のためのRT-PCRアッセイが挙げられる(Verkaiら、1997, Urol. Res. 25:373-384; Ghosseinら、1995, J. Clin. Oncol. 13:1195-2000; Hestonら、1995, Clin. Chem. 41:1687-1688)。

30

【0159】

本発明のさらなる局面は、発症中の癌に対して個体が有する感受性の評価である。一実施形態において、癌に対する感受性を予想するための方法は、組織サンプル中の205P1B5 mRNAまたは205P1B5タンパク質(その存在は、癌に対する感受性を示す)を検出する工程を包含し、ここで、205P1B5 mRNA発現の程度は、感受性の程度と相関する。特定の実施形態において、前立腺または他の組織中の205P1B5の存在が、試験され、ここで、このサンプル中の205P1B5の存在は、前立腺癌感受性(または前立腺腫瘍の発症もしくは存在)の指標を提供する。同様に、生物学的サンプル中の205P1B5ヌクレオチド配列および205P1B5アミノ酸配列の完全性を評価して、これらの分子の構造における変動(例えば、挿入、欠失、置換など)を同定し得る。サンプル中の205P1B5遺伝子産物の1つ以上の変動の存在は、癌感受性(または腫瘍の発症もしくは存在)の指標である。

40

【0160】

50

本発明はまた、腫瘍の攻撃性を評価するための方法を包含する。一実施形態において、腫瘍の攻撃性を評価するための方法は、腫瘍細胞によって発現される 205 P 1 B 5 m R N A または 205 P 1 B 5 タンパク質のレベルを決定する工程、このように決定したレベルを、同じ個体もしくは正常な組織参照サンプルから採取した対応する正常な組織において発現される 205 P 1 B 5 m R N A または 205 P 1 B 5 タンパク質のレベルと比較する工程を包含し、ここで正常なサンプルに対する腫瘍サンプルにおける 205 P 1 B 5 m R N A または 205 P 1 B 5 タンパク質の発現の程度は、攻撃性の程度を示す。特定の実施形態において、腫瘍の攻撃性は、205 P 1 B 5 が腫瘍細胞において発現される程度を決定することによって評価され、ここでより高い発現レベルは、より攻撃性の腫瘍を示す。別の実施形態は、205 P 1 B 5 ヌクレオチドおよびアミノ酸の構造における変動（例えば、挿入、欠失、置換など）を同定するための、生物学的サンプル中のこの 205 P 1 B 5 ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の完全性の評価である。1つ以上の変動の存在は、より攻撃性の腫瘍を示す。

10

【0161】

本発明の別の実施形態は、個体における悪性腫瘍の進行を経時的に観察するための方法に関する。一実施形態において、個体における悪性腫瘍の進行を経時的に観察するための方法は、腫瘍のサンプル中の細胞により発現される 205 P 1 B 5 m R N A または 205 P 1 B 5 タンパク質のレベルを決定する工程、このようにして決定されたレベルを、異なる時間に同じ個体から採取した同等な組織サンプルにおいて発現される 205 P 1 B 5 m R N A または 205 P 1 B 5 タンパク質のレベルと比較する工程、を包含し、ここで、経時的な腫瘍サンプルにおける 205 P 1 B 5 m R N A または 205 P 1 B 5 タンパク質の発現の程度は、癌の進行についての情報を提供する。特定の実施形態において、癌の進行は、腫瘍細胞における 205 P 1 B 5 の発現を経時的に決定することにより評価され、ここで経時的に増加した発現は、癌の進行を示す。また、生物学的サンプル中の 205 P 1 B 5 ヌクレオチド配列および 205 P 1 B 5 アミノ酸配列の完全性を評価して、これらの分子の構造における変動（例えば、挿入、欠失、置換など）を同定し得、ここで、1つ以上の変動の存在は、癌の進行を示す。

20

【0162】

上記の診断アプローチは、当該分野で公知の広範な種々の予後プロトコルおよび診断プロトコルのいずれか1つと組み合わされ得る。例えば、本発明の別の実施形態は、205 P 1 B 5 遺伝子の発現および 205 P 1 B 5 遺伝子産物の発現（または 205 P 1 B 5 遺伝子の変動および 205 P 1 B 5 遺伝子産物における変動）、組織サンプルの状態を診断および予想するための手段としての悪性腫瘍に関連する因子との間の同時発生に関する。悪性腫瘍に関連する広範な種々の因子（例えば、悪性腫瘍に関連する遺伝子（例えば、前立腺癌についての P S A、P S C A および P S M の発現など）、ならびに肉眼で見える細胞学的知見）が、使用され得る（例えば、B o c k i n g r a、1984、A n a l . Q u a n t . C y t o l . 6 (2) : 74-88 ; E p s t e i n、1995、H u m . P a t h o l . 26 (2) : 223-9 ; T h o r s o n r a、1998、M o d . P a t h o l . 11 (6) : 543-51 ; B a i s d e n r a、1999、A m . J . S u r g . P a t h o l . 23 (8) ; 918-24を参照のこと）。205 P 1 B 5 遺伝子の発現および 205 P 1 B 5 遺伝子産物の発現（または、205 P 1 B 5 遺伝子および 205 P 1 B 5 遺伝子産物における変動）と、悪性腫瘍に関連する別の因子との間の同時発生を観察するための方法は、有用である。なぜなら、例えば、疾患と同時に生じる特定の因子のセットの存在は、組織サンプルの状態を診断および予測するために重要な情報を提供するからである。

30

40

【0163】

一実施形態において、205 P 1 B 5 遺伝子の発現と 205 P 1 B 5 遺伝子産物の発現（または、205 P 1 B 5 遺伝子および 205 P 1 B 5 遺伝子産物における変動）と、悪性腫瘍に関連する別の因子との間の同時発生を観察するための方法は、組織サンプル中の 205 P 1 B 5 m R N A および 205 P 1 B 5 タンパク質の過剰発現を検出すること、組

50

組織サンプル中の P S A m R N A または P S A タンパク質の過剰発現（または P S C A 発現もしくは P S M 発現）を検出すること、および 2 0 5 P 1 B 5 m R N A もしくは 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の過剰発現と、P S A m R N A もしくは P S A タンパク質の過剰発現（または P S C A 発現もしくは P S M 発現）との同時発生を観察することを伴う。特定の実施形態において、前立腺組織における 2 0 5 P 1 B 5 m R N A および P S A m R N A の発現が、試験され、ここで、このサンプル中の 2 0 5 P 1 B 5 m R N A 過剰発現と P S A m R N A 過剰発現との同時発生は、前立腺癌の存在、前立腺癌感受性または前立腺腫瘍の発症もしくは状態を示す。

【0164】

2 0 5 P 1 B 5 m R N A またはタンパク質の発現を検出および定量するための方法が、
本明細書中に記載されており、そして標準核酸およびタンパク質の検出技術および定量技
術は、当該分野で周知である。2 0 5 P 1 B 5 m R N A の検出および定量するための標
準方法としては、標識 2 0 5 P 1 B 5 リボプローブを使用するインサイチュハイブリダイ
ゼーション、2 0 5 P 1 B 5 ポリヌクレオチドプローブを使用するノーザンブロットおよ
び関連する技術、2 0 5 P 1 B 5 に対して特異的なプライマーを使用する R T - P C R 分
析、並びに他の増幅型検出方法（例えば、分枝 D N A、S I S B A、T M A など）が挙げ
られる。特定の実施形態において、半定量的 R T - P C R を使用して、2 0 5 P 1 B 5
m R N A 発現を検出および定量する。2 0 5 P 1 B 5 を増幅し得る任意の数のプライマー
を、この目的のために使用し得、このプライマーとしては、本明細書中で具体的に記載さ
れる種々のプライマーセットが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態に
おいて、野生型 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質と特異的に反応するポリクローナル抗体または
モノクローナル抗体を、生検組織の免疫組織化学アッセイにおいて使用し得る。

【0165】

（I X. 2 0 5 P 1 B 5 と相互作用する分子の同定）

本明細書中に開示される 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質および核酸配列は、当業者が、2 0 5
P 1 B 5 と相互作用するタンパク質、低分子および他の薬剤、ならびに種々の分野で受け
入れられたプロトコルのうちのいずれか 1 つを介して、2 0 5 P 1 B 5 によって活性化さ
れる経路を同定することを可能にする。例えば、いわゆる相互作用トラップ系（「2 ハイ
ブリッドアッセイ」とも呼ばれる）のうちの 1 つを利用し得る。このような系において、
分子は、レポーター遺伝子の発現を指向する転写因子と相互作用し、そして再構成し、一
方でこのレポーター遺伝子の発現をアッセイする。他の系は、真核生物転写活性化因子の
再構築を介して、インビボでタンパク質-タンパク質相互作用を同定する（例えば、1 9
9 9 年 9 月 2 1 日に発行された米国特許第 5, 9 5 5, 2 8 0 号、1 9 9 9 年 7 月 2 0 日
に発行された同第 5, 9 2 5, 5 2 3 号、1 9 9 8 年 1 2 月 8 日に発行された同第 5, 8
4 6, 7 2 2 号、および 1 9 9 9 年 1 2 月 2 1 日に発行された同第 6, 0 0 4, 7 4 6 号
を参照のこと）。アルゴリズムもまた、タンパク質機能のゲノムベースの予測のために当
該分野で利用可能である（例えば、M a r c o t t e ら, N a t u r e 4 0 2 : 1 9 9
9 年 1 1 月 4 日, 8 3 - 8 6 を参照のこと）。

【0166】

あるいは、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質配列と相互作用する分子を同定するために、ペプチ
ドライブラリをスクリーニングし得る。このような方法において、2 0 5 P 1 B 5 に結合
するペプチドは、アミノ酸のランダムな収集物または制御された収集物をコードするライ
ブラリをスクリーニングすることによって同定される。このライブラリによってコー
ドされたペプチドは、バクテリオファージコートタンパク質の融合タンパク質として発現
され、次いで、このバクテリオファージ粒子は、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質に対してスク
リーニングされる。

【0167】

従って、広範な種々の用途（例えば、治療剤、予後剤または診断剤）を有するペプチドは
、予想されるリガンド分子またはレセプター分子の構造に関する以前の情報なしで同定さ
れる。2 0 5 P 1 B 5 タンパク質配列と相互作用する分子を同定するために使用され得る

、代表的なペプチドライブラリおよびスクリーニング方法は、例えば、1998年3月3日に発行された米国特許第5,723,286号、および1998年3月31日に発行された同第5,733,731号で開示される。

【0168】

あるいは、205P1B5を発現する細胞株は、205P1B5によって媒介されるタンパク質-タンパク質相互作用を同定するために使用される。このような相互作用は、免疫沈降技術（例えば、Hamilton B. J. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1999, 261:646-51を参照のこと）を使用して試験され得る。205P1B5タンパク質は、抗205P1B5抗体を使用する205P1B5発現細胞株から免疫沈降され得る。あるいは、His-tagに対する抗体は、205P1B5およびHis-tag（上記のベクター）の融合物を発現するように操作された細胞株中で使用され得る。この免疫沈降複合体は、ウェスタンブロット、タンパク質の³⁵S-メチオニン標識、タンパク質のマイクロシーケンシング、銀染色および2次ゲル電気泳動のような手順に沿ってタンパク質に関して試験され得る。

10

【0169】

205P1B5と相互作用する低分子およびリガンドは、このようなスクリーニングアッセイの関連する実施形態を介して同定され得る。例えば、低分子（リン酸化および脱リン酸化を媒介し得る205P1B5の能力に干渉する分子を含む）により、タンパク質機能との干渉が、細胞サイクル、第2メッセンジャーシグナル伝達、または腫瘍形成の調節の指標としてのDNA分子またはRNA分子との相互作用として同定され得る。同様に、205P1B5関連イオンチャネル、タンパク質ポンプ、または細胞連絡機能を調節する低分子を、205P1B5を発現する癌を有するタンパク質を処理するために、同定および使用する（例えば、Hille, B., Ionic Channels of Excitable Membranes 第2版, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992）。さらに、205P1B5機能を調節するリガンドは、205P1B5に結合し、そしてレポーター構築物を活性化するためのそれらの能力に基づいて同定され得る。代表的な方法は、例えば、1999年7月27日に発行された米国特許第5,928,868号において議論されており、そして少なくとも1つのリガンドが低分子である、ハイブリッドリガンドを形成するための方法を含む。例示の実施形態において、205P1B5の融合タンパク質およびDNA結合タンパク質を発現するために操作された細胞を使用して、ハイブリッドリガンド/低分子の融合タンパク質およびcDNAライブラリー転写活性化タンパク質を共発現する。この細胞は、レポーター遺伝子（この発現は、第1融合タンパク質および第2融合タンパク質の互いに隣接して調整される）をさらに含み、この事象は、ハイブリッドリガンドが、両方のハイブリッドタンパク質の標的部位に結合する場合のみ生じる。レポーター遺伝子を発現するこれらの細胞を選択し、そして未知の低細胞または未知のリガンドを同定する。この方法は、205P1B5を活性化または阻害する、調節因子を同定する手段を提供する。

20

30

【0170】

本発明の実施形態は、図2または図3に示される205P1B5アミノ酸配列と相互作用する分子についてスクリーニングする方法を含み、この方法は、一群の分子と205P1B5アミノ酸配列とを接触させる工程、上記一群の分子と上記205P1B5アミノ酸配列とを、相互作用を容易にする条件下で相互作用させる工程、205P1B5アミノ酸配列と相互作用する分子の存在を決定する工程、次いで、205P1B5アミノ酸配列と相互作用しない分子を、205P1B5アミノ酸配列と相互作用する分子から分離する工程を包含する。特定の実施形態において、この方法は、205P1B5アミノ酸配列と相互作用する分子を精製する工程、特徴付けする工程および同定する工程をさらに包含する。この同定された分子は、205P1B5によって実施される機能を調節するために使用され得る。好ましい実施形態において、205P1B5アミノ酸配列は、ペプチドライブラリと接触される。

40

【0171】

50

(X. 治療法および組成物)

限定されたセットの組織において正常に発現されるが、前立腺癌および他の癌においても発現されるタンパク質のような 205P1B5 の同定により、多数の治療アプローチをこのような癌の処置に広げる。本明細書において企図されるように、205P1B5 は、腫瘍促進遺伝子を活性化すること、または腫瘍形成をブロックする遺伝子を抑制することに関連する転写因子として機能する。

【0172】

従って、205P1B5 タンパク質の活性を阻害する治療アプローチは、205P1B5 を発現する癌に罹患した患者に有用である。このような治療アプローチは、一般に、2つのクラスに入る。一つのクラスは、205P1B5 タンパク質とその結合パートナーまたは他のタンパク質との結合または会合を阻害するための種々の方法を含む。別のクラスは、205P1B5 遺伝子の転写または 205P1B5 mRNA の翻訳を阻害するための種々の方法を含む。

10

【0173】

(X. A. 抗癌ワクチン)

本発明は、205P1B5 関連タンパク質または 205P1B5 関連核酸を含む、癌ワクチンを提供する。205P1B5 の発現に関して、癌ワクチンは、非標的組織に対して最小の効果を有するかまたは効果を有せずに、205P1B5 発現癌を予防および／または処置する。抗癌治療として、体液性免疫応答および／または細胞媒介免疫応答を生じるワクチンにおける腫瘍抗原の使用は、周知であり、ヒト PSM A およびげっ歯 P A P 免疫原を使用して前立腺癌において利用されている (H o d g e ら, 1995, I n t . J . C a n c e r 63:231-237; F o n g ら, 1997, J . I m m u n o l . 159:3113-3117)。

20

【0174】

このような方法は、205P1B5 関連タンパク質、または 205P1B5 コード核酸分子および 205P1B5 免疫原（これは、代表的に、多数の抗体または T 細胞エピトープを含む）を発現および提示し得る組換えベクターを利用することによって容易に実施され得る。当業者は、免疫反応性エピトープの送達のための広範な種々のワクチン系が当該分野で周知であることを理解する（例えば、H e r y l n ら, A n n M e d 1999 Feb 31(1):66-78; M a r u y a m a ら, C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 2000 Jun 49(3):123-32）。簡潔には、哺乳動物において、免疫応答（例えば、体液性免疫応答および／または細胞媒介免疫応答）を生じるこのような方法は、以下の工程を包含する：免疫反応性エピトープ（例えば、エピトープは、配列番号 703 に示される 205P1B5 タンパク質、またはそのアナログもしくはホモログ中に存在する）に哺乳動物の免疫系を曝露し、その結果、この哺乳動物に、エピトープに対して特異的な免疫応答を生じさせる（例えば、このエピトープを特異的に認識する抗体を生じさせる）工程。好ましい方法において、205P1B5 免疫原は、生物学的モチーフを含む（例えば、表 V ~ X V I I I、または図 5、図 6、図 7、図 8、および図 9 に示される 205P1B5 由来の一定サイズ範囲のペプチドを参照のこと）。

30

40

【0175】

205P1B5 タンパク質全体、免疫原性領域またはそれらのエピトープを、種々の手段によって合わせ、そして送達し得る。このようなワクチン組成物としては、例えば、以下が挙げられる：リポペプチド（例えば、V i t t i e l l o, A. ら, J . C l i n . I n v e s t . 95:341, 1995）、ポリ（DL-ラクチド-コ-グリコリド）（「P L G」）ミクロスフェア中にカプセル化されたペプチド組成物（例えば、E l d r i d g e ら, M o l e c . I m m u n o l . 28:287-294, 1991; A l o n s o ら, V a c c i n e 12:299-306, 1994; J o n e s ら, V a c c i n e 13:675-681, 1995 を参照のこと）、免疫刺激複合体（I S C O M S）に含まれたペプチド組成物（例えば、T a k a h a s h i ら, N a t u r e 344:873

50

-875, 1990; Huら, Clin Exp Immunol. 113:235-243, 1998を参照のこと)、多抗原ペプチド系(MAP)(例えば、Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:5409-5413, 1988; Tam, J. P., J. Immunol. Methods 196:17-32, 1996を参照のこと)、多価ペプチドとして処方されたペプチド、弾道送達系において使用するためのペプチド(代表的に、結晶化したペプチド)、ウイルス送達ベクター(Perkus, M. E. ら, Concepts in vaccine development, Kaufmann, S. H. E. 編, 第379頁, 1996; Chakrabarti, S. ら, Nature 320:535, 1986; Hu, S. L. ら, Nature 320:537, 1986; Kiney, M. -P. ら, AIDS Bio 10 / Technology 4:790, 1986; Top, F. H. ら, J. Infect. Dis. 124:148, 1971; Chanda, P. K. ら, Virology 175:535, 1990)、ウイルス起源または合成起源の粒子(例えば、Kofler, N. ら, J. Immunol. Methods. 192:25, 1996; Eldridge, J. H. ら, Sem. Hematol. 30:16, 1993; Fallo, L. D., Jr. ら, Nature Med. 7:649, 1995)、アジュバント(Warren, H. S., Vogel, F. R. および Chedid, L. A. Annu. Rev. Immunol. 4:369, 1986; Gupta, R. K. ら, Vaccine 11:293, 1993)、リポソーム(Reddy, R. ら, J. Immunol. 148:1585, 1992; Rock, K. L., Immunol. Today 20 17:131, 1996)または裸のcDNAもしくは粒子吸収cDNA(Ulmer, J. B. ら, Science 259:1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L. A. および Webster, R. G., Vaccine 11:957, 1993; Shiver, J. W. ら, Concepts in vaccine development, Kaufmann, S. H. E. 編, 第423頁, 1996; Cease, K. B. および Berzofsky, J. A., Annu. Rev. Immunol. 12:923, 1994および Eldridge, J. H. ら, Sem. Hematol. 30:16, 1993)。毒素標的送達技術(レセプター媒介標的化(例えば、Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts)のレセプター媒介標的化)としても公知)もまた、使用され得る。 30

【0176】

205P1B5に関連する癌を有する患者において、本発明のワクチン組成物はまた、癌のために使用される他の処置(例えば、外科手術、化学療法、薬物治療、放射線治療など)と合わせて使用され得る(IL-2、IL-12、GM-CSFなどのような免疫アジュバントと組み合わせた使用を含む)。

【0177】

(細胞ワクチン)

CTLエピトープは、対応するHLA対立遺伝子に結合する205P1B5タンパク質内のペプチドを同定するための特定のアルゴリズムを使用して決定され得る:(例えば表IV; EpimerTM および EpimatrixTM, Brown University (URL world wide web URL brown.edu/Research/TB-HIV__Lab/epimatrix/epimatrix.html); および BIMAS (URL bimas.dcr.t.nih.gov/; SYFPEITHI at URL syfpeithi.bim-heidelberg.com/))。好ましい実施形態において、205P1B5免疫原は、当該分野で周知の技術を使用して同定された1種以上のアミノ酸配列を含み、これらは、表V~XVIIに示される配列、またはHLAクラスIモチーフ/スーパーモチーフ(例えば、表IV(A)、表IV(D)、または表IV(E)によって特定された8個、9個、10個もしくは11個のアミノ酸のペプチド、および/またはHLAクラスIIモチーフ/スーパーモチーフ(50

例えば、表 I V (B)、または表 I V (C) を含む、少なくとも 9 個のアミノ酸のペプチドである。当該分野で理解されているように、H L A クラス I 結合溝は、本質的に、閉鎖的に終結され、その結果、特定のサイズ領域のみのペプチドが、溝に適合し、かつ、結合され得、一般に、H L A クラス I エピトープは、8 個、9 個、10 個、または 11 個のアミノ酸長である。対照的に、H L A クラス I I 結合溝は、本質的に、開放的に終結され、それによって、約 9 個以上のアミノ酸のペプチドは、H L A クラス I I 分子によって結合され得る。H L A クラス I と H L A クラス I I との間の結合溝の差異に起因して、H L A クラス I モチーフは、長さ特異的である。すなわち、クラス I の 2 つの位置は、このペプチドのアミノ方向からカルボキシル方向の第 2 アミノ酸である。クラス I I モチーフのアミノ酸位置は、互いに対してのみ相関し、全体のペプチドに対して相関していない。すなわち、さらなるアミノ酸は、モチーフ保有配列のアミノ末端および／またはカルボキシル末端に付着され得る。H L A クラス I I エピトープは、しばしば、9 アミノ酸長、10 アミノ酸長、11 アミノ酸長、12 アミノ酸長、13 アミノ酸長、14 アミノ酸長、15 アミノ酸長、16 アミノ酸長、17 アミノ酸長、18 アミノ酸長、19 アミノ酸長、20 アミノ酸長、21 アミノ酸長、22 アミノ酸長、23 アミノ酸長、24 アミノ酸長、または 25 アミノ酸長、または 25 アミノ酸長よりも長い。

10

【0178】

(抗体ベースのワクチン)

哺乳動物において免疫応答を発生するための広範な種々の方法は、(例えば、ハイブリドーマの発生における第 1 工程として) 当該分野で公知である。哺乳動物における免疫応答を発生させる方法は、タンパク質(例えば、205 P 1 B 5 タンパク質)上の免疫原性エピトープに哺乳動物の免疫系を曝露し、その結果、免疫応答を発生させる工程を包含する。代表的な実施形態は、十分な量の少なくとも 1 つの 205 P 1 B 5 細胞もしくは細胞傷害性 T 細胞エピトープまたはそれらのアナログを宿主と接触させ；そして少なくとも 1 回の周期的な間隔の後、205 P 1 B 5 B 細胞もしくは細胞傷害性 T 細胞エピトープまたはそれらのアナログを宿主と再び接触させることによって、宿主において、205 P 1 B 5 に対する免疫応答を発生させるための方法からなる。特定の実施形態は、205 P 1 B 5 関連タンパク質または人工多エピトープペプチドに対して免疫応答を発生する方法からなり、この方法は、205 P 1 B 5 免疫原(例えば、205 P 1 B 5 タンパク質またはそのペプチドフラグメント、205 P 1 B 5 融合タンパク質またはアナログなど)を、ヒトまたは別の哺乳動物に対してワクチン調製物として投与する工程を包含する。代表的に、このようなワクチン調製物は、さらに、適切なアジュバント(例えば、米国特許第 6, 146, 635 号を参照のこと)または P A D R E^{T M} ペプチドのような汎用ヘルパーエピトープ(Epimmune Inc., San Diego, CA; 例えば、Alexander ら, J. Immunol. 2000 164 (3): 164 (3): 1625-1633; Alexander ら, Immunity 1994 1 (9): 751-761 および Alexander ら, Immunol. Res. 1998 18 (2): 79-92 を参照のこと)を含む。代替方法は、205 P 1 B 5 免疫原をコードする DNA 配列、DNA 配列の発現を制御する調節配列に作動可能に連結された DNA 配列を含む DNA 分子を、個々の身体の筋肉または皮膚にインビボで投与することによって、205 P 1 B 5 免疫原に対して個々の免疫応答を発生させる工程を包含し；ここで、この DNA 分子は、細胞によって取り込まれ、DNA 配列は、この細胞において発現され、そして免疫応答を、免疫原に対して発生する(例えば、米国特許第 5, 962, 428 号を参照のこと)。必要に応じて、遺伝子ワクチン促進因子(facilitator)(例えば、アニオン性脂質；サポニン；レクチン；エストロゲン化合物；ヒドロキシル化低級アルキル；ジメチルスルホキシド；および尿素)がまた、投与される。

20

30

40

【0179】

(核酸ワクチン)

本発明のワクチン組成物は、核酸媒介様式を含む。本発明のタンパク質をコードする DNA または RNA は、患者に投与され得る。遺伝子免疫方法は、205 P 1 B 5 を発現する

50

癌細胞に対する、予防的または治療的な体液性免疫応答および細胞性免疫応答を発生させるために利用され得る。205P1B5関連タンパク質／免疫原をコードするDNAを含む構成物および適切な調節配列は、個体の筋肉または皮膚に直接注射され得、その結果、筋肉または皮膚の細胞は、この構成物を取り込み、そしてコードされた205P1B5タンパク質／免疫原を発現する。あるいは、ワクチンは、205P1B5関連タンパク質を含む。205P1B5関連タンパク質免疫原の発現は、205P1B5タンパク質を保有する細胞に対する、予防的または治療的な体液性免疫および細胞性免疫の発生を生じる。当該分野で公知の、種々の予防的および治療的な遺伝子免疫技術は、使用され得る（総説については、インターネットアドレスワールドワイドウェブURL genweb.comで公開されている情報および参考文献を参照のこと）。核酸ベース送達は、例えば、Wolffら、*Science* 247:1465 (1990) および米国特許第5,580,859号；同第5,589,466号；同第5,804,566号；同第5,739,118号；同第5,736,524号；同第5,679,647号；WO 98/04720に記載されている。DNAベースの送達技術の例としては、「裸のDNA」、促進された（ブピバカイン（bupivacaine）、ポリマー、ペプチド媒介）送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介送達（「遺伝子銃」）または圧力媒介送達（例えば、米国特許第5,922,687号を参照のこと）を含む。

【0180】

治療的または予防的な免疫の目的のために、本発明のタンパク質は、ウイルスベクターまたは細菌ベクターを介して発現され得る。本発明の実施において使用され得る種々のウイルス遺伝子送達系としては、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、およびシンドビスウイルス（例えば、Restifo、1996、*Curr. Opin. Immunol.* 8:658-663；Tsangら、*J. Natl. Cancer Inst.* 87:982-990 (1995)を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。非ウイルス送達系もまた、抗腫瘍応答を誘導するために患者に、205P1B5関連タンパク質をコードする裸のDNAを（例えば筋内または皮内で）患者に導入することにより利用され得る。

【0181】

ワクチンウイルスは、例えば、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するためのベクターとして使用される。宿主への導入の際に、組換えワクチンウイルスは、タンパク質免疫原性ペプチドを発現し、そしてこれによって、宿主免疫応答を惹起する。免疫プロトコルにおいて有用なワクチンベクターおよび方法は、例えば、米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターは、BCG (*Bacille Calmette Guérin*)である。BCGベクターは、Stoverら、*Nature* 351:456-460 (1991)に記載されている。本発明のペプチドの治療的投与または免疫のための有用な、広範な種々の他のベクター（例えば、アデノウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、*Salmonella typhi*ベクター、無毒化炭疽毒素ベクターなど）は、本明細書の記載から当業者に明らかである。

【0182】

従って、遺伝子送達系は、205P1B5関連核酸分子を送達するために使用される。一つの実施形態において、全長ヒト205P1B5 cDNAを使用する。別の実施形態において、特異的な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）および／または抗体エピトープをコードする205P1B5核酸分子を使用する。

【0183】

（エキソビボワクチン）

種々のエキソビボストラテジーを利用して、免疫応答もまた発生させ得る。一つのアプローチは、患者の免疫系に対して205P1B5抗原を提示する樹状細胞（DC）のような抗原提示細胞（APC）の使用に関する。樹状細胞は、MHCクラスI分子およびMHC

クラスII分子、B7補助刺激因子、ならびにIL-12を発現し、従って、高度に特異的な抗原提示細胞である。前立腺癌において、前立腺特異的膜抗原(P SMA)のペプチドによりパルスされる自己樹状細胞が、前立腺癌患者の免疫系を刺激するために、フェーズI臨床試験において使用される(Tjoaら, 1996, Prostate 28:65-69; Murphyら, 1996, Prostate 29:371-380)。従って、樹状細胞は、MHCクラスI分子またはMHCクラスII分子の内容物中で、205P1B5ペプチドをT細胞に提示するために使用され得る。一つの実施形態において、自己樹状細胞は、MHCクラスI分子および／またはMHCクラスII分子に結合し得る205P1B5ペプチドでパルスされる。別の実施形態において、樹状細胞は、完全205P1B5タンパク質でパルスされる。なお別の実施形態は、当該分野で公知の種々の実行ベクターを使用する樹状細胞中で、205P1B5遺伝子の過剰発現を操作することに関する(例えば、アデノウイルス(Arthurら, 1997, Cancer Gene Ther. 4:17-25)、レトロウイルス(Hendersonら, 1996, Cancer Res. 56:3763-3770)、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、DNAトランスフェクション(Ribasら, 1997, Cancer Res. 57:2865-2869)、または腫瘍誘導RNAトランスフェクション(Ashleyら, 1997, J. Exp. Med. 186:1177-1182))。205P1B5を発現する細胞はまた、免疫調節因子(例えば、GM-CSF)を発現するように操作され得、そして免疫剤として使用され得る。

10

20

30

40

50

【0184】

(X. B. 抗体ベースの治療のための標的としての205P1B5)

205P1B5は、抗体ベースの治療ストラテジーのための魅力的な標的である。多数の抗体ストラテジーは、細胞外分子と細胞内分子との両方を標的するために、当該分野で公知である(例えば、相補体およびADCC媒介の死滅および身体内での使用を参照のこと)。205P1B5は、対応する正常な細胞に対する種々の系統の癌細胞によって発現されるので、免疫活性組成物を非標的器官および組織に結合することによって生じる、毒性効果、非特異的効果および／または非標的効果なしで、優れた感受性を示す、205P1B5免疫活性組成物の全身投与を調製する。205P1B5のドメインと特異的に反応する抗体は、トキシンまたは治療剤と組み合わせるか、または細胞増殖または機能を阻害し得る裸の抗体としてのいずれかで、全身的に205P1B5を発生する癌を処置するために有用である。

【0185】

205P1B5抗体は、抗体が205P1B5に結合し、そして機能(例えば、結合パートナーとの相互作用)を調節し、そして結果として腫瘍細胞の破壊を媒介し、そして／または腫瘍細胞の増殖を阻害するように、患者に導入され得る。このような抗体が治療効果を発揮する機構としては、補体媒介性細胞溶解、抗体依存性細胞性細胞傷害、205P1B5の生理学的機能を調節すること、リガンド結合またはシグナル伝達経路を阻害すること、腫瘍細胞分化を調節すること、腫瘍脈管形成因子プロファイルを変化させること、および／またはアポトーシスを包含し得る。

【0186】

当業者は、抗体が、免疫原性分子(例えば、図2または図3に示される205P1B5配列の免疫原性領域)を特異的に標的および結合するために使用され得ることを理解する。さらに、当業者は、抗体を細胞傷害性薬剤に結合体化することは慣用的であることを理解する(例えば、Sleversら, Blood 93:113678-3684(1999年6月1日)を参照のこと)。細胞傷害性薬剤および／または治療剤が、例えば、この細胞(例えば、205P1B5)によって発現される分子に対して特異的な抗体にそれらの薬剤を結合体化させることによって、細胞に直接送達される場合、この細胞傷害性薬剤は、それらの細胞上において公知の生物学的効果(例えば、細胞傷害性)を発揮する。

【0187】

抗体-細胞傷害性薬剤結合体を使用して細胞を死滅させるための広範な種々の組成物およ

び方法が、当該分野で公知である。癌の状況において、代表的な方法は、腫瘍を有する哺乳動物に、生物学的に有効な量の結合体を投与する工程を包含し、この結合体は、発現されたか、結合に接触可能か、または細胞表面上に局在化された、マーカー（例えば、205P1B5）に結合する標的試薬（例えば、抗205P1B5抗体）に連結される、選択された細胞傷害性薬剤および／または治療剤を含む。代表的な実施形態は、細胞傷害性薬剤および／または治療剤を、205P1B5を発現する細胞に送達する方法であり、この方法は、205P1B5エピトープに免疫特異的に結合する抗体に細胞傷害性薬剤を結合体化させる工程、および抗体薬剤結合体に細胞を曝露する工程を包含する。別の例示的な実施形態は、転移癌を患ったと疑われる個体を処置する方法であり、この方法は、細胞傷害性薬剤および／または治療剤に結合体化された、治療有効量の抗体を含む薬学的組成物を個体に非経口的に投与する工程を包含する。

10

【0188】

抗205P1B5抗体を使用する癌免疫治療は、他の型の癌の処置に首尾良く使用される種々のアプローチに従ってなされ、この癌としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：結腸癌（Arlénら、1998、Crit. Rev. Immunol. 18：133～138）、多発性骨髄腫（Ozakiら、1997、Blood 90：3179～3186；Tsunenariら、1997、Blood 90：2437～2444）、胃癌（Kasprzykら、1992、Cancer Res. 52：2771～2776）、B細胞リンパ腫（Funakoshiら、1996、J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19：903～101）、白血病（Zhongら、1996、Leuk. Res. 20：581～589）、結腸直腸癌（Mounら、1994、Cancer Res. 54：6160～6166；Veldersら、1995、Cancer Res. 55：4398～4403）、および乳癌（Shepardら、1991、J. Clin. Immunol. 11：117～127）。いくつかの治療アプローチは、毒素への裸の抗体の結合（例えば、抗CD20抗体へのY⁹1またはI¹³1の結合（例えば、ZevalinTM、IDEC Pharmaceuticals Corp.、またはBexxarTM、Coulter Pharmaceuticals）を含むが、一方他のアプローチは、抗体と他の治療薬剤との（例えば、HerceptinTM（トラスツズマブ（trastuzumab）とパクリタキセル（Genentech, Inc.）との）共投与を含む。前立腺癌の処置のために、例えば、205P1B5抗体が、照射、化学療法またはホルモン切除と組み合わせて、投与され得る。

20

30

【0189】

205P1B5抗体治療は、癌の全てのステージに対して有用であるが、進行癌または転移癌において特に適切であり得る。本発明の抗体治療を用いた処置は、1つ以上の一連の化学療法を受けている患者に示される。あるいは、本発明の抗体療法は、化学療法処置を受けていない患者のために、化学療法レジメンまたは照射レジメンと組み合わせられる。さらに、抗体療法は、減少した投薬量の共化学療法の使用を、特に、その化学療法薬剤の毒性をあまり許容しない患者にとって、可能にし得る。

【0190】

癌患者は、好ましくは、腫瘍組織の免疫組織化学的評価、定量的205P1B5画像化、または205P1B5発現の存在および程度を確かに示し得る他の技術を使用して、205P1B5発現の存在およびレベルについて評価し得る。腫瘍生検または外科的標本の免疫組織化学分析が、この目的に好ましい。腫瘍組織の免疫組織化学的分析のための方法は、当該分野で周知である。

40

【0191】

前立腺癌および他の癌を処置する抗205P1B5モノクローナル抗体としては、その腫瘍に対する強力な免疫応答を示し得る抗体、または直接細胞傷害性であり得る抗体が挙げられる。これに関して、抗205P1B5モノクローナル抗体（mAb）は、補体媒介性細胞傷害または抗体依存性細胞傷害（ADCC）のいずれかの機構によって、腫瘍細胞溶

50

解を惹起し得、これらの機構の両方が、補体タンパク質上のエフェクター細胞Fcレセプター部位との相互作用のために、その免疫グロブリン分子のインタクトなFc部分を必要とする。さらに、腫瘍増殖に対して直接の生物学的効果を発揮する抗205P1B5 mAbが、205P1B5を発現する癌を処置するのに有用である。直接的に細胞傷害性mAbが作用する機構としては、細胞増殖の阻害、細胞分化の調節、腫瘍脈管形成因子プロフィールの調節、およびアポトーシスの誘導が、挙げられる。特定の抗205P1B5 mAbが抗腫瘍効果を発揮する機構は、当該分野で一般的に知られているように、ADCC、ADMMC、補体媒介性細胞溶解などの細胞死を評価する、任意の数のインビトロアッセイを使用して、評価される。

【0192】

10

何人かの患者において、マウスまたは他の非ヒトのモノクローナル抗体の使用、あるいはヒト/マウスキメラmAbの使用が、非ヒト抗体に対する中程度から強力な免疫応答を誘導し得る。これは、循環からの抗体のクリアランスおよび減少した効力をもたらす。最も深刻な場合において、このような免疫応答は、潜在的に腎不全を引き起こし得る、免疫複合体の広範な形成をもたらす。従って、本発明の治療法の方法において使用される好ましいモノクローナル抗体は、高い親和性で標的205P1B5抗原に特異的に結合するが、患者において低い抗原性を示すかまたは全く抗原性を示さない、完全にヒトであるかまたはヒト化されているかのいずれかである抗体である。

【0193】

本発明の治療法は、単一の抗205P1B5 mAbの投与、ならびに異なるmAbの組み合わせまたはカクテルの投与を意図する。このようなmAbカクテルは、それらが、異なるエピトープを標的とするmAb含むか、異なるエフェクター機構を使用するか、または免疫エフェクター機能性に依存するmAbと直接細胞傷害性mAbを組み合わせるので、特定の利点を有し得る。組み合わせたこのようなmAbは、相乗的治療効果を示し得る。さらに、抗205P1B5 mAbは、種々の化学療法薬剤、アンドロゲン遮断薬、免疫調節因子（例えば、IL-2、GM-CSF）、手術または放射線を含むがこれらに限定されない、他の治療薬剤と同時に投与され得る。抗205P1B5 mAbは、その「裸」の形態または非結合形態で投与され得るか、またはそれらに結合した治療薬剤を有し得る。

20

【0194】

30

抗205P1B5抗体処方物は、腫瘍細胞に抗体を送達し得る任意の経路を介して投与される。投与の経路としては、静脈内経路、腹腔内経路、筋肉内経路、腫瘍内経路、皮内経路などが挙げられるが、これらに限定されない。処置は一般的に、代表的に、約0.1～約10mg/体重の範囲の用量で、受容可能な投与経路（例えば、静脈内注射（IV））を介する、抗205P1B5抗体調製物の繰り返し投与を含む。一般に、1週間に10～500mg mAbの範囲の用量が、効果的であり得かつ十分に許容され得る。

【0195】

転移性乳癌の処置においてHerceptin mAbを用いる臨床実験に基づいて、抗205P1B5 mAb調製物の約4mg/kg患者体重（IV）の初回負荷用量に引き続いて、約2mg/kg（IV）の毎週の用量が、受容可能な投薬レジメンを示す。好ましくは、この初回負荷用量が、90分以上の注入として投与される。その初回用量が十分に許容された場合、周期的維持用量が、30分以上の注入として投与される。当業者が理解するように、種々の因子が、特定の場における理想的な用量レジメンに影響し得る。このような因子としては、例えば、使用されるAbまたはmAbの結合親和性および半減期、患者における205P1B5発現の程度、循環する放出された（shed）205P1B5抗原の程度、所望される安定状態の抗体濃度レベル、処置の頻度、および本発明の処置方法と組み合わせて使用される化学療法薬剤または他の因子の影響ならびに特定の患者の健康状態が、挙げられる。

40

【0196】

必要に応じて、患者は、最も有効な投与レジメンなどの決定を補助するために、所定のサ

50

ンプル中の205P1B5のレベル（例えば、循環する205P1B5抗原および／または205P1B5発現細胞のレベル）について評価されるべきである。このような評価はまた、治療全体を通じてのモニタリングの目的で使用され、そして他のパラメーター（例えば、膀胱癌治療における尿細胞学および／またはImmunocytleベル、あるいは、類推されるところによれば、前立腺癌治療における血清PSAレベル）を評価することと組合せて治療的成功を評価するために有用である。

【0197】

抗イディオタイプ抗205P1B5抗体はまた、抗癌療法において、205P1B5関連タンパク質を発現する細胞に対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして使用され得る。詳細には、抗イディオタイプ抗体の生成は、当該分野で周知であり；この方法論は、205P1B5関連タンパク質上のエピトープを模倣する抗イディオタイプ抗205P1B5抗体を生成するように容易に適合され得る（例えば、Wagnerら、1997、Hybridoma 16:33~40；Foonら、1995、J. Clin. Invest. 96:334~342；Herlynら、1996、Cancer Immunol. Immunother. 43:65~76を参照のこと）。このような抗イディオタイプ抗体は、癌ワクチンストラテジーにおいて使用され得る。

10

【0198】

(X. C.) 細胞免疫応答についての標的としての205P1B5)

本明細書に記載される、免疫原的に有効量の1つ以上のHLA結合ペプチドを含むワクチンおよびこのワクチンを調製する方法は、本発明のさらなる実施形態である。さらに、本発明に従うワクチンは、1つ以上の特許請求されるペプチドの組成物を含む。ペプチドは、ワクチンにおいて個々に存在し得る。あるいは、ペプチドは、同じペプチドの複数コピーを含むホモポリマーとして、または種々のペプチドのヘテロポリマーとして存在し得る。ポリマーは、増加した免疫学的反応の利点を有し、そして異なるペプチドエピトープがポリマーを構成するために使用される場合、免疫応答を標的化する病原性生物または腫瘍関連ペプチドの異なる抗原決定基と反応する抗体および／またはCTLを誘導するというさらなる能力を有する。この組成物は、抗原の天然に存在する領域であり得るか、または例えば、組換えもしくは化学合成によって調製され得る。

20

【0199】

本発明のワクチンとともに使用され得るキャリアは、当業者に周知であり、そして例えば、サイログロブリン、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）、破傷風トキソイド、ポリアミノ酸（例えば、ポリL-リジン、ポリL-グルタミン酸）、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコアタンパク質などが挙げられる。ワクチンは、生理学的に許容可能（すなわち、受容可能）な希釈剤（例えば、水、または生理食塩水、好ましくは、リン酸緩化生理食塩水）を含み得る。ワクチンはまた、代表的に、アジュバントを含む。不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、またはミョウバンのようなアジュバントは、当該分野で周知の材料の例である。さらに、本明細書中で開示されるように、CTL応答は、本発明のペプチドを脂質（例えば、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン（P₃ CSS））に結合体化することによって、初回刺激され得る。さらに、アジュバント（例えば、合成シトシン-ホスホロチオール化グアニン含有（CpG）オリゴヌクレオチド）は、CTL応答を10~100倍増加することが見出された（例えば、DavillaおよびCelis、J. Immunol. 165:539~547（2000）を参照のこと）。

30

40

【0200】

注射、エアロゾル、経口、経皮、経粘膜、胸内、髄腔内、または他の適切な経路による、本発明に従うペプチド組成物での免疫に際して、宿主の免疫系は、所望の抗原に特異的な、大量のCTLおよび／またはHTLを産生することによってワクチンに応答する。結果として、宿主は、205P1B5抗原を発現するかまたは過剰発現する細胞の後期発生に少なくとも部分的に免疫されるか、あるいは抗原が腫瘍関連であった場合、少なくともいくつかの治療的利益を導く。

50

【0201】

いくつかの実施形態において、クラス I ペプチド成分を、標的抗原に対する中和抗体および／またはヘルパー T 細胞応答を誘導するかまたは促進する成分と組み合わせることが望ましくあり得る。このような組成物の好ましい実施形態は、本発明に従うクラス I エピトープおよびクラス II エピトープを含む。このような組成物の代替の実施形態は、交叉反応性 H T L エピトープ（例えば、P A D R E^{T M}（E p i m m u n e、S a n D i e g o、C A）分子（例えば、米国特許第 5, 7 3 6, 1 4 2 号に記載される））とともに、本発明に従うクラス I エピトープおよび／またはクラス II エピトープを含む。

【0202】

本発明のワクチンはまた、抗原提示細胞（A P C）（例えば、樹状細胞（D C））を、本発明のペプチドを提示するためのビヒクルとして含み得る。樹状細胞を動員（m o b i l i z a t i o n）し、そして収集し、これによって、樹状細胞の負荷をインビトロで生じさせた後に、ワクチン組成物が、インビトロで作製され得る。例えば、樹状細胞は、例えば、本発明に従うミニ遺伝子でトランスフェクトされるか、またはペプチドでパルスされる。次いで、樹状細胞は、インビボで免疫応答を惹起するために患者に投与され得る。ワクチン組成物（D N A ベースまたはペプチドベースのいずれか）はまた、樹状細胞動員とともにインビボで投与され得、これによって、樹状細胞の負荷がインビボで生じる。

10

【0203】

好ましくは、以下の原理が、ワクチンにおける使用のためにポリエピトープ組成物中での封入のために、あるいはワクチンに含まれるべき、そして／または核酸（例えば、ミニ遺伝子）によってコードされるべき別々のエピトープを選択するためにエピトープのアレイを選択する場合に利用される。以下の原理のそれぞれが選択を行うためにバランスをとられることが好ましい。所定のワクチン組成物に組み込まれるマルチエピトープは、エピトープが由来するネイティブ抗原において連続した配列であり得る（しかし、必要ではない）。

20

【0204】

1.) 投与のとき、腫瘍クリアランスと相関して観測された免疫応答を模倣するエピトープが選択される。H L A クラス I について、これは、少なくとも 1 つの腫瘍関連抗原（T A A）に由来する 3 ～ 4 エピトープを含む。H L A クラス II について、類似の原理が使用される；再び、3 ～ 4 エピトープは、少なくとも 1 つの T A A から選択される（例えば、R o s e n b e r g ら、S c i e n c e 2 7 8 : 1 4 4 7 ～ 1 4 5 0 を参照のこと）。1 つの T A A からのエピトープは、1 つ以上のさらなる T A A からのエピトープと組み合わせて使用し、頻繁に発現される T A A の種々の発現パターンを有する腫瘍を標的化するワクチンを産生し得る。

30

【0205】

2.) 免疫原性と関連することが確証された必須の結合親和性を有するエピトープが選択される：H L A クラス I について、5 0 0 n M 以下（しばしば、2 0 0 n M 以下）の I C₅₀；およびクラス II について、1 0 0 0 n M 以下の I C₅₀。

【0206】

3.) 十分なスーパーモチーフ保有ペプチド、または対立遺伝子特異的モチーフ保有ペプチドの十分なアレイが、広い集団範囲を与えるように選択される。例えば、少なくとも 8 0 % の集団範囲を有することが好ましい。モンテカルロ分析（当該分野で公知の統計的評価）を使用して、集団範囲の幅または重複性を評価し得る。

40

【0207】

4.) 癌関連抗原由来のエピトープが選択される場合、アナログを選択することがしばしば有用である。なぜなら、患者は、ネイティブのエピトープに対して耐性を発生し得るからである。

【0208】

5.) 「ネスト化エピトープ（n e s t e d e p i t o p e）」と呼ばれるエピトープが、特に関連する。ネスト化エピトープは、少なくとも 2 つのエピトープが所定のペプチ

50

ド配列で重なる場合に生じる。ネスト化ペプチド配列は、B細胞エピトープ、HLAクラスIエピトープおよび／またはHLAクラスIIエピトープを含み得る。ネスト化エピトープを提供する場合、一般的な目的は、配列当たり最も多くの数のエピトープを提供することである。従って、1つの局面は、ペプチド中のアミノ末端エピトープのアミノ末端およびカルボキシル末端エピトープのカルボキシル末端よりも長いペプチドを提供すること避けることである。マルチエピトープ配列（例えば、ネスト化エピトープを含む配列）を提供する場合、病理学的なまたは他の有害な生物学的特性を有さないことを保証するために、配列をスクリーニングすることが一般的に重要である。

【0209】

6.) ポリエピトープタンパク質を作製する場合、またはミニ遺伝子を作製する場合、目的は、目的のエピトープを含む最小のペプチドを作製することである。この原理は、ネスト化エピトープを含むペプチドを選択する場合に使用される原理と同じでない場合、類似する。しかし、人工ポリエピトープペプチドを用いる場合、サイズ最小化の目的は、ポリエピトープタンパク質中のエピトープ間に任意のスペーサー配列を組み込む必要性に対してバランスがとられる。例えば、スペーサーアミノ酸残基は、接合エピトープ（*junctional epitope*）（免疫系によって認識され、標的抗原に存在せず、かつエピトープの人工並置によってのみ作製されるエピトープ）を避けるためにか、またはエピトープ間の切断を容易にし、それによって、エピトープ提示を増強するために導入され得る。接合エピトープは、一般的に、避けられるべきである。なぜなら、レシピエントは、その非ネイティブなエピトープに対する免疫応答を生成し得るからである。「優性エピトープ」である接合エピトープが特に関心が高い。優性エピトープは、他のエピトープに対する免疫応答が減少されるかまたは抑制されるような強い（*zealous*）応答を導き得る。

【0210】

7.) 同じ標的タンパク質の複数の改変体の配列が存在する場合、潜在的なペプチドエピトープはまた、それらの保存性に基づいて選択され得る。例えば、保存性についての基準は、HLAクラスI結合ペプチドの配列全体またはクラスII結合ペプチドの9マーのコア全体が、特定のタンパク質抗原について評価される配列の指定された割合で保存されることを規定し得る。

【0211】

(X. C. 1.) ミニ遺伝子ワクチン)

複数のエピトープの共送達を可能にする多くの異なるアプローチが利用可能である。本発明のペプチドをコードする核酸は、本発明の特に有用な実施形態である。ミニ遺伝子中への封入のためのエピトープは、好ましくは、先の節に記載されるガイドラインに従って選択される。本発明のペプチドをコードする核酸を投与する好ましい手段は、本発明の1つのエピトープまたはマルチエピトープを含むペプチドをコードするミニ遺伝子構築物を使用する。

【0212】

マルチエピトープミニ遺伝子の使用は、以下およびIshiookaら、J. Immunol. 162:3915~3925, 1999; An, L. およびWhitton, J. L., J. Virol. 71:2292, 1997; Thomson, S. A. ら、J. Immunol. 157:822, 1996; Whitton, J. L. ら、J. Virol. 67:348, 1993; Hanke, R. ら、Vaccine 16:426, 1998に記載される。例えば、205P1B5由来のスーパーモチーフ保有エピトープおよび／またはモチーフ保有エピトープをコードするマルチエピトープDNAプラスミド、PADRE（登録商標）ユニバーサルヘルパーT細胞エピトープ（または205P1B5由来の複数のHTLエピトープ）、および小胞体トランスロケーションシグナル配列が操作され得る。ワクチンはまた、他のTAA由来のエピトープを含み得る。

【0213】

マルチエピトープミニ遺伝子の免疫原性は、試験されるエピトープに対するCTL誘導応

答の大きさを評価するためにトランスジェニックマウスで確認され得る。さらに、インビボのDNAコードエピトープの免疫原性は、DNAプラスミドをトランスフェクトされた標的細胞に対する特定のCTL株のインビトロ応答と相関し得る。従って、これらの実験は、ミニ遺伝子が、1) CTL応答を生成すること、および2) 誘導されたCTLが、コードされたエピトープを発現する細胞を認識することの両方に役立つことを示し得る。

【0214】

例えば、ヒト細胞における発現のために選択されたエピトープ（ミニ遺伝子）をコードするDNA配列を作製するために、エピトープのアミノ酸配列は、逆翻訳され得る。ヒトコドン使用頻度表は、各アミノ酸に対するコドン選択の指針のために使用され得る。これらのエピトープコードDNA配列は、直接隣接し得、その結果、翻訳された場合に、連続したポリペプチド配列が作製される。発現および／または免疫原性を最適化するために、さらなるエレメントが、ミニ遺伝子設計に組み込まれ得る。ミニ遺伝子配列に逆翻訳され得、そして含まれ得るアミノ酸配列の例としては、以下が挙げられる：HLAクラスIエピトープ、HLAクラスIIエピトープ、抗体エピトープ、ユビキチン化シグナル配列、および／または小胞体標的化シグナル。さらに、CTLおよびHTLエピトープのHLA提示は、CTLまたはHTLエピトープに隣接する、合成（例えば、ポリアラニン）または天然に存在する隣接配列を含むことによって改善され得る；エピトープを含むこれらのより大きなペプチドは、本発明の範囲内である。

10

【0215】

ミニ遺伝子配列は、ミニ遺伝子のプラス鎖およびマイナス鎖をコードするオリゴヌクレオチドを組み立てることによってDNAに変換され得る。重複オリゴヌクレオチド（30～100塩基長）は、周知技術を使用して、適切な条件下で、合成され得、リン酸化され得、精製され得、そしてアニールされ得る。オリゴヌクレオチドの末端は、例えば、T4 DNAリガーゼを使用して結合され得る。次いで、この合成ミニ遺伝子（エピトープポリペプチドをコードする）は、所望の発現ベクターにクローン化され得る。

20

【0216】

当業者に周知の標準的な調節配列は、好ましくは、標的細胞における発現を確実にするためにベクターに含まれる。いくつかのベクターエレメントが、望ましい：ミニ遺伝子挿入のための下流クロニング部位を有するプロモーター；効率的な転写終結のためのポリアダニル化シグナル；E. coli複製起点；およびE. coli選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性またはカナマイシン耐性）。多くのプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）プロモーター）がこの目的のために使用され得る。他の適切なプロモーター配列について、例えば、米国特許第5,580,859号および同第5,589,466号を参照のこと。

30

【0217】

さらなるベクター改変は、ミニ遺伝子発現および免疫原性を最適化するために所望され得る。いくつかの場合において、イントロンは、効率的な遺伝子発現に必要とされ、そして1つ以上の合成イントロンまたは天然に存在するイントロンが、ミニ遺伝子の転写領域に組み込まれ得る。mRNA安定化配列および哺乳動物細胞における複製のための配列を含ませることもまた、ミニ遺伝子発現を増加するために考慮され得る。

40

【0218】

一旦、発現ベクターが選択されると、ミニ遺伝子は、プロモーターの下流のポリリンカー領域にクローン化される。このプラスミドは、適切なE. coli株に形質転換され、そしてDNAは、標準的な技術を使用して調製される。ミニ遺伝子の方向およびDNA配列、ならびにベクターに含まれる全ての他のエレメントは、制限マッピングおよびDNA配列分析を使用して確認される。正しいプラスミドを有する細菌細胞は、マスター細胞バンクおよび作業細胞バンクとして保存され得る。

【0219】

さらに、免疫刺激配列（ISSまたはCpG）は、DNAワクチンの免疫原性において役割を果たすようである。これらの配列は、免疫原性を増強することが望ましい場合に、ミ

50

ニ遺伝子コード配列の外側で、ベクターに含まれ得る。

【0220】

いくつかの実施形態において、ミニ遺伝子コードエピトープおよび第2タンパク質（免疫原性を増強または減少するために含まれる）の両方の産生を可能にするビシストロニック（bi-cistronic）発現ベクターが使用され得る。共発現される場合に免疫応答を有利に増強し得るタンパク質またはポリペプチドの例としては、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-12、GM-CSF）、サイトカイン誘導分子（例えば、LeIF）、共刺激分子、または、HTL応答について、pan-DR結合タンパク質（PADRETM、Eppimmune、San Diego、CA）が挙げられる。ヘルパー（HTL）エピトープは、細胞内標的化シグナルに結合され得、そして発現されるCTLエピトープから別々に発現され得る；これは、CTLエピトープとは異なる細胞区画へのHTLエピトープの方向付けを可能にする。必要とされる場合、これは、HTLエピトープにHLAクラスII経路へのより効率的な進入を促進し得、それによって、HTL誘導を改善する。HTL誘導またはCTL誘導と対照的に、免疫抑制分子分子（例えば、TGF-β）の共発現によって免疫応答を特異的に減少させることは、特定の疾患において有益であり得る。

10

【0221】

治療的な量のプラスミドDNAは、例えば、E. coliにおける発酵、続く精製によって生成され得る。運用中の細胞バンクからのアリコートを使用して、増殖培地に播種し、そして周知技術に従ってシェーカーフラスコまたはバイオリアクターで飽和まで増殖される。プラスミドDNAは、QIAGEN, Inc. (Valencia, California)によって供給される固相アニオン交換樹脂のような標準的な生物分離技術を使用して精製され得る。必要な場合、スーパーコイルDNAは、ゲル電気泳動または他の方法を使用して、開環状態および線形状態から単離され得る。

20

【0222】

精製プラスミドDNAは、種々の処方物を使用して注射のために調製され得る。これらのうち最も簡単なものは、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中での凍結乾燥されたDNAの再構成である。このアプローチ（「裸（naked）のDNA」として公知である）は、臨床試験における筋肉内（IM）投与のために現在使用される。ミニ遺伝子DNAワクチンの免疫治療効果を最大化するために、精製プラスミドDNAを処方するための代替方法が、望ましくあり得る。種々の方法が記載され、そして新規な技術が利用可能となり得る。カチオン性脂質、糖脂質、および膜融合（fusogenic）リポソームもまた、処方物中で使用され得る（例えば、WO93/24640；Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7):682(1988)；米国特許第5,279,833号；WO91/06309；およびFelgnerら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7413(1987)を参照のこと）。さらに、保護性の相互作用性非凝縮化合物（PINC）として総称されるペプチドおよび化合物もまた、安定性、筋肉内分散性、あるいは特定の器官または細胞型への輸送のような変数に影響するように、精製プラスミドDNAに複合化され得る。

30

【0223】

標的細胞感作は、ミニ遺伝子コードCTLエピトープの発現およびHLAクラスII提示についての機能性アッセイとして使用され得る。例えば、プラスミドDNAは、標準的なCTLクロム放出アッセイのための標的として適切な哺乳動物細胞株に導入される。使用されるトランスフェクション方法は、最終処方物に依存する。エレクトロポレーションは、「裸」のDNAのために使用され得るが、カチオン性脂質は、直接的なインビトロトランスフェクションを可能とする。緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するプラスミドは、蛍光細胞分離分析装置（FACS）を使用して、トランスフェクトされた細胞の濃縮を可能にするために共トランスフェクトされ得る。次いで、これらの細胞は、クロム-51（⁵¹Cr）標識され、そしてエピトープ特異的CTL株に対する標的細胞として使用され；細胞溶解（⁵¹Cr放出によって検出される）は、ミニ遺伝子コード化CTLエピトー

40

50

プの産生およびH L A提示の両方を示す。H T Lエピトープの発現は、H T L活性を評価するためのアッセイを使用して、類似の様式で評価され得る。

【0224】

インビボ免疫原性は、ミニ遺伝子D N A処方物の機能試験についての第2のアプローチである。適切なヒトH L Aタンパク質を発現するトランスジェニックマウスを、D N A産物を用いて免疫する。用量および投与経路は、処方物依存である（例えば、P B S中のD N AについてI M、脂質複合化D N Aについて腹腔内（i . p . ））。免疫の21日後、脾細胞を収集し、そして試験される各エピトープをコードするペプチドの存在下で1週間、再刺激する。その後、C T Lエフェクター細胞について、標準的技術を使用して、ペプチド負荷^{5 1} C r 標識標的細胞の細胞溶解についてのアッセイを行う。ミニ遺伝子コードエ 10
ピトープに対応するペプチドエピトープを負荷されたH L Aによって感作された標的細胞の溶解は、C T Lのインビボ導入についてのD N Aワクチン機能を実証する。H T Lエピトープの免疫原性は、類似の方法で、トランスジェニックマウスにおいて確認される。

【0225】

あるいは、核酸は、例えば、米国特許第5, 204, 253号に記載されるように、弾道的（b a l l i s t i c）送達を使用して投与され得る。この技術を使用して、D N Aのみから構成される粒子が投与される。さらなる代替の実施形態において、D N Aは、粒子（例えば、金粒子）に接着され得る。

【0226】

ミニ遺伝子はまた、当該分野で周知の他の細菌送達系またはウイルス送達系を使用して送 20
達され得る（例えば、本発明のエピトープをコードする発現構築物が、ワクシニアのようなウイルスベクターに組み込まれ得る）。

【0227】

（X . C . 2 . ）C T Lペプチドとヘルパーペプチドとの組合せ）

本発明のC T Lペプチドを含むワクチン組成物は、所望の性状（例えば、改善された血清半減期、広げられた集団適用範囲、または増強された免疫原性）を提供するために改変（例えば、アナログ化）され得る。

【0228】

例えば、ペプチドがC T L活性を誘導する能力は、ペプチドを、Tヘルパー細胞応答を誘導し得る少なくとも1つのエピトープを含む配列に連結することによって増強され得る。 30
C T Lペプチドは直接Tヘルパーペプチドに連結され得るが、しばしば、C T Lエピトープ／H T Lエピトープ結合体は、スペーサー分子によって連結される。スペーサーは、代表的に、比較的小さな中性の分子（例えば、アミノ酸またはアミノ酸模倣物）（これは、生理学的条件下において、実質的に荷電されていない）から構成される。スペーサーは、代表的に、例えば、A l a、G l y、あるいは非極性アミノ酸または中性極性アミノ酸の他の中性スペーサーから選択される。任意に存在するスペーサーが同じ残基から構成される必要はなく、従って、ヘテロオリゴマーまたはホモオリゴマーであり得ることが理解される。存在する場合、スペーサーは、通常、少なくとも1つまたは2つの残基、より通常には、3～6個の残基、ときどき、10以上の残基である。C T Lペプチドエピトープは、C T Lペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにおいて、直接的または 40
スペーサーを介してのいずれかで、Tヘルパーペプチドに連結され得る。免疫原性ペプチドまたはTヘルパーペプチドのいずれかのアミノ末端は、アシル化され得る。

【0229】

特定の実施形態において、Tヘルパーペプチドは、遺伝的に多様な集団の大部分に存在するTヘルパー細胞によって認識されるペプチドである。これは、多くの、ほとんどの、または全てのH L AクラスI I分子に結合するペプチドを選択することによって達成され得る。多くのH L AクラスI I分子に結合するこのようなアミノ酸の例は、破傷風トキソイドの830～843位Q Y I K A N S K F I G I T E（配列番号710）、P l a s m o d i u m f a l c i p a r u mサーカムスポロゾイト（c i r c u m s p o r o z o i t e）（C S）タンパク質の378～398位D I E K K I A K M E K A S S V F N V V 50

NS（配列番号711）、および *Streptococcus* 18kDタンパク質の116～131位GAVDSILGGVATYGAA（配列番号712）のような抗原由来の配列を含む。他の例としては、DR 1-4-7スーパーモチーフ、またはDR3モチーフのいずれかを有するペプチドを含む。

【0230】

あるいは、天然に見出されないアミノ酸配列を使用して、緩いHLA拘束様式（loosely HLA-restricted fashion）で、Tヘルパーリンパ球を刺激し得る合成ペプチドを調製することが可能である（例えば、PCT公開WO95/07707を参照のこと）。Pan-DR結合エピトープ（例えば、PADRETM、Epiimmune, Inc., San Diego, CA）と呼ばれるこれらの合成化合物は、大部分のHLA-DR（ヒトHLAクラスII）分子に最も好ましく結合するように設計される。例えば、式：aKXVAAWTLKAAa（配列番号713）（ここで、「X」は、シクロヘキシルアラニン、フェニルアラニン、またはチロシンのいずれかであり、そしてaは、D-アラニンまたはL-アラニンのいずれかである）を有するpan-DR結合エピトープペプチドは、大部分のHLA-DR対立遺伝子に結合し、そしてそれらのHLA型に関わりなく、大部分の個体由来のTヘルパーリンパ球の応答を刺激することが見出された。pan-DR結合エピトープの代替物は、全て「L」天然アミノ酸を含み、そしてエピトープをコードする核酸の形態で提供され得る。

10

【0231】

HTLペプチドエピトープはまた、それらの生物学的特性を変更するために改変され得る。例えば、これらは、プロテアーゼに対するそれらの耐性を増加し、従って、それらの血清半減期を拡大するためにD-アミノ酸を含むように改変され得るか、あるいはこれらは、それらの生物学的活性を増加させるために、脂質、タンパク質、炭水化物などのような他の分子に結合され得る。例えば、Tヘルパーペプチドは、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、1つ以上のパルミチン酸に結合体化され得る。

20

【0232】

（X. C. 3.）CTLペプチドとT細胞プライミング剤との組合せ）

いくつかの実施形態において、本発明の薬学的組成物中に、Bリンパ球またはTリンパ球をプライミングする少なくとも1つの成分を含むことが望ましくあり得る。脂質は、CTLをインビボでプライミングし得る薬剤として同定されている。例えば、パルミチン酸残基は、リジン残基のε-アミノ基およびα-アミノ基に結合され得、次いで、例えば、Gly、Gly-Gly、Ser、Ser-Serなどのような1つ以上の連結残基を介して免疫原性ペプチドに連結され得る。次いで、脂質化ペプチドは、ミセルまたは粒子で直接的に投与され得るか、リポソームに組み込まれ得るか、またはアジュバント（例えば、不完全フロイントアジュバント）中で乳化され得るかのいずれかで投与され得る。好ましい実施形態において、特に有効な免疫原性組成物は、Lysのε-アミノ基およびα-アミノ基に結合されたパルミチン酸（これは、免疫原性ペプチドのアミノ末端に連結（例えば、Ser-Ser）を介して結合される）を含む。

30

【0233】

CTL応答の脂質プライミングの別の例として、E. coliリポタンパク質（例えば、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン（P₃CSS））は、適切なペプチドに共有結合される場合、ウイルス特異的CTLをプライミングするために使用され得る（例えば、Deresら、Nature 342:561, 1989を参照のこと）。本発明のペプチドは、例えば、P₃CSSに結合され得、そしてこのリポペプチドは、標的抗原に免疫応答を特異的にプライミングするために個体に投与され得る。さらに、中和抗体の導入がまたP₃CSS結合エピトープを用いてプライミングされ得るので、2つのこのような組成物は、体液性応答および細胞媒介応答の両方をより効率的に惹起するように組み合わせられ得る。

40

【0234】

（X. C. 4.）CTLペプチドおよび／またはHTLペプチドでパルスされたDCを含

50

むワクチン組成物)

本発明に従うワクチン組成物の実施形態は、患者血液由来のP B M C、またはそれら由来の単離されたD Cに対する、エピトープ保有ペプチドのカクテルのエキソビボ投与を含む。D Cの収集を容易にする薬物(例えば、P r o g e n i p o i e t i n^{T M} (P h a r m a c i a-M o n s a n t o, S t. L o u i s, M O) またはG M-C S F/I L-4) が使用され得る。D Cをペプチドでパルスした後、そして患者に再注入する前に、未結合ペプチドを除去するためにD Cを洗浄する。この実施形態において、ワクチンは、それらの表面に、H L A分子を複合体化した、パルスされたペプチドエピトープを提示するペプチドパルス化D Cを含む。

【0235】

10

D Cは、ペプチドのカクテルを用いてエキソビボでパルスされ得、これらのうちのいくつかは、205P1B5に対するC T L応答を刺激する。必要に応じて、ヘルパーT細胞(H T L) ペプチド(例えば、天然または人工の緩い拘束性H L AクラスI I ペプチド)は、C T L応答を促進するために含められ得る。従って、本発明に従うワクチンは、205P1B5を発現するかまたは過剰発現する癌を処置するために使用される。

【0236】

(X. D.) 養子免疫療法)

抗原性205P1B5関連ペプチドは、エキソビボでC T L応答および/またはH T L応答もまた惹起するために使用される。得られるC T L細胞またはH T L細胞は、他の従来の形式の治療に応答しないか、または本発明に従う治療ワクチンペプチドまたは核酸に応答しない患者の腫瘍を処置するために使用され得る。特定の抗原に対するエキソビボC T L応答またはH T L応答は、組織培養物中において、患者のまたは遺伝的に適合性のC T L前駆細胞またはH T L前駆細胞を、抗原提示細胞(A P C)(例えば、樹状細胞)の供給源および適切な免疫原性ペプチドとともにインキュベートすることによって誘導される。適切なインキュベーション時間(代表的には、約7~28日)(ここで、前駆細胞が、活性化され、そして効果細胞に増殖する)後に、細胞は、患者に注入して戻され、ここで、これらは、特定の標的細胞(例えば、腫瘍細胞)を破壊する(C T L)か、または破壊を促進する(H T L)。トランスフェクトされた樹状細胞はまた、抗原提示細胞として使用され得る。

20

【0237】

30

(X. E.) 治療目的または予防目的のためのワクチンの投与)

本発明の薬学的組成物およびワクチン組成物は、代表的に、205P1B5を発現するかまたは過剰発現する癌を処置および/または予防するために使用される。治療適用において、ペプチド組成物および/または核酸組成物は、抗原に対して有効なB細胞応答、C T L応答および/またはH T L応答を誘発し、そして症状および/または合併症を治癒するかあるいは少なくとも部分的に停止または遅延させるのに十分な量で患者に投与される。これを達成するのに適切な量は、「治療的有效用量」として規定される。この使用のための有効量は、例えば、投与される特定の組成物、投与方法、処置される疾患の病期および重篤度、患者の体重および全身状態、ならびに処方する医師の判断に依存する。

【0238】

40

薬学的組成物について、本発明の免疫原性ペプチド、またはそれらをコードするD N Aは、一般的に、205P1B5を発現する腫瘍をすでに有する個体に投与される。ペプチドまたはそれらをコードするD N Aは、個々に、または1つ以上のペプチド配列の融合物として投与され得る。患者は、適切に、別々にまたは他の処置(例えば、外科手術)とともに、免疫原性ペプチドを用いて処置され得る。

【0239】

治療的使用のために、投与は、一般的に、205P1B5関連癌の第1の診断において開始すべきである。これは、少なくとも症状が実質的に停止するまで、そしてその後の一定期間の間、用量をブーストすることによって続けられる。患者に送達されるワクチン組成物の実施形態(すなわち、ペプチドカクテル、ポリエピトープポリペプチド、ミニ遺伝子

50

、またはT A A特異的C T Lまたはパルスされた樹状細胞のような実施形態を含むが、これらに限定されない)は、疾患の病期または患者の健康状態に従って、変化し得る。例えば、2 0 5 P 1 B 5を発現する腫瘍を有する患者において、2 0 5 P 1 B 5特異的C T Lを含むワクチンは、代替の実施形態よりも進行した疾患を有する患者において腫瘍細胞を殺す際に、より有効であり得る。

【0 2 4 0】

細胞傷害性T細胞応答を効率的に刺激するのに十分な投与の様式によって送達されるペプチドエпитープの量を提供することが一般的に重要である；ヘルパーT細胞応答を刺激する組成物はまた、本発明のこの実施形態に従って、与えられ得る。

【0 2 4 1】

最初の治療的免疫化のための投薬量は、一般的に、下限値が約1 μ g、5 μ g、5 0 μ g、5 0 0 μ g、または1, 0 0 0 μ gであり、かつ上限値が約1 0, 0 0 0 μ g；2 0, 0 0 0 μ g；3 0, 0 0 0 μ g；または5 0, 0 0 0 μ gである単位用量範囲で存在する。ヒトのための投薬量値は、代表的に、7 0 k gの患者当たり、約5 0 0 μ g～約5 0, 0 0 0 μ gの範囲である。数週間～数ヶ月にわたるブーストレジメンに従って、約1. 0 μ g～約5 0, 0 0 0 μ gの間のブースト投薬量のペプチドが、患者の血液から得られたC T LおよびH T Lの比活性を測定することによって決定されるような患者の応答および状態に依存して投与され得る。投与は、少なくとも臨床的症状または実験室の試験によって、新生物形成が、排除されるかまたは減少することを示すまで、そしてその後、一定期間続けられるべきである。投薬量、投与の経路、および用量スケジュールは、当該分野に公知の方法論に従って調整される。

【0 2 4 2】

特定の実施形態において、本発明のペプチドおよび組成物は、重篤な疾患状態（すなわち、生命を脅かすかまたは潜在的に生命を脅かす状態）で使用される。このような場合、本発明の好ましい組成物では、外来性物質が最小量でありそしてペプチドが比較的非毒性の性質であることの結果として、これらの記載された投薬量と比較してかなり過剰のこれらのペプチド組成物を投与することが可能であり、そして処置する医師によって望ましく感じられ得る。

【0 2 4 3】

本発明のワクチン組成物はまた、純粋に予防薬剤として使用され得る。一般的に、初回の予防免疫のための投薬量は一般に、低い値が約1、5、5 0、5 0 0または1 0 0 0 μ gでありかつ高い値が約1 0, 0 0 0；2 0, 0 0 0；3 0, 0 0 0；または5 0, 0 0 0 μ gである単位投薬量範囲で存在する。ヒトのための投薬量の値は、代表的に、7 0 k gの患者あたりで約5 0 0 μ g～約5 0, 0 0 0 μ gの範囲である。これに続いて、初回のワクチン投与から約4週間後～6ヵ月後の規定された間隔で、約1. 0 μ g～約5 0, 0 0 0 μ gの間のペプチドのブースト投薬量が投与される。ワクチンの免疫原性は、患者の血液サンプルから得られるC T LおよびH T Lの比活性を測定することによって評価され得る。

【0 2 4 4】

治療的処置のための薬学的組成物は、非経口投与、局所的（t o p i c a l）投与、経口投与、経鼻投与、クモ膜下腔内（i n t r a t h e c a l）投与、または局部的（l o c a l）投与（例えば、クリームまたは局所的軟膏として）のために意図される。好ましくは、この薬学的組成物は、非経口的（例えば、静脈内、皮下的、皮内、または筋内）に投与される。従って、本発明は、受容可能なキャリア（好ましくは、水性キャリア）中に溶解または懸濁された免疫原性ペプチドの溶液を含む、非経口投与のための組成物を提供する。

【0 2 4 5】

種々の水性キャリア（例えば、水、緩衝化水、0. 8 %生理食塩水、0. 3 %グリシン、ヒアルロン酸など）が使用され得る。これらの組成物は、従来からの周知の滅菌技術によって滅菌され得るか、または濾過滅菌され得る。得られた水溶液は、使用のためにその状

10

20

30

40

50

態のままパッケージされ得るか、または凍結乾燥され得る（この凍結乾燥された調製物は、投与前に滅菌溶液と合わせられる）。

【0246】

この組成物は、必要に応じて、生理的条件に近づけるために、薬学的に受容可能な補助物質（例えば、pH調整剤および緩衝化剤、張度調整剤、湿潤剤、防腐剤など（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミンなど））を含み得る。

【0247】

薬学的処方物における本発明のペプチドの濃度は、広範に（すなわち、重量で、約0.1%未満から、通常は、約2%であるかもしくは少なくとも約2%から、20%～50%ほど多くまで、またはそれより多くまで）変動し得、そして選択された特定の投与様式に従って、主に流体容量、粘度などにより選択される。

【0248】

組成物のヒト単位用量形態は、代表的に、ヒト単位用量の受容可能なキャリア（1つの実施形態では、水性キャリア）を含む薬学的組成物中に含まれ、そしてヒトへのこのような組成物の投与のために使用されることが当業者に公知（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, 編者A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985を参照のこと）の容量/量で投与される。例えば、初回免疫のためのペプチド用量は、70kgの患者について、約1～約50,000μg、一般的には、100～5,000μgであり得る。例えば、核酸については、初回免疫は、裸の核酸の形態で発現ベクターを使用して実施され得、複数の部位に0.5～5mgの量でIM（またはSCもしくはID）投与され得る。核酸（0.1～1000μg）もまた、遺伝子銃を使用して投与され得る。3～4週間のインキュベーション期間後に、次いで、ブースター用量が投与される。ブースターは、 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^9$ pfuの用量で投与される組換え鶏痘ウイルスであり得る。抗体について、処置は一般に、静脈内注射（IV）のような受容可能な投与経路を介して、代表的には約0.1～約10mg/kg体重の範囲の用量で、抗205P1B5抗体調製物を反復投与することを包含する。一般的には、1週間あたり10～500mg mAbの範囲の用量が有効であり、かつ十分に許容される。さらに、抗205P1B5 mAb調製物を、IVで約4mg/kg患者体重の初回負荷用量で与え、次いで毎週、IVで約2mg/kgの用量を与えることは、受容可能な投薬レジメンを表す。当業者に理解されるように、種々の要因が、特定の場合における理想的な用量に影響を及ぼし得る。このような要因としては、例えば、組成物の半減期、Abの結合親和性、物質の免疫原性、患者における205P1B5の発現程度、循環しているシェッド（shed）205P1B5抗原の程度、所望される定常状態の濃度レベル、処置の頻度、および本発明の処置方法と組み合わせて使用される化学療法剤または他の薬剤の影響、ならびに特定の患者の健康状態が挙げられる。

【0249】

1つの実施形態では、ポリヌクレオチドのヒト単位投薬形態は、任意の治療的効果を与える適切な投薬量範囲または有効量を含む。当業者に理解されるように、治療的効果は、ポリヌクレオチドの配列、ポリヌクレオチドの分子量、および投与経路を含む多数の要因に依存する。投薬量は一般的に、症状の重篤度、患者の病歴などのような、当該分野で公知の種々のパラメーターに従って、医師または他の医療専門家により選択される。一般的には、約20塩基のポリヌクレオチドについて、投薬量範囲は、例えば、約0.1、0.25、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50、60、80、100、200、300、400または500mg/kgのような独立して選択される下限から、その下限よりも大きな約60、80、100、200、300、400、500、750、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000または10,000mg/kgの独立して選択される上限までの中から選択され得る。例えば、用量は、以下のほぼいずれかであり得る：0.1～100mg/kg

g、0.1～50mg/kg、0.1～25mg/kg、0.1～10mg/kg、1～500mg/kg、100～400mg/kg、200～300mg/kg、1～100mg/kg、100～200mg/kg、300～400mg/kg、400～500mg/kg、500～1000mg/kg、500～5000mg/kg、または500～10,000mg/kg。一般的に、非経口的な投与経路は、疾患組織に対するより直接的なポリヌクレオチドの適用（増加する長さのポリヌクレオチドで行う場合）と比較して、より多い用量のポリヌクレオチドを必要とし得る。

【0250】

1つの実施形態では、T細胞のヒト単位投薬形態は、任意の治療的効果を与える適切な投薬量範囲または有効量を含む。当業者に理解されるように、治療的効果は、多数の要因に依存する。投薬量は一般的に、症状の重篤度、患者の病歴などのような、当該分野で公知の種々のパラメーターに従って、医師または他の医療専門家により選択される。用量は、約 10^4 細胞～約 10^6 細胞、約 10^6 細胞～約 10^8 細胞、約 10^8 細胞～約 10^{11} 細胞、または約 10^8 細胞～約 5×10^{10} 細胞であり得る。用量はまた、約 10^6 細胞/ m^2 ～約 10^{10} 細胞/ m^2 、または約 10^6 細胞/ m^2 ～約 10^8 細胞/ m^2 であり得る。

10

【0251】

本発明のタンパク質（1つまたは複数）および／またはそのタンパク質（1つまたは複数）をコードする核酸はまた、リポソームを介して投与され得、それらはまた以下のために役立ち得る：1）リンパ系組織のような特定組織へのタンパク質（1つまたは複数）の標的化；2）疾患細胞に対する選択的な標的化；または、3）ペプチド組成物の半減期の増加。リポソームとしては、エマルジョン、泡沫体（foam）、ミセル、不溶性単層、液晶、リン脂質分散体、層状層などが挙げられる。これらの調製物において、送達されるペプチドは、単独でかあるいはリンパ系細胞に蔓延しているレセプターに結合する分子（例えば、CD45抗原に結合するモノクローナル抗体）と組み合わせてかまたは他の治療用組成物もしくは免疫原性組成物と組み合わせて、リポソームの部分として組み込まれる。従って、本発明の所望のペプチドを充填しているかまたは施されているかのいずれかのリポソームは、リンパ系細胞の部位に指向され得、次いで、このリンパ系細胞に、リポソームはペプチド組成物を送達する。本発明に従って使用するためのリポソームは、標準的な小胞形成脂質から形成され、これは一般的に、中性リン脂質および負に荷電したリン脂質、ならびにステロール（例えば、コレステロール）を含む。脂質の選択は一般的に、例えば、リポソームのサイズ、酸不安定性、および血流中でのリポソームの安定性の考慮により導かれる。リポソームを調製するためには、例えば、Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467（1980）ならびに米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、および同第5,019,369号に記載されているように、種々の方法が利用可能である。

20

30

【0252】

免疫系の細胞を標的化するために、リポソームに取り込まれるべきリガンドとしては、例えば、所望される免疫系細胞の細胞表面決定基に特異的な抗体またはそのフラグメントが挙げられ得る。ペプチドを含むリポソーム懸濁物は、静脈内、局部的、局所的などによって、とりわけ投与様式、送達されるペプチド、および処置される疾患の病期に従って変動する用量において投与され得る。

40

【0253】

固形組成物については、従来の非毒性の固形キャリアが使用され得、これには、例えば、製薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。経口投与のために、薬学的に受容可能な非毒性の組成物は、任意の通常使用される賦形剤（例えば、先に列挙されたキャリアなど）と、一般的に10～95%の活性成分（すなわち、本発明の1つ以上のペプチド）そしてより好ましくは、25%～75%の濃度の活性成分とを組み込むことによって形成される。

50

【0254】

エアロゾル投与のために、免疫原性ペプチドは好ましくは、界面活性剤および噴霧剤と共に細かく分割された形態で供給される。ペプチドの代表的なパーセンテージは、約0.01重量%~20重量%、好ましくは、約1%~10%である。当然ながら、界面活性剤は非毒性でなければならず、そして好ましくは、噴霧剤に可溶性でなければならない。このような薬剤の代表例は、脂肪族多価アルコールまたはその環状無水物を有する、約6~22個の炭素原子を含む脂肪酸（例えば、カプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリック酸（olesteric acid）、およびオレイン酸）のエステルおよび部分エステルである。混合エステル（例えば、混合グリセリドまたは天然のグリセリド）が使用され得る。界面活性剤は、その組成物の約0.1重量%~20重量%、好ましくは、約0.25~5%を構成し得る。組成物の残りは通常、噴霧剤である。キャリアもまた、例えば、鼻腔内送達のためのレシチンの場合のように、所望の場合に含まれ得る。

10

【0255】

(XI.) 205P1B5の診断的实施形態および予後的实施形態)

本明細書中で開示されるように、205P1B5ポリヌクレオチド、205P1B5ポリペプチド、205P1B5反応性の細胞傷害性T細胞(CTL)、205P1B5反応性のヘルパーT細胞(HTL)および抗ポリペプチド抗体は、癌のような調節不全性の細胞増殖と関連した状態、特に、表Iに列挙された癌（例えば、その組織発現の特異的パターン、ならびに、例えば、「正常組織、および患者検体における205P1B5の発現分析」と表題を付けられた実施例4に記載されているような特定の癌におけるその過剰発現の両方を参照のこと）を試験する周知の診断的アッセイ、予後的アッセイ、および治療的アッセイにおいて使用される。

20

【0256】

205P1B5は、前立腺関連抗原であるPSAに類似し得る。PSAは、前立腺癌の存在を同定およびモニターするために数年間にわたり医療従事者により使用されてきた原型マーカーである（例えば、Merrillら, J. Urol. 163(2):503-5120(2000); Polascikら, J. Urol. Aug; 162(2):293-306(1999)およびFortierら, J. Nat. Cancer Inst. 91(19):1635-1640(1999)を参照のこと）。種々の他の診断マーカーもまた、同様の状況下で使用され、これらにはp53およびK-rasが挙げられる（例えば、Tulchinskyら, Int J Mol Med 1999 Jul 4(1):99-102およびMinimotoら, Cancer Detect Prev 2000; 24(1):1-12を参照のこと）。従って、205P1B5ポリヌクレオチドおよび205P1B5ポリペプチド（ならびに、これらの分子の存在を同定するために使用される205P1B5ポリヌクレオチドプローブおよび抗205P1B5抗体）ならびにそれらの特性に関する本開示により、当業者は、使用された方法と類似した方法において（例えば、癌に関連した状態を試験することに関する種々の診断アッセイにおいて）これらの分子を利用することが可能となる。

30

【0257】

205P1B5ポリヌクレオチド、205P1B5ポリペプチド、205P1B5と反応性のT細胞および抗体を利用する診断方法の代表的な実施形態は、例えば、PSAポリヌクレオチド、PSAポリペプチドならびにPSAと反応性のT細胞および抗体を使用する十分に確立された診断アッセイ由来の方法と類似する。例えば、PSAの過剰発現または前立腺癌の転移をモニターする方法において、PSA mRNAの存在および／またはレベルを観察するために、まさしくPSAポリヌクレオチドを、プローブ（例えば、ノーザン分析において（例えば、Shariefら, Biochem. Mol. Biol. Int. 33(3):567-74(1994)を参照のこと））およびプライマー（例えば、PCR分析において（例えば、Okegawaら, J. Urol. 163(4):1189-1190(2000)を参照のこと））として使用するよう、本明細書中に記載

40

50

される205P1B5ポリヌクレオチドは、205P1B5の過剰発現またはこの遺伝子を発現する前立腺癌および他の癌の転移を検出するために、同じ様式で利用され得る。あるいは、まさしくPSAポリペプチドを使用してPSAに特異的な抗体を生成し、次いで、この抗体を、PSAタンパク質の過剰発現（例えば、Stephanら、Urology 55（4）：560～3（2000）を参照のこと）または前立腺細胞の転移（例えば、Alanenら、Pathol. Res. Pract. 192（3）：233～7（1996）を参照のこと）をモニターする方法においてPSAタンパク質の存在および／またはレベルを観察するために使用し得るように、本明細書中に記載される205P1B5ポリペプチドは、205P1B5の過剰発現またはこの遺伝子を発現する前立腺細胞および他の癌細胞の転移の検出する際に使用するための抗体を生成するために使用され得る。

10

【0258】

詳細には、転移は、元々の器官（例えば、肺または前立腺など）から身体の異なる領域（例えば、リンパ節）への癌細胞の移動を包含するので、205P1B5ポリヌクレオチドおよび／または205P1B5ポリペプチドを発現する細胞の存在について生物学的サンプルを試験するアッセイが、転移の証拠を提供するために使用され得る。例えば、205P1B5発現細胞を通常含まない組織（リンパ節）由来の生物学的サンプルが、LAPC4およびLAPC9（それぞれ、リンパ節および骨の転移から単離された異種移植片）に見られる205P1B5発現のような、205P1B5発現細胞を含むことが見出される場合、この発見は転移を示す。

20

【0259】

あるいは、205P1B5ポリヌクレオチドおよび／または205P1B5ポリペプチドは、例えば、通常205P1B5を発現しないかまたは異なるレベルで205P1B5を発現する生物学的サンプル中の細胞が、205P1B5を発現するかまたは205P1B5の増加した発現を有することが見出された場合（例えば、表Iに列挙された癌および添付の図面に示される患者サンプルなどにおける205P1B5の発現を参照のこと）に、癌の証拠を提供するために使用され得る。このようなアッセイにおいて、当業者は、（205P1B5に加えて）第二の組織制限マーカー（例えば、PSA、PSCAなど）の存在について生物学的サンプルを試験することによって、転移に関する補足的な証拠を生み出すことをさらに所望し得る（例えば、Alanenら、Pathol. Res. Pract. 192（3）：233～237（1996）を参照のこと）。

30

【0260】

まさしくPSAポリヌクレオチドフラグメントおよびPSAポリヌクレオチド改変体が、PSAをモニターする方法における使用のために当業者によって利用されるように、205P1B5ポリヌクレオチドフラグメントおよび205P1B5ポリヌクレオチド改変体は、類似の様式で使用される。特に、PSAをモニターする方法において使用される代表的なPSAポリヌクレオチドは、PSA cDNA配列のフラグメントから構成されるプローブまたはプライマーである。これを例にとると、PSAポリヌクレオチドをPCR増幅するために使用されるプライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応において機能するように、PSA配列全体よりも短い配列を含まなくてはならない。このようなPCR反応の状況において、当業者は一般に、目的のポリヌクレオチドの異なる部分を増幅するためにかまたは増幅反応を最適化するためにプライマーとして使用され得る、種々の異なるポリヌクレオチドフラグメントを作製する（例えば、Caetano-Anolles, G. Biotechniques 25（3）：472～476, 478～480（1998）；Robertsonら、Methods Mol. Biol. 98：121～154（1998）を参照のこと）。このようなフラグメントの使用のさらなる例示が、「正常組織、および患者被験体における205P1B5の発現分析」と表題を付けられた実施例4に提供され、ここで、205P1B5ポリヌクレオチドフラグメントは、癌細胞における205P1B5 RNAの発現を示すためのプローブとして使用される。さらに、改変体ポリヌクレオチド配列は、代表的に、PCR分析およびノーザン分析において、対応するmRN

40

50

Aについてのプライマーおよびプローブとして使用される（例えば、Sawaiら、*Fetal Diagn. Ther.* 1996 Nov-Dec; 11(6): 407-13 および *Current Protocols In Molecular Biology*, Volume 2, Unit 2, Frederick M. Ausubelら編, 1995を参照のこと）。ポリヌクレオチドフラグメントおよび改変体は、それらが、高ストリンジェンシー条件下で、標的ポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号701に示される205P1B5ポリヌクレオチドまたはその改変体）に結合し得る状況下において有用である。

【0261】

さらに、抗体によって認識され得るエピトープを含むPSAポリペプチドまたはそのエピトープに特異的に結合するT細胞が、PSAをモニターする方法において使用される。205P1B5ポリペプチドフラグメント、および205P1B5ポリペプチドアナログまたは改変体もまた、類似の様式で使用され得る。ポリペプチドフラグメントまたはポリペプチド改変体を使用して抗体（例えば、抗PSA抗体またはT細胞）を生成するこの実施は、開業医によって使用されている融合タンパク質のような広範な種々の系と共に当該分野の技術において代表的である（例えば、*Current Protocols In Molecular Biology*, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubelら編, 1995を参照のこと）。この状況において、各エピトープ（単数または複数）は、抗体またはT細胞と反応性である構造体を提供するように機能する。代表的に、当業者は、目的のポリペプチドの異なる部分に特異的な免疫応答を生成するために使用され得る種々の異なるポリペプチドフラグメントを生成する（例えば、米国特許第5,840,501号および米国特許第5,939,533号を参照のこと）。例えば、本明細書中に考察される205P1B5の生物学的モチーフまたは当該分野で利用可能なモチーフに基づいて当業者により容易に同定されるモチーフ保有部分配列の1つを含むポリペプチドを利用することが好適であり得る。ポリペプチドのフラグメント、改変体またはアナログは代表的に、これらが標的ポリペプチド配列（例えば、配列番号703に示される205P1B5ポリペプチド）に特異的な抗体またはT細胞を生成し得るエピトープを含む限りにおいて、この状況で有用である。

【0262】

本明細書中に示されるように、205P1B5ポリヌクレオチドおよび205P1B5ポリペプチド（ならびに、これらの分子の存在を同定するために使用される205P1B5ポリヌクレオチドプローブおよび抗205P1B5抗体またはT細胞）は、表Iに列挙された癌のような癌を診断するにおいてそれらを有用なものとする特異的特性を示す。前立腺癌のような、本明細書中に記載の疾患状態の存在または発症を評価するために、205P1B5遺伝子産物の存在を測定する診断アッセイは、PSAを用いて非常に首尾よく行われているように、予防的な測定またはさらなるモニタリングのための患者を同定するために使用される。さらに、これらの物質は、例えば、前立腺起源の転移の明確な診断がPSAのみについての試験に基づいてなされ得ず（例えば、Alanenら、*Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-237 (1996)を参照のこと）、そしてその結果、205P1B5ポリヌクレオチドおよび205P1B5ポリペプチド（ならびに、これらの分子の存在を同定するために使用される205P1B5ポリヌクレオチドプローブおよび抗205P1B5抗体）のような物質が、前立腺起源の転移を確認するために使用されることが必要である状況において、PSAに対して類似した特徴または補足的な特徴を有する分子についての当該分野での必要性を満たす。

【0263】

最後に、診断アッセイにおけるそれらの使用に加えて、本明細書中に開示される205P1B5ポリヌクレオチドは、205P1B5遺伝子がマッピングされる染色体領域（以下の実施例3を参照のこと）におけるオンコジーン関連染色体異常の同定におけるそれらの使用のような、多くの他の用途を有する。さらに、診断アッセイにおけるそれらの使用に加えて、本明細書中に開示される205P1B5関連タンパク質および205P1B5関

連ポリヌクレオチドは、起源未知の組織の法医学的分析におけるそれらの使用のような他の有用性を有する（例えば、Takahama K Forensic Sci Int 1996 Jun 28; 80 (1-2): 63-9を参照のこと）。

【0264】

さらに、本発明の205P1B5関連タンパク質または205P1B5関連ポリヌクレオチドを使用して、205P1B5の過剰発現により特徴付けられる病理学的状態を処置し得る。例えば、図2もしくは図3のアミノ酸配列もしくは核酸配列、またはいずれかのフラグメントを使用して、205P1B5抗原に対する免疫応答を生成し得る。205P1B5と反応性の抗体または他の分子を使用して、この分子の機能を調節し得、それにより治療的利益を提供し得る。

10

【0265】

(XII.) 205P1B5タンパク質機能の阻害)

本発明は、205P1B5のその結合パートナーへの結合を阻害するためまたは他のタンパク質（単数または複数）とのその結合を阻害するための種々の方法および組成物、ならびに、205P1B5の機能を阻害するための方法を含む。

【0266】

(XII.A.) 細胞内抗体を用いた205P1B5の阻害)

1つのアプローチにおいて、205P1B5に特異的に結合する単鎖抗体をコードする組換えベクターが、205P1B5を発現する細胞へと遺伝子移入技術を介して導入される。それにより、そのコードされた単鎖抗205P1B5抗体は細胞内で発現され、205P1B5タンパク質に結合し、そしてそれによりその機能を阻害する。このような細胞内単鎖抗体を操作するための方法は周知である。このような細胞内抗体（「内部抗体 (intrabody)」としても公知）は、その細胞内の特定の区画に特異的に標的化され、その処置の阻害活性が焦点をあわせられる箇所に対する制御を与える。この技術は、当該分野で首尾良く適用されている（概説として、RichardsonおよびMarasco、1995、TIBTECH、第13巻を参照のこと）。内部抗体は、他の豊富な細胞表面レセプターの発現を実質的に排除することが示されている（例えば、Richardsonら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3137~3141; Beerliら、1994、J. Biol. Chem. 289: 23931~23936; Deshaneら、1994、Gene Ther. 1: 332~337を参照のこと）。

20

30

【0267】

単鎖抗体は、可撓性のリンカーポリペプチドにより連結された重鎖および軽鎖の可変ドメインを含み、そして単一のポリペプチドとして発現される。必要に応じて、単鎖抗体は、その軽鎖定常領域に連結された単鎖可変領域フラグメントとして発現される。周知の細胞内輸送シグナルが、内部抗体を所望の細胞内区画に対して正確に標的化するために、このような単鎖抗体をコードする組換えポリヌクレオチドベクター中に操作される。例えば、小胞体 (ER) に標的化された内部抗体は、リーダーペプチドを組み込むように、そして必要に応じて、C末端ER保持シグナル（例えば、KDELアミノ酸モチーフ）を組み込むように、操作される。核において活性を発揮することが意図される内部抗体は、核局在化シグナルを含むように操作される。脂質部分が、形質膜の細胞質ゾル側に内部抗体をつなぐために、その内部抗体に連結される。内部抗体はまた、細胞質ゾルにおいて機能を発揮するように標的化され得る。例えば、細胞質ゾル内部抗体を使用して、細胞質ゾル内に因子を隔離し、それによりそれらの因子がその天然での細胞中の目的地に輸送されることを防ぐ。

40

【0268】

1つの実施形態では、内部抗体を使用して、核に205P1B5を捕捉し、それにより核内でその活性を妨げる。核標的化シグナルが、所望の標的化を達成するために、このような205P1B5内部抗体に操作される。このような205P1B5内部抗体は、特定の205P1B5ドメインに特異的に結合するように設計される。別の実施形態において、

50

205P1B5タンパク質に特異的に結合する細胞質ゾル内部抗体を使用して、205P1B5が核に近づくことを妨げ、それにより、205P1B5が、核内においていかなる生物学的活性を発揮することをも妨げる（例えば、205P1B5が他の因子と転写複合体を形成するのを妨げる）。

【0269】

このような内部抗体の発現を特定の細胞に特異的に指向するために、その内部抗体の転写は、適切な腫瘍特異的プロモーターおよび／またはエンハンサーの調節制御下に配置される。内部抗体の発現を前立腺に特異的に標的化するために、例えば、PSAプロモーターおよび／またはプロモーター／エンハンサーが、利用され得る（例えば、1999年7月6日付けで発行された、米国特許第5,919,652号を参照のこと）。

10

【0270】

(XII.B.) 組換えタンパク質を用いた205P1B5の阻害)

別のアプローチにおいて、組換え分子は、205P1B5に結合し、それにより205P1B5の機能を妨げる。例えば、このような組換え分子は、205P1B5が、その結合パートナー（単数または複数）に接近／結合すること、または他のタンパク質（1つまたは複数）と結合することを防止または阻害する。このような組換え分子は、例えば、205P1B5特異的抗体分子の反応性部分（単数または複数）を含み得る。特定の実施形態において、205P1B5結合パートナーの205P1B5結合ドメインは、二量体融合タンパク質へと操作され、これによってこの融合タンパク質は、ヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）のFc部分に連結された2つの205P1B5リガンド結合ドメインを含む。このようなIgG部分は、例えば、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインならびにヒンジ領域を含み得るが、C_H1ドメインは含まない。このような二量体融合タンパク質は、205P1B5の発現と関連する癌に罹患している患者に可溶性形態で投与され、それによりこの二量体融合タンパク質は205P1B5に特異的に結合し、そして205P1B5の結合パートナーとの相互作用をブロックする。このような二量体融合タンパク質はさらに、公知の抗体連結技術を使用して、多量体タンパク質へと組み合わされる。

20

【0271】

(XII.C.) 205P1B5の転写または翻訳の阻害)

本発明はまた、205P1B5遺伝子の転写を阻害するための種々の方法および組成物を含む。同様に、本発明はまた、205P1B5 mRNAからタンパク質への翻訳を阻害するための方法および組成物を提供する。

30

【0272】

1つのアプローチにおいて、205P1B5遺伝子の転写を阻害する方法は、205P1B5遺伝子を205P1B5アンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程を包含する。別のアプローチにおいて、205P1B5 mRNAの翻訳を阻害する方法は、205P1B5 mRNAをアンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程を包含する。別のアプローチにおいて、205P1B5特異的リボザイムが、205P1B5メッセージを切断し、それにより翻訳を阻害するために使用される。このようなアンチセンスに基づく方法およびリボザイムに基づく方法はまた、205P1B5遺伝子の調節領域（例えば、205P1B5プロモーターエレメントおよび／またはエンハンサーエレメント）に関し得る。同様に、205P1B5遺伝子転写因子を阻害し得るタンパク質が、205P1B5 mRNAの転写を阻害するために使用される。上述の方法において有用な種々のポリヌクレオチドおよび組成物が、上記で記載されている。転写および翻訳を阻害するためのアンチセンス分子およびリボザイム分子の使用は、当該分野で周知である。

40

【0273】

205P1B5の転写活性化を妨害することにより205P1B5の転写を阻害する他の因子もまた、205P1B5を発現する癌を処置するために有用である。同様に、205P1B5のプロセッシングに干渉する因子は、205P1B5を発現する癌を処置するために有用である。このような因子を利用する癌の処置方法もまた、本発明の範囲内である。

【0274】

50

(X I I . D .) 治療的ストラテジーについての一般的な考慮事項)

遺伝子移入および遺伝子治療の技術が、205P1B5を合成している腫瘍細胞に、治療用ポリヌクレオチド分子（すなわち、アンチセンス、リボザイム、内部抗体をコードするポリヌクレオチド、および他の205P1B5阻害分子）を送達するために使用され得る。多数の遺伝子治療アプローチが、当該分野で公知である。205P1B5アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、205P1B5の転写に干渉し得る因子などをコードする組換えベクターが、このような遺伝子治療アプローチを使用して標的腫瘍細胞に送達され得る。

【0275】

上記の治療的アプローチは、広範な種々の外科的レジメン、化学療法的レジメンまたは放射線療法レジメンのいずれか1つと組み合わせられ得る。本発明の治療的アプローチは、すべての患者に対して、そして特に、化学療法剤の毒性に十分に耐性ではない患者に対して利点となる、化学療法（または他の療法）の減少した投薬量の使用および／またはより低頻度の投与の使用を可能にし得る。

【0276】

特定の組成物（例えば、アンチセンス、リボザイム、内部抗体）、またはこのような組成物の組合せの抗腫瘍活性は、種々のインビトロアッセイ系およびインビボアッセイ系を使用して評価され得る。治療的活性を評価するインビトロアッセイとしては、細胞増殖アッセイ、軟寒天アッセイおよび腫瘍促進活性を示す他のアッセイ、治療用組成物が結合パートナーへの205P1B5の結合を阻害する程度を決定し得る結合アッセイなどが挙げられる。

【0277】

インビボでは、205P1B5治療用組成物の効力は、適切な動物モデルにおいて評価され得る。例えば、異種間前立腺癌モデル（ここで、ヒト前立腺癌の外植片または継代された異種移植片組織が、免疫無防備状態の動物（例えば、ヌードマウスまたはSCIDマウス）に導入される）が使用され得る（Kleinら、1997, Nature Medicine 3:402~408）。例えば、1998年4月23日に出願された、Sawyersら、PCT特許出願WO98/16628は、原発性腫瘍の発生、微小転移、および疾患の後期段階に特徴的な骨芽細胞性転移の形成を反復し得るヒト前立腺癌の種々の異種移植片モデルを記載する。効力は、腫瘍形成、腫瘍後退または転移などの阻害を測定するアッセイを使用して予測され得る。アポトーシスの促進を評価するインビボアッセイが、治療用組成物の評価において有用である。1つの実施形態において、治療用組成物で処置された腫瘍保有マウス由来の異種移植片は、アポトーシス性病巣の存在について試験され得、そして未処置のコントロール異種移植片保有マウスと比較され得る。アポトーシス性病巣が処置マウスの腫瘍に見出される度合いが、この組成物の治療的効力の指標を提供する。

【0278】

前述の方法の実施において使用される治療用組成物は、所望の送達方法に適切なキャリアを含む薬学的組成物に処方され得る。適切なキャリアとしては、治療用組成物と組み合わせられる場合に、その治療用組成物の抗腫瘍機能を保持し、かつ患者の免疫系と一般に無反応性である、任意の物質が挙げられる。例としては、任意の多数の標準的な薬学的キャリア（例えば、滅菌リン酸緩衝化生理食塩水溶液、静菌水など）が挙げられるがこれに限定されない（一般には、Remington's Pharmaceutical Sciences（第16版）、A. Osal. 編、1980を参照のこと）。

【0279】

治療用処方物は、可溶化され得、そして腫瘍部位に治療用組成物を送達し得る任意の経路を介して投与され得る。潜在的に有効な投与経路としては、静脈内、非経口、腹腔内、筋内、腫瘍内、皮内、器官内、同所性（orthotopic）などが挙げられるがこれらに限定されない。静脈内注射に好ましい処方物は、保存静菌水、滅菌非保存水の溶液中および／または注射用0.9%滅菌塩化ナトリウムを含むポリビニルクロリド製またはポリ

10

20

30

40

50

エチレン製のバッグ（U S P）に希釈された治療用組成物を含む。治療用タンパク質調製物は、凍結乾燥され得、そして滅菌粉末として、好ましくは減圧下で保存され得、次いで注射する前に、静菌水（例えば、ベンジルアルコール防腐剤を含む）または滅菌水中で再構築され得る。

【0280】

前述の方法を使用する癌の処置についての投薬量および投与プロトコルは、方法および標的の癌とともに変動し、そして一般に、当該分野で理解される多数の他の要因に依存する。

【0281】

（X I I I . ）キット）

本明細書中で記載される診断適用および治療適用における使用について、キットはまた、本発明の範囲内である。このようなキットは、キャリア、パッケージ、またはバイアル、チューブなどのような1つ以上の容器を収容するために区画化されている容器を含み得、各容器は、本方法において使用される別々の成分のうちの1つを含む。例えば、容器は、検出可能に標識されているかまたは標識され得るプローブを含み得る。このようなプローブは、それぞれ205P1B5関連タンパク質または205P1B5遺伝子もしくはメッセージに特異的な抗体またはポリヌクレオチドであり得る。本方法が標的核酸を検出するために核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合、キットはまた、この標的核酸配列増幅のためのヌクレオチドを含む容器、および／またはレポーター分子（例えば、酵素標識、蛍光標識または放射性同位体標識）に結合されたレポーター手段（例えば、アビジンまたはストレプトアビジンのようなビオチン結合タンパク質）を含む容器を有し得る。キットは、図2もしくは図3のアミノ酸配列またはこれらのアナログ、あるいはこのようなアミノ酸配列をコードする核酸分子の全てまたは一部を含み得る。

【0282】

本発明のキットは、代表的には上記の容器、ならびに商業的および使用者の立場から所望される物質を含む1つ以上の他の容器を含み、この物質としては、以下が挙げられる：緩衝液、希釈液、フィルター、針、シリンジおよび使用のための指示書を有するパッケージ挿入物。

【0283】

ラベルは、組成物が特定の治療適用または非治療適用に使用されることを示すために容器上にあり得、そしてインビボ用途またはインビトロ用途（例えば、上記の用途）のいずれであるかについての指示もまた示し得る。指示および／または他の情報はまた、キットと共に含まれる挿入物に含まれ得る。

【実施例】

【0284】

本発明の種々の局面は、以下のいくつかの実施例によってさらに記載および例示され、これらの実施例は、いずれも本発明の範囲を限定することが意図されない。

【0285】

（実施例1：205P1B5遺伝子のcDNAフラグメントのSSH生成単離）

前立腺癌において過剰発現される遺伝子を単離するために、本発明者らは、前立腺癌組織由来のcDNAを使用する抑制サブトラクションハイブリダイゼーション（*Suppression Subtractive Hybridization*）（SSH）手順を使用した。この205P1B5 SSH cDNA配列を、前立腺癌プール（6および7のGleasonスコアを有する患者）から9種の正常組織（胃、骨格筋、肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、小腸および心臓）由来のcDNAの混合物を除いたものからなるサブトラクションから誘導した。RT-PCRによって、205P1B5 cDNAを、前立腺癌組織プール、前立腺癌異種移植片プール（LAPC4-AD、LAPC4-AI、LAPC9-AD、LAPC9-AI）および転移性癌プールにおいて高度に発現されると同定し、正常な肝臓、腎臓、肺、胃、脾臓および結腸からなる生体組織プールにおいて、発現は観察されなかった。

10

20

30

40

50

【0286】

289bpの205P1B5 SSH cDNA配列は、ヒトコリン作用性レセプターである、221/225(98%)の同一性を有するニコチン性 α ポリペプチド2(ニューロン性:CHRNA2)と一致した(図1)。全長205P1B5/CHRNA2 cDNAおよびORFを、図2に記載し、そしてそのタンパク質配列を、図3に列挙する。

【0287】

(材料および方法)

(RNAの単離)

腫瘍組織を、Trizol試薬(Life Technologies, Gibco BRL)中で、10ml/gの組織または10ml/ 10^8 の細胞を用いてホモジナイズして、総RNAを単離した。ポリA RNAを、QiagenのOligotex mRNA MiniおよびMidiキットを使用して、総RNAから精製した。総RNAおよびmRNAを、分光光度分析(O.D. 260/280nm)によって定量し、そしてゲル電気泳動によって分析した。

10

【0288】

(オリゴヌクレオチド)

以下のHPLCで精製したオリゴヌクレオチドを使用した。

【0289】

【化1】

DPNCDN(cDNA合成プライマー):

5'TTTTGATCAAGCTT₃₀3' (配列番号 714)

20

アダプター1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGGGCAG3'(配列番号 715)

3'GGCCCGTCCTAG5'(配列番号 716)

アダプター2:

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAG3'(配列番号 717)

3'CGGCTCCTAG5'(配列番号 ____)

30

PCRプライマー1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (配列番号 ____)

ネスト化プライマー(NP)1:

5'TCGAGCGGCCCGGGCAGGA3' (配列番号 ____)

ネスト化プライマー(NP)2:

5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3' (配列番号 ____)

40

(抑制サブトラクションハイブリダイゼーション)

抑制サブトラクションハイブリダイゼーション(SSH)を使用して、前立腺癌において差次的に発現し得る遺伝子に対応するcDNAを同定した。このSSH反応は、6および7のGleasonスコアを有する前立腺癌患者由来のcDNAを使用した。遺伝子205P1B5は、9種の正常な組織を除いた前立腺癌プールのGleason6および7由来であった。SSH DNA配列(図1)を同定した。

【0290】

9種の正常な組織(胃、骨格筋、肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、小腸および心臓)由来のc

50

DNAを、「ドライバー」cDNAの供給源として使用し、一方、6および7のGleasonスコアを有する前立腺癌患者のプール由来のcDNAを、「テスター」cDNAの供給源として使用した。テスターcDNAおよびドライバーcDNAに対応する二重鎖cDNAを、上記のようにして、CLONTECHのPCR-Select cDNA Subtraction Kit、およびプライマーとして1ngのオリゴヌクレオチドDPNC DNを使用して、関連組織から単離されたポリ(A)⁺RNA(2μg)から合成した。第1および第2の鎖合成を、キットの使用者マニュアルプロトコル(CLONTECHプロトコル番号PT1117-1、カタログ番号K1804-1)に記載されるようにして行った。得られたcDNAを、37℃で3時間、Dpn I Iで消化した。消化されたcDNAを、フェノール/クロロホルム(1:1)で抽出し、そしてエタノールで沈殿させた。 10

【0291】

関連の組織供給源(上記を参照のこと)(400ng)由来のDpn I Iで消化したcDNA(1μl)を、5μlの水中に希釈することによって、テスターcDNAを作製した。次いで、この希釈したcDNA(2μl、160ng)を、400uのT4 DNAリガーゼ(CLONTECH)を使用して、別個のライゲーション反応で、10μlの全容量で、16℃で一晩、2μlのAdaptor 1およびAdaptor 2(10μM)へとライゲーションした。1μlの0.2M EDTAを用いて、72℃で5分間加熱して、ライゲーションを終了させた。

【0292】

第1のハイブリダイゼーションを、ドライバーcDNA(1.5μl、600ng)を、1.5μl(20ng)のAdaptor 1連結テスターcDNAおよびAdaptor 2連結テスターcDNAを含む2つのチューブのそれぞれに添加することによって実施した。4μlの最終容量で、これらのサンプルを、鉱油で覆い、MJ Researchサーマルサイクラーで、98℃で1.5分間変性し、次いで68℃で8時間ハイブリダイズさせた。次いで、2つのハイブリダイゼーション産物を、追加の新たな変性ドライバーcDNA(1μl)と混合し、そして68℃で一晩ハイブリダイズさせた。次いで、この第2のハイブリダイゼーション産物を、20mM Hepes(pH8.3)、50mM NaCl、0.2mM EDTA(200μl)中で希釈し、70℃で7分間加熱し、そして-20℃で貯蔵した。 20 30

【0293】

(SSHにより作製した遺伝子フラグメントのPCR増幅、クローニングおよび配列決定)

SSH反応から得られた遺伝子フラグメントを増幅するために、2回のPCR増幅を行った。第1のPCR反応において、希釈した最終ハイブリダイゼーション混合物(1μl)を、PCRプライマー1(10μM)、0.5μlのdNTP混合物(10μM)、2.5μlの10×反応緩衝液(CLONTECH)および0.5μlの50×Advantage cDNAポリメラーゼ混合物(CLONTECH)(1μl)に、最終容量25μlで添加した。PCR1を、以下の条件を使用して実施した。75℃で5分間、94℃で25秒、次いで、94℃で10秒、66℃で30秒、75℃で1.5分を27サイクル 40
5つの別個の第1のPCR反応を、各実験について実施した。その生成物をプールし、そして水で1:10に希釈した。第2のPCR反応について、このプールして希釈した第1のPCR反応からの1μlを、PCRプライマー1の変わりにプライマーNP1およびNP2(10μM)を使用した以外は、PCR1について使用したのと同じ反応混合物に添加した。PCR2を、94℃で10秒、68℃で30秒および72℃で1.5分の10~12サイクルを使用して実施した。このPCR生成物を、2%アガロースゲル電気泳動を使用して分析した。

【0294】

このPCR生成物を、T/Aベクタークローニングキット(Invitrogen)を使用して、pCR2.1に挿入した。形質転換したE. coliを、青/白選別およびアン 50

ピシリン選別に供した。白色コロニーを、選択して採取し、そして96ウェルプレートに配置し、そして液体培養液中で一晩増殖させた。挿入物を同定するために、PCR増幅を、PCR1の条件を使用し、NP1およびNP2をプライマーとして使用して、細菌培養液1mlについて実施した。PCR生成物を、2%アガロースゲル電気泳動を使用して分析した。

【0295】

細菌クローンを、96ウェル様式で、20%グリセロール中で貯蔵した。プラスミドDNAを調製し、配列決定し、そしてGenBank、dBestおよびNCI-CGAPデータベースの核酸相同性検索にかけた。

【0296】

10

(RT-PCR発現分析)

Gibco-BRL Superscript Preamplificationシステムを使用するオリゴ(dT)12-18のプライミングを用いて、第1の鎖cDNAを、1μgのmRNAから作製し得る。逆転写酵素と共に42℃で50分間インキュベートし、次いで、37℃で20分間、RNase H処理を行うことを含む製造者のプロトコールを使用した。この反応が完了した後、その容量を、正規化の前に、水で200μlまで増やし得た。16の異なる正常なヒト組織由来の第1の鎖cDNAを、Clontechから入手し得る。

【0297】

複数の組織由来の第1の鎖cDNAの正規化を、以下のプライマー：5'atatcgccgcgcgtcgtcgtcgaaca3' (配列番号) および5'agccacacgcagctcattgtagaagg3' (配列番号) を使用して、β-アクチンを増幅することにより実施した。第1の鎖cDNA (5μl) を、50μlの総容量 (0.4μMのプライマー、各々0.2μMのdNTP、1×PCR緩衝液 (Clontech, 10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、pH8.3) および1×Klentag DNAポリメラーゼ (Clontech) を含む) で増幅した。5μlのPCR反応物を、18サイクル、20サイクルおよび22サイクルで取り出し、そしてアガロースゲル電気泳動に使用し得る。PCRを、MJ Researchサーマルサイクラーを使用して、以下の条件下で実施した：最初の変性工程が、94℃で15秒間、続いて、94℃で15分間、65℃で2分間、72℃で5秒間を18サイクル、20サイクルおよび22サイクルであり得る。72℃での最後の伸長工程を、2分間行なった。アガロースゲル電気泳動の後、複数の組織由来の283b.p.のβ-アクチンのバンドのバンド強度を、目視検査により比較した。第1の鎖cDNAの希釈因数を、計算して、22サイクルのPCR後の全ての組織における等しいβ-アクチンバンド強度を得た。22サイクルのPCR後の全ての組織における等しいバンド強度を達成するために、3ラウンドの正規化が必要であり得る。

20

30

【0298】

205P1B5遺伝子の発現レベルを決定するために、5μlの正規化した第1の鎖cDNAを、26サイクルおよび30サイクルの増幅を使用するPCRによって分析した。半定量的発現分析を、軽いバンド強度を与えるサイクル数において、PCR産物を比較することによって達成し得る。

40

【0299】

代表的なRT-PCR発現分析を、図10に示す。RT-PCR発現分析を、複数のサンプル由来の組織のプールを使用して作製した第1の鎖cDNAについて実施した。このcDNAを、β-アクチンPCRを使用して正規化して示した。

【0300】

(実施例2：205P1B5の全長クローニング)

前立腺癌に關与する遺伝子を単離するために、Gleasonスコア6および7を有する前立腺癌患者を使用して実験を行った。

【0301】

50

遺伝子 205P1B5 を、9 の正常な組織を引いた前立腺癌プールから誘導した。SSH DNA 配列 (図 1) を、205P1B5 と呼ぶ。CHRNA2 ORF からなる cDNA クローン 205P1B5-クローン 1 を、正常な前立腺 cDNA から同定した。単一塩基対のバリエーションを、CHRNA2 配列と比較した場合、G の代わりに A を有する 760 位で同定した。

【0302】

(実施例 3: 染色体の位置決定)

染色体の位置決定は、疾患の病因における遺伝子と関連し得る。いくつかの染色体マッピングアプローチは、当該分野で利用可能であり、これには、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH)、ヒト/ハムスター放射線ハイブリッド (RH) パネル (Walther ら、1994; Nature Genetics 7: 22; Research Genetics, Huntsville Al)、ヒト-げっ歯類体細胞ハイブリッドパネル (例えば、Coriell Institute (Camden, New Jersey) から入手可能なようなもの)、および配列決定されそしてマッピングされたゲノムクローンに対する BLAST 相同性を使用するゲノムビューアー (NCBI, Bethesda, Maryland) が挙げられる。

【0303】

205P1B5 は、205P1B5 配列および NCBI BLAST ツール (ワールドワイドウェブ URL ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs) を使用して、染色体 8p21-8p12 をマッピングし得る。

【0304】

この領域は、前立腺癌に関連している (Xu ら、Am J Hum Genet 2001 Aug; 69 (2): 341-350)。

【0305】

(実施例 4: 正常な組織および患者標本における 205P1B5 の発現分析)

RT-PCR による 205P1B5 の分析を、図 10 に示す。第 1 の鎖 cDNA を、生体プール 1 (VP: 肝臓、肺および腎臓)、生体プール 2 (VP2: 脾臓、結腸および胃)、前立腺異種移植片プール (LAPC-4AD、LAPC-4AI、LAPC-9AD、LAPC-9AI)、前立腺癌プール、および癌転移プールから調製した。アクチンおよび GAPDH に対するプライマーを使用する PCR によって、正規化を行った。205P1B5 に対するプライマーを使用する半定量的 PCR を、26 サイクルおよび 30 サイクルの増幅で行った。結果は、前立腺癌プール、前立腺癌異種移植片プール、癌転移プールにおける 205P1B5 の発現を示したが、VP1 および VP2 では示さなかった。

【0306】

16 種のヒト正常組織における 205P1B5 の広範なノーザンプロット分析は、205P1B5 発現が組織制限的であることを示した (図 11)。2 μg の mRNA/レーンを有する 2 つの多重組織ノーザンプロット (Clontech) を、205P1B5 配列でプローブした。サイズ標準 (キロベース (kb)) で、サイズを示す。約 5 kb の転写産物が、前立腺および脳において検出されたが、他の正常な組織のいずれにおいても検出されなかった。約 7.5 kb の転写産物より大きな 205P1B5 転写産物のみが、肝臓で検出された。

【0307】

205P1B5 の発現を、前立腺癌患者 (PCP) から単離された 3 種の腫瘍のプールおよび正常な組織についてアッセイした (図 12)。10 μg の総 RNA/レーンを含むノーザンプロットを、205P1B5 配列でプローブした。サイズ標準 (キロベース (kb)) で、サイズを示す。205P1B5 発現は、前立腺癌プールおよび正常な前立腺において観察されたが、正常な膀胱 (NB)、正常な腎臓 (NK)、正常な結腸 (NC) においては観察されなかった。個々の前立腺癌患者標本および前立腺癌異種移植片に対するノーザンプロット分析を、図 13 に示す。RNA を、前立腺癌移植片 (LAPC-4AD、L

A P C - 4 A I、L A P C - 9 A D、L A P C - 9 A I)、前立腺癌細胞株 P C 3、正常な前立腺 (N)、前立腺腫瘍 (T) および前立腺癌患者由来の正常な隣接組織 (N a t) から抽出した。10 μ g の総 R N A / レーンを含むノーザンブロットを、205 P 1 B 5 配列でプローブした。サイズ標準 (キロベース (k b)) で、サイズを示す。結果は、試験した全ての前立腺腫瘍標本における 205 P 1 B 5 の発現を示す。発現はまた、4つの異種移植片の内の3つで観察されるが、P C 3 細胞株においては観察されない。

【0308】

正常な組織における 205 P 1 B 5 の制限発現および表 I で列挙される癌において検出される発現は、205 P 1 B 5 が、治療標的および予防標的であり、ヒト癌についての診断マーカーおよび予後マーカーであることを示す。

10

【0309】

図 15 は、癌転移得患者標本における 205 P 1 B 5 の発現を示す。R N A を、2人の異なる患者から得た、リンパ節に転移した前立腺癌から、ならびに正常な膀胱 (N B)、正常な腎臓 (N K)、正常な肺 (N L)、正常な乳房 (N B r)、正常な卵巣 (N O) および正常な脾臓 (N P a) から抽出した。10 μ g の総 R N A / レーンを含むノーザンブロットを、205 P 1 B 5 配列でプローブした。サイズ標準 (キロベース (k b)) で、サイズを示す。結果は、癌転移サンプルの両方において 205 P 1 B 5 の発現を示すが、試験した正常な組織において 205 P 1 B 5 の発現は示さない。

【0310】

(実施例 5: 原核生物系における組換え 205 P 1 B 5 の産生)

20

原核生物細胞において組換え 205 P 1 B 5 を発現させるために、全長または部分長の 205 P 1 B 5 c D N A 配列を、当該分野において公知の種々の発現ベクターのいずれか 1 つ中にクローニングし得る。205 P 1 B 5 の以下の領域の 1 つ以上を、これらの構築物中に発現させる: アミノ酸 1 ~ 529; あるいは、205 P 1 B 5、その改変体もしくはアナログ由来の任意の 8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、またはそれより多く連続するアミノ酸。

【0311】

(A. インビトロでの転写構築物および翻訳構築物)

p C R I I : R N A インサイチュ研究のための 205 P 1 B 5 のセンスおよびアンチセンスの R N A プローブを作製するために、p C R I I 構築物 (I n v i t r o g e n, C a r l s b a d C A) を作製する (これは、205 P 1 B 5 c D N A の全体またはフラグメントのいずれかをコードする)。p C R I I ベクターは、挿入物に隣接する S p 6 プロモーターおよび T 7 プロモーターを有し、R N A インサイチュハイブリダイゼーション実験におけるプローブとして使用するための 205 P 1 B 5 R N A の転写を誘導する。これらのプローブは、R N A レベルでの 205 P 1 B 5 の細胞発現および組織発現を分析するために用いられる。205 P 1 B 5 遺伝子の c D N A アミノ酸コード領域を表す、転写された 205 P 1 B 5 R N A を、205 P 1 B 5 タンパク質を合成するための T n T^{T M} C o u p l e d R e t i c u l o l y s a t e S y s t e m (P r o m e g a, C o r p., M a d i s o n, W I) のようなインビトロでの翻訳系において用いる。

30

40

【0312】

(B. 細菌構築物)

p G E X 構築物: 細菌において組換え 205 P 1 B 5 タンパク質 (これは、グルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) タンパク質に融合される) を産生するために、205 P 1 B 5 c D N A タンパク質コード配列の全てまたは一部を、p G E X - 6 P - 1 または p G E X ファミリーの任意の他の G S T - 融合ベクター (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h, P i s c a t a w a y, N J) 中にクローニングすることによって、G S T 遺伝子に融合させる。これらの構築物は、アミノ末端で融合した G S T およびカルボキシル末端の 6 つのヒスチジンエピトープ (6 $\times$ H i s) を有する組換え 205 P 1 B 5 タンパク質配列の制御された発現を可能にする。この G S T および 6 $\times$ H i

50

s タグは、適切なアフィニティーマトリクスを用いて誘導された細菌からの組換え融合タンパク質の精製を可能にし、そして抗GST抗体および抗His抗体を用いる融合タンパク質の認識を可能にする。6×Hisタグは、例えば、オープンリーディングフレーム（ORF）の3'末端のクローニングプライマーへの6つのヒスチジンコドンの添加により作製される。タンパク質切断部位（例えば、pGEX-6P-1中のPreScissionTM認識部位）を用いて、205P1B5関連タンパク質からGSTタグの切断を可能にし得る。アンピシリン耐性遺伝子およびpBR322起点は、E. coli中でのpGEXプラスミドの選択および維持を可能にする。

【0313】

pMAL構築物：細菌において、マルトース結合タンパク質（MBP）に融合される組換え205P1B5タンパク質を産生するために、205P1B5 cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一部は、pMAL-c2XベクターおよびpMAL-p2Xベクター（New England Biolabs, Beverly, MA）へとクローニングすることによりMBP遺伝子に融合される。これらの構築物は、アミノ末端で融合したMBPおよびカルボキシル末端の6×Hisエピトープタグを有する組換え205P1B5タンパク質配列の制御された発現を可能にする。このMBPおよび6×Hisタグは、適切なアフィニティーマトリクスを用いて誘導された細菌からの組換え融合タンパク質の精製を可能にし、そして抗MBP抗体および抗His抗体を用いる融合タンパク質の認識を可能にする。6×Hisエピトープタグは、3'クローニングプライマーへの6つのヒスチジンコドンの添加により作製される。Xa因子認識部位は、205P1B5からのpMALタグの切断を可能にする。pMAL-c2XベクターおよびpMAL-p2Xベクターは、それぞれ、細胞質または周辺質において組換えタンパク質を発現するように最適化される。周辺質発現は、ジスルフィド結合を有するタンパク質の折畳みを増大させる。

【0314】

pET構築物：細菌細胞において、205P1B5タンパク質を発現させるために、205P1B5 cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一部は、pETファミリーのベクター（Novagen, Madison, WI）へとクローニングされる。これらのベクターは、可溶性を増大させるタンパク質（例えば、NusAおよびチオレドキシン（Trx））、および組換えタンパク質の精製および検出を補助するエピトープタグ（例えば、6×HisおよびS-タグTM）への融合を用いておよび用いずに、細菌における組換え205P1B5タンパク質の緊密に制御された発現を可能にする。例えば、構築物を、pET NusA融合系43.1を利用して作製して、その結果、205P1B5タンパク質の領域が、NusAへのアミノ末端融合物として発現される。

【0315】

（C. 酵母構築物）

pESC構築物：組換えタンパク質の産生および機能的研究のために、酵母種Saccharomyces cerevisiaeにおいて205P1B5を発現させるために、205P1B5 cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一部を、pESCファミリーのベクター（これらの各々は、4つの選択マーカー、HIS3、TRP1、LEU2、およびURA3（Stratagene, La Jolla, CA）の内1つを含む）へとクローニングする。これらのベクターは、同じ酵母細胞中にFlagTMまたはMycエピトープタグのいずれかを含む、2つまでの異なる遺伝子またはクローン化された配列の同じプラスミドからの、制御された発現を可能にする。この系は、205P1B5のタンパク質-タンパク質相互作用を確認するために使用される。さらに、酵母における発現は、真核生物細胞において発現される場合に見出される翻訳後修飾に類似の翻訳後修飾（例えば、グリコシル化およびリン酸化）を生じる。

【0316】

pESP構築物：酵母種Saccharomyces pombeにおいて205P1B5を発現させるために、205P1B5 cDNAタンパク質コード配列の全てまたは一

部を、pESPFファミリーのベクターにクローニングする。これらのベクターは、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかで、組換えタンパク質の精製を補助するGSTへ融合される、205P1B5タンパク質配列の制御された高レベル発現を可能にする。FlagTM エピトープタグは、抗FlagTM 抗体を用いる組換えタンパク質の検出を可能にする。

【0317】

(実施例6：真核生物系における組換え205P1B5の産生)

(A. 哺乳動物構築物)

真核生物細胞において組換え205P1B5を発現させるために、205P1B5 cDNA配列の全長または部分長を、当該分野で公知の種々の発現ベクターのいずれか1つへとクローニングし得る。205P1B5の以下の領域の1つ以上が、これらの構築物において発現される：アミノ酸1～529；または205P1B5、これらの改変体もしくはアナログ由来の任意の8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30以上の連続するアミノ酸。

10

【0318】

これらの構築物は、293T細胞のような広範な種々の哺乳動物細胞のいずれか1つへとトランスフェクトされ得る。トランスフェクトされた293T細胞溶解産物は、本明細書中に記載される抗205P1B5ポリクローナル血清を用いてプローブされ得る。

【0319】

pcDNA4/HisMax構築物：哺乳動物細胞において205P1B5を発現させるために、205P1B5の、205P1B5 ORFまたはその一部を、pcDNA4/HisMax Version A (Invitrogen, Carlsbad, CA) へとクローン化した。タンパク質発現を、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターおよびSP16翻訳エンハンサーから誘導する。この組換えタンパク質は、アミノ末端に融合されたXpressTM および6つのヒスチジン (6×His) エピトープを有する。このpcDNA4/HisMaxベクターはまた、大T抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および単純なベクターレスキューのためのSV40起源と共に、mRNA安定性を増大するための、ウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列を含む。ゼオシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起源は、E. coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にする。

20

30

【0320】

pcDNA3.1/MycHis構築物：哺乳動物細胞において205P1B5を発現させるために、コンセンサスKozak翻訳開始部位を有する205P1B5の、205P1B5 ORFまたはその一部を、pcDNA3.1/MycHis Version A (Invitrogen, Carlsbad, CA) へとクローニングした。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターから誘導される。この組換えタンパク質は、カルボキシル末端に融合されたmycエピトープおよび6×Hisエピトープを有する。pcDNA3.1/MycHisベクターはまた、ラージT抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および単純なベクターレスキューのためのSV40起源と共に、mRNA安定性を増大するための、ウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列を含む。ネオマイシン耐性遺伝子を用い得る。なぜならば、ネオマイシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起源は、E. coliにおけるプラスミドの選択および維持を可能にするからである。

40

【0321】

pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO構築物：哺乳動物細胞において205P1B5を発現し、そして蛍光を用いる組換えタンパク質の検出を可能にするために、コンセンサスKozak翻訳開始部位を有する205P1B5の、205P1B5 ORFまたは

50

その一部を、p c D N A 3 . 1 / C T - G F P - T O P O (I n v i t r o g e n , C A) へとクローン化した。タンパク質発現は、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーターから誘導された。組換えタンパク質は、非侵襲的にインビボでの検出および細胞生物学研究を容易にする、カルボキシル末端に融合された緑色蛍光タンパク質 (G F P) を有する。p c D N A 3 . 1 / C T - G F P - T O P O ベクターはまた、大 T 抗原を発現する細胞株におけるエピソーム複製および単純なベクターレスキューのための S V 4 0 起源と共に、m R N A 安定性を増大するための、ウシ成長ホルモン (B G H) ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列を含む。ネオマイシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子および C o l E 1 起源は、E . c o l i におけるプラスミドの選択および維持を可能にする。アミノ末端 G F P 融合物を有するさらなる構築物は、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質の全体の長さにわたる p c D N A 3 . 1 / N T - G F P - T O P O において作製される。

10

【0322】

P A P t a g : 2 0 5 P 1 B 5 の、2 0 5 P 1 B 5 O R F、またはその一部を、p A P t a g - 5 (G e n H u n t e r C o r p . N a s h v i l l e , T N) へとクローン化する。この構築物は、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質のカルボキシル末端のアルカリホスファターゼ融合物 (これは、一方で、アミノ末端に I g G κ シグナル配列を融合している) を作製する。アミノ末端 I g G κ シグナル配列を有するアルカリホスファターゼが 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質のアミノ末端に融合されている構築物もまた作製される。得られた組換え 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質は、トランスフェクトされた哺乳動物細胞の培地への分泌に最適化され、そして 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質と相互作用するリガンドまたはレセプターのようなタンパク質を同定するために用いられ得る。タンパク質発現は、C M V プロモーターから誘導され、そして組換えタンパク質はまた、検出および精製を容易にするカルボキシル末端で融合された m y c および 6 × H i s エピトープを含む。ベクター中に存在するゼオシン耐性遺伝子は、組換えタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子は、E . c o l i 中のプラスミドの選択を可能にする。

20

【0323】

p t a g 5 : 2 0 5 P 1 B 5 の 2 0 5 P 1 B 5 O R F、またはその一部を、p T a g - 5 へとクローン化する。このベクターは、p A P t a g に類似するが、アルカリホスファターゼ融合物を含まない。この構築物は、アミノ末端 I g G κ シグナル配列、ならびに検出およびアフィニティー精製を容易にするカルボキシル末端の m y c および 6 × H i s エピトープタグを有する、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質を産生する。得られた組換え 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質を、トランスフェクトした哺乳動物細胞の培地への分泌のために最適化し、そして免疫原またはリガンドとして使用して、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質と相互作用するリガンドまたはレセプターのようなタンパク質を同定する。タンパク質発現は、C M V プロモーターから誘導される。ベクター中に存在するゼオシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子は、E . c o l i 中のプラスミドの選択を可能にする。

30

【0324】

P s e c F c : 2 0 5 P 1 B 5 の 2 0 5 P 1 B 5 O R F、またはその一部をまた、p s e c F c へとクローン化する。この p s e c F c ベクターをヒト免疫グロブリン G 1 (I g G) F c (ヒンジ領域、C H 2 領域、C H 3 領域) を p S e c T a g 2 (I n v i t r o g e n , C a l i f o r n i a) へとクローニングすることにより、アセンブリした。この構築物は、2 0 5 P 1 B 5 タンパク質のカルボキシル末端の I g G 1 F c 融合物 (一方で、これは、N 末端に I g G κ シグナル配列を融合する) を作製する。マウス I g G 1 F c 領域を利用する 2 0 5 P 1 B 5 融合物もまた用いる。得られた組換え 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質を、トランスフェクトした哺乳動物細胞の培地への分泌のために最適化し、そして免疫原としてか、または 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質と相互作用するリガンドまたはレセプターのようなタンパク質を同定するために用い得る。タンパク質発現は、C M V プロモーターから誘導される。ベクター中に存在するハイグロマイシン耐性遺伝子は、組

40

50

換えタンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子は、E. coli 中のプラスミドの選択を可能にする。

【0325】

pSRα構築物：205P1B5を発現する哺乳動物細胞株を、構成的に作製するために、205P1B5の205P1B5 ORFまたはその一部を、pSRα構築物へとクローニングした。アンホトロピックなレトロウイルスおよびエコトロピックなレトロウイルスを、それぞれ、293T-10A1パッケージング株へのpSRα構築物のトランスフェクション、またはpSRαおよびヘルパープラスミド（欠失したパッケージング配列を含む）の293細胞への共トランスフェクションにより作製する。このレトロウイルスを、種々の哺乳動物細胞株を感染させるために用いて、クローニングされた遺伝子である205P1B5の宿主細胞株への統合を生じさせる。タンパク質発現は、長い末端反復配列（LTR）に由来する。ベクター中に存在するネオマイシン耐性遺伝子は、タンパク質を発現する哺乳動物細胞の選択を可能にし、そしてアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点は、E. coli 中のプラスミドの選択および維持を可能にする。その後、このレトロウイルスベクターは、例えば、PC3細胞、NIH 3T3細胞、Tsupr1細胞、293細胞、またはrat-1細胞を用いる、種々の細胞株の感染および産生のために用いられ得る。

【0326】

さらなるpSRα構築物を、抗Flag抗体を用いる検出を可能にするために、205P1B5配列のカルボキシル末端に、FLAGTMタグのようなエピトープタグを融合して作製する。例えば、FLAGTM配列5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3'を、ORFの3'末端のクローニングプライマーに添加する。さらなるpSRα構築物を、全長205P1B5タンパク質のアミノ末端およびカルボキシル末端のGFPおよびmyc/6×His融合タンパク質の両方を産生させるために作製する。

【0327】

さらなるウイルスベクター：さらなる構築物を、ウイルス媒介送達および205P1B5の発現のために作製する。205P1B5の高レベル発現につながる高ウイルス力価は、アデノウイルスベクターおよびヘルペスアンプリコンベクターのようなウイルス送達系において達成される。205P1B5コード配列またはそのフラグメントは、PCRにより増幅され、そしてAdEasyシャトルベクター（Stratagene）へとサブクローニングされる。組換えおよびウイルスパッケージングを、アデノウイルスベクターを作製するための製造業者の指示書に従って実施する。あるいは、205P1B5コード配列またはそのフラグメントは、HSV-1ベクター（Imgenex）へとクローニングされて、ヘルペスウイルスベクターを作製する。その後、このウイルスベクターを、PC3細胞、NIH 3T3細胞、293細胞またはrat-1細胞のような種々の細胞株の感染のために用いる。

【0328】

調節された発現系：哺乳動物細胞における205P1B5の発現を制御するために、205P1B5のコード配列またはその一部を、T-Rex System（Invitrogen）、GeneSwitch System（Invitrogen）、およびtightly-regulated Ecdysone System（Stratagene）のような調節された哺乳動物発現系へとクローニングする。これらの系は、組換え205P1B5の時間依存効果および濃度依存効果の研究を可能にする。その後、これらのベクターは、PC3細胞、NIH 3T3細胞、293細胞、またはrat-1細胞のような種々の細胞株における205P1B5の発現を制御するために用いられる。

【0329】

（B. バキュロウイルス発現系）

バキュロウイルス発現系において組換え205P1B5タンパク質を産生するために、205P1B5 ORF、またはその一部を、バキュロウイルス移入ベクターであるpB1

ueBac 4.5 (Invitrogen) (これは、N末端にHisタグを提供する)へとクローニングする。具体的には、pBlueBac-205P1B5は、ヘルパープラスミドpBac-N-Blue (Invitrogen)を用いて、SF9 (Spodoptera frugiperda) 昆虫細胞へと共トランスフェクトされて、組換えバキュロウイルスを作製する (詳細については、Invitrogenの指示マニュアルを参照のこと)。次いで、バキュロウイルスを、細胞上清から収集し、そしてプラークアッセイにより精製する。

【0330】

次いで、組換え205P1B5タンパク質を、精製したバキュロウイルスを用いるHighFive昆虫細胞 (Invitrogen) の感染により、作製する。組換え205P1B5タンパク質を、抗205P1B5または抗Hisタグ抗体を用いて検出し得る。205P1B5タンパク質を、精製し、そして種々の細胞ベースのアッセイにおいて、または205P1B5に特異的なポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製するための免疫原として用い得る。

【0331】

(実施例7 抗原性プロファイルおよび二次構造)

図5、図6、図7、図8および図9は、205P1B5アミノ酸配列の5つのアミノ酸プロファイル (各評価は、Expasy分子生物学サーバのProtScaleウェブサイト (URL world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) にアクセスすることにより利用可能である) を図示する。

【0332】

これらのプロファイル: 図5、親水性、(Hopp T. P., Woods K. R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 3824-3828); 図6、ヒドロパシー、(Kyte J., Doolittle R. F., 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-132); 図7、接触可能残基の%, (Janin J., 1979 Nature 277: 491-492); 図8、平均可撓性、(Bhaskaran R., およびPonnuswamy P. K. 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255); 図9、βターン (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1: 289-294); および、必要に応じて、例えば、ProtScaleウェブサイトにあるような、当該分野で利用可能な他のもの、を用いて、205P1B5タンパク質の抗原領域を同定した。205P1B5の上記のアミノ酸プロファイルの各々を、分析のために以下のProtScaleパラメーターを用いて作製した: 1) 9のウィンドウサイズ; 2) ウィンドウセンターと比較したウィンドウエッジの100%ウェイト; および3) 0と1との間にあるように正規化されたアミノ酸プロファイル値。

【0333】

疎水性プロファイル (図5)、ヒドロパシープロファイル (図6) および接触可能残基の%のプロファイル (図7) を使用して、疎水性アミノ酸 (すなわち、ヒドロパシープロファイルおよび接触可能残基の%のプロファイルにて値が0.5より大きく、ヒドロパシープロファイルにて値が0.5より小さい) のストレッチを決定した。そのような領域は、水性環境に曝される可能性があり、タンパク質表面上に存在する可能性があり、したがって、(例えば、抗体による) 免疫認識に利用可能である。

【0334】

平均可撓性プロファイル (図8) およびβターンプロファイル (図9) は、二次構造 (例えば、βシートおよびαヘリックス) に拘束されていないアミノ酸 (すなわち、βターンプロファイルおよび平均可撓性プロファイルにて値が0.5より大きい) のストレッチを決定する。そのような領域はまた、タンパク質に対して露出した部分である可能性が高く、従って、(例えば、抗体による) 免疫認識に利用可能である。

【0335】

例えば、図 5、図 6、図 7、図 8、および／または図 9 に示されるプロファイルにより示される、205P1B5 タンパク質の抗原性配列を使用して、免疫原（ペプチド、またはペプチドをコードする核酸のいずれか）を調製して、治療用および診断用の抗 205P1B5 抗体を生成する。その免疫原は、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個、または 50 個より長く連続する、205P1B5 タンパク質由来の任意のアミノ酸、またはそれをコードする対応核酸であり得る。特に、本発明のペプチド免疫原は、以下を含み得る：図 5 の疎水性プロファイルにおいて 0.5 を超える値を有するアミノ酸位置を含む、図 2 の少なくとも 5 個から、任意の整数の増分にて 529 までのアミノ酸のペプチド領域；図 6 のヒドロパシープロファイルにおいて 0.5 未満の値を有するアミノ酸位置を含む、図 2 の少なくとも 5 個から、任意の整数の増分にて 529 までのアミノ酸のペプチド領域；図 7 の接触可能残基の % のプロファイルにおいて 0.5 を超える値を有するアミノ酸位置を含む、図 2 の少なくとも 5 個から、任意の整数の増分にて 529 までのアミノ酸のペプチド領域；図 8 の平均可撓性プロファイルにおいて 0.5 を超える値を有するアミノ酸位置を含む、図 2 の少なくとも 5 個から、任意の整数の増分にて 529 までのアミノ酸のペプチド領域；および図 9 の β -ターンプロファイルにおいて 0.5 を超える値を有するアミノ酸位置を含む、図 2 の少なくとも 5 個から、任意の整数の増分にて 529 までのアミノ酸のペプチド領域。本発明のペプチド免疫原はまた、上記のいずれかをコードする核酸を含み得る。

【0336】

本発明の免疫原、ペプチド、または核酸はすべて、ヒト単位用量形態で実施され得るか、またはヒトの生理に適合する薬学的賦形剤を含む組成物により含有され得る。

【0337】

205P1B5 の二次構造（すなわち、推定される α ヘリックス、伸長鎖、およびランダムコイルの存在および位置）は、HNN-Hierarchical Neural Network 法（Guernieur, 1997, world wide web URL /pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html）（Expasy 分子生物学サーバ（world wide web URL: expasy.ch/tools/）からアクセスされる）を使用して、一次アミノ酸配列から推定される。この分析は、205P1B5 が、41.40 % の α ヘリックス、12.67 % の伸長鎖、および 45.94 % のランダムコイルから構成されることを示す（図 14A）。

【0338】

205P1B5 中の膜貫通ドメインの潜在的な存在についての分析を、Expasy 分子生物学サーバ（world wide web URL expasy.ch/tools/）からアクセスされる種々の膜貫通推定アルゴリズムを使用して実行した。これらのプログラムは、205P1B5 中の 5 つの膜貫通ドメインの存在を推定し、このことは、G タンパク質共役レセプターの構造と一致する。図 14 に図示されるのは、TMpred 推定プログラムを使用した分析の結果（図 14B）および TMHMM 推定プログラム使用した分析の結果（図 14C）であり、5 つの膜貫通ドメインの位置を示す。各プログラムの結果（すなわち、膜貫通ドメインをコードするアミノ酸）を、表 XXI にまとめる。

【0339】

（実施例 8：205P1B5 ポリクローナル抗体の生成）

ポリクローナル抗体を、例えば、免疫因子および（所望される場合は）アジュバントの 1 回以上の注射によって、哺乳動物において惹起し得る。代表的には、その免疫因子および／またはアジュバントを、複数回の皮下注射または腹腔内注射によって、その哺乳動物中に注射する。全長 205P1B5 タンパク質で免疫することに加えて、アミノ酸配列分析に基づいて、抗原性でありかつ免疫される宿主の免疫系による認識に利用可能である特性を備える免疫原の設計において、コンピュータアルゴリズムが使用される（「抗原性プ

ロファイル」と題する実施例を参照のこと）。そのような領域は、疎水性であり、可撓性であり、 β -ターン立体構造の状態であり、そしてそのタンパク質の表面上に露出されていると推定される（例えば、205P1B5のそのような領域を示すアミノ酸プロファイルについて、図5、図6、図7、図8、または図9を参照のこと）。

【0340】

例えば、205P1B5配列の疎水性、可撓性、 β -ターン領域（例えば、アミノ酸23～63）をコードする、205P1B5細菌組換え融合タンパク質または205P1B5細菌組換え融合ペプチドを、New Zealand白色ウサギにおいてポリクローナル抗体を生成するための抗原として使用する。免疫される哺乳動物において免疫原性であることが公知のタンパク質に、その免疫因子を結合体化することが有用である。そのような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、およびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、205P1B5のアミノ酸23～63をコードするペプチドを、KLHに結合体化し、ウサギを免疫するために使用する。あるいは、その免疫因子は、205P1B5タンパク質、そのアナログまたは融合タンパク質のすべてもしくは一部を含み得る。例えば、205P1B5アミノ酸配列を、当該分野で周知の種々の融合タンパク質パートナー（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）タグ化融合タンパク質およびHISタグ化融合タンパク質）のいずれか1つに、組換えDNA技術を使用して融合し得る。そのような融合タンパク質を、適切な親和性マトリックスを使用して誘導した細菌から精製する。

10

20

【0341】

1つの実施形態において、205P1B5の推定される第2の細胞外ループ（アミノ酸27～271）をコードするGST-融合タンパク質を、生成し、精製し、そして免疫原として使用する（「原核生物系における205P1B5の生成」と題する節を参照のこと）。使用し得る他の組換え細菌融合タンパク質としては、マルトース結合タンパク質、LacZ、チオレドキシン、NusA、または免疫グロブリン定常領域が挙げられる（「原核生物系における205P1B5の生成」と題する節、ならびにCurrent Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubelら編、1995; Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N., およびLedbetter, L. (1991) J. Exp. Med. 174, 561～566を参照のこと）。

30

【0342】

細菌由来融合タンパク質に加えて、哺乳動物により発現されるタンパク質抗原もまた、使用する。これらの抗原を、哺乳動物発現ベクター（例えば、Tag5融合ベクターおよびFc融合ベクター）から発現させる（「真核生物系における組換え205P1B5の生成」と題する節を参照のこと）。これらの抗原は、ネイティブタンパク質で見出される翻訳後修飾（例えば、グリコシル化）を保持する。1つの実施形態において、アミノ酸27～271を、Tag5哺乳動物分泌ベクター中にクローニングする。その組換えタンパク質を、その組換えベクターを安定に発現する293T細胞の組織培養上清から、金属キレートクロマトグラフィーによって精製する。その後、精製Tag5 205P1B5タンパク質を、免疫原として使用する。

40

【0343】

この免疫プロトコルの間、宿主動物の免疫応答を増強するアジュバント中に抗原を混合または乳濁することが、有用である。アジュバントの例としては、完全フロイントアジュバント（CFA）およびMPL-TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0344】

代表的プロトコルにおいて、ウサギに、完全フロイントアジュバント（CFA）中に混合したKLHに結合体化した、200 μ gまで（代表的には、100～200 μ g）の融合

50

タンパク質または融合ペプチドを、まず皮下免疫する。その後、ウサギに、不完全フロイントアジュバント（IFA）中の200 μ gまで（代表的には、100～200 μ g）の免疫原を、2週間ごとに皮下注射する。各免疫の約7～10日後に、試験採血を採取し、そしてELISAにより抗血清の力価をモニターするために使用する。

【0345】

免疫血清（例えば、アミノ酸27～271をコードするTag5 205P1B5による免疫で誘導されたウサギ血清）の反応性および特異性を試験するために、全長205P1B5 cDNAを、pCDNA3.1 myc-his発現ベクター（Invitrogen）中にクローニングする（「真核生物系における組換え205P1B5の生成」と題する実施例を参照のこと）。293T細胞中にその構築物をトランスフェクションした後、細胞溶解物を、抗205P1B5血清および抗His抗体（Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA）でプローブし、ウェスタンブロット技術を使用して変性205P1B5タンパク質に対する特異的反応性を決定する。293T細胞および他の組換え205P1B5発現細胞の免疫沈降分析およびフローサイトメトリー分析により、その抗血清によるネイティブタンパク質の認識を測定する。さらに、205P1B5を内因的に発現する細胞を使用して、ウェスタンブロット、免疫沈降、蛍光顕微鏡、およびフローサイトメトリー技術を実行して、特異性を試験する。

10

【0346】

Tag5 205P1B5免疫化ウサギ由来の抗血清を、Affigelマトリックス（BioRad, Hercules, Calif.）に共有結合したTag5抗原から構成されるカラムを通すことによって、親和性精製する。その後、その血清を、プロテインG親和性クロマトグラフィーにより精製して、IgG画分を単離する。融合タンパク質（例えば、GST融合タンパク質およびMBP融合タンパク質）で免疫したウサギ由来の血清を、融合パートナーを単独でかまたは不適切な融合タンパク質の状況で含む親和性カラムを通すことにより、融合パートナー配列に対して反応性である抗体を除去することによって精製する。他のHisタグ化抗原およびペプチド免疫ウサギ由来の血清、ならびに融合パートナー除去血清を、もとのタンパク質免疫原または遊離ペプチドから構成されるカラムマトリックスを通すことによって親和性精製する。

20

【0347】

（実施例9：205P1B5モノクローナル抗体（mAb）の生成）

30

1つの実施形態において、205P1B5に対する治療mAbは、205P1B5の生物学的機能を破壊または調節するタンパク質エピトープと反応するmAb、例えば、その生物学的活性を媒介するかまたは関与するリガンドもしくはタンパク質との相互作用を破壊するタンパク質エピトープと反応するmAbを包含する。治療mAbはまた、細胞表面上に露出された205P1B5のエピトープに特異的に結合し、従ってmAb-毒素結合体を標的する際に有用である、mAbを包含する。そのようなmAbの生成のための免疫原としては、205P1B5タンパク質全体をコードするかもしくは含むように設計された免疫原、またはアミノ酸配列のコンピューター分析から抗原性であると推定される205P1B5タンパク質領域をコードするかもしくは含むように設計された免疫原が挙げられる（例えば、図5、図6、図7、図8、または図9、および「抗原性プロファイル」と題する実施例を参照のこと）。免疫原としては、ペプチド、組換え細菌タンパク質、ならびに哺乳動物で発現されるTag5タンパク質、ならびにヒトIgG Fc融合タンパク質およびマウスIgG Fc融合タンパク質が挙げられる。さらに、高レベルの205P1B5を発現する細胞（例えば、293T-205P1B5細胞）を使用して、マウスを免疫する。

40

【0348】

205P1B5に対するmAbを生成するために、マウスに、代表的には、完全フロイントアジュバント中に混合した10～50 μ gのタンパク質免疫原または10⁷個の205P1B5発現細胞を、まず腹腔内（IP）免疫する。その後、マウスに、代表的には、不完全フロイントアジュバント中に混合した10～50 μ gのタンパク質免疫原または10

50

⁷ 個の細胞を、2～4週間ごとに腹腔内（I P）免疫する。あるいは、M P L－T D M アジュバントを、免疫に使用する。上記のタンパク質ベースの免疫ストラテジーおよび細胞ベースの免疫ストラテジーに加えて、2 0 5 P 1 B 5 配列をコードする哺乳動物発現ベクターを使用してプラスミド D N A の直接注射によりマウスを免疫する、D N A ベースの免疫プロトコルを使用する。例えば、2 0 5 P 1 B 5 の推定第2細胞外ループであるアミノ酸 2 7 ～2 7 1 を、T a g 5 哺乳動物分泌ベクター中にクローニングし、そしてその組換えベクターを免疫原として使用する。別の例において、アミノ酸 2 3 ～6 3 （配列分析から、抗原性であると推定される）（例えば、図5、図6、図7、図8、または図9を参照のこと）を、F c－融合分泌ベクター中にクローニングする。そのベクターにおいて、2 0 5 P 1 B 5 配列がアミノ末端で I g K リーダー配列に融合しており、カルボキシ末端でヒト I g G F c 領域のコード配列に融合している。その後、この組換えベクターを免疫原として使用する。プラスミド免疫プロトコルを、同じベクターから発現された精製タンパク質と、2 0 5 P 1 B 5 を発現する細胞と組み合わせて、使用する。

10

【0349】

その免疫プロトコルの間に、試験採血を、注射の7～10日後に行って、その免疫応答の力価および特異性をモニターする。一旦適切な反応性および特異性を、E L I S A、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、蛍光顕微鏡、およびフローサイトメトリー分析により決定して得ると、融合物およびハイブリドーマの生成を、当該分野で周知の確立された手順（例えば、H a r l o w および L a n e、1 9 8 8 を参照のこと）を用いて実行する。

【0350】

2 0 5 P 1 B 5 モノクローナル抗体を生成するための1つの実施形態において、アミノ酸 2 7 ～2 7 1 をコードする T a g 5－2 0 5 P 1 B 5 抗原を、発現させ、そして安定にトランスフェクトした 2 9 3 T 細胞から精製する。B a l b C マウスに、最初、完全フロイントアジュバント中に混合した 2 5 μ g の T a g 5 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質で腹腔内免疫する。その後、マウスに、合計3回の免疫のために、不完全フロイントアジュバント中に混合した 2 5 μ g の抗原で2週間ごとに免疫する。T a g 5 抗原を使用する E L I S A によって、免疫したマウス由来の血清の力価を決定する。全長 2 0 5 P 1 B 5 タンパク質に対する血清の反応性および特異性を、2 0 5 P 1 B 5 c D N A をコードする発現ベクターでトランスフェクトした 2 9 3 T 細胞を使用して、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、およびフローサイトメトリーによってモニターする（例えば、「真核生物系における組換え 2 0 5 P 1 B 5 の生成」と題する実施例を参照のこと）。他の組換え 2 0 5 P 1 B 5 発現細胞または 2 0 5 P 1 B 5 を内因的に発現する細胞もまた、使用する。最強の反応性を示すマウスを、休息させ、そして P B S 中にある T a g 5 抗原で最終注射し、そして4日後に屠殺する。屠殺したマウスの脾臓を採取し、そして標準的手順（H a r l o w および L a n e、1 9 8 8）を使用して S P O / 2 ミエローマ細胞に融合させる。H A T 選択した増殖ウェル由来の上清を、E L I S A、ウェスタンブロット、免疫沈降、蛍光顕微鏡、およびフローサイトメトリーによってスクリーニングして、2 0 5 P 1 B 5 特異的抗体生成クローンを同定する。

20

30

【0351】

2 0 5 P 1 B 5 モノクローナル抗体の結合親和性を、標準的技術を使用して決定する。親和性測定によって、エピトープ結合に対する抗体の強度を定量し、そしてその親和性測定を使用して、どの 2 0 5 P 1 B 5 モノクローナル抗体が、当業者により認識されるような診断用途または治療用途のために好ましいかを規定するのを補助する。B I A c o r e システム（U p p s a l a, S w e d e n）は、結合親和性を決定するために好ましい方法である。この B I A c o r e システムは、表面プラスモン共鳴（S P R, W e l f o r d K. 1 9 9 1, O p t. Q u a n t. E l e c t. 2 3 : 1 ; M o r t o n および M y s z k a, 1 9 9 8, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 9 5 : 2 6 8）を使用して、リアルタイムで生体分子相互作用をモニターする。B I A c o r e 分析は、会合速度定数、解離速度定数、平衡解離定数、および親和性定数を簡便に生じる。

40

【0352】

50

(実施例10：HLAクラスI結合アッセイおよびHLAクラスII結合アッセイ)
精製HLA分子を使用するHLAクラスI結合アッセイおよびHLAクラスII結合アッセイを、開示されたプロトコル（例えば、PCT公開WO94/20127およびWO94/03205；Sidneyら、Current Protocols in Immunology 18.3.1（1998）；Sidneyら、J. Immunol. 154：247（1995）；Setteら、Mol. Immunol. 31：813（1994））に従って、実施する。簡単に述べると、記載されるように、精製MHC分子（5～500nM）を、種々の非標識ペプチドインヒビターおよび1～10nMの¹²⁵I放射標識プローブペプチドとともにインキュベートする。インキュベーション後、MHC-ペプチド複合体を、ゲル濾過により遊離ペプチドから分離し、そして結合ペプチドの画分を、測定する。代表的には、予備実験において、各MHC調製物を、一定量の放射標識ペプチドの存在下で力価決定して、全放射能のうちの10～20%を結合するのに必要なHLA分子の濃度を決定する。その後のすべての阻害アッセイおよび直接結合アッセイを、これらのHLA濃度を使用して実施する。

【0353】

これらの条件下では[標識]<[HLA]かつ $IC_{50} \geq [HLA]$ であるので、測定した IC_{50} 値は、真の K_D 値の妥当な近似である。ペプチドインヒビターを、代表的には、120μg/ml～1.2ng/mlの範囲の濃度で試験し、そして完全に独立した2つ～4つの実験において試験する。種々の実験において得られたデータの比較を可能にするために、相対的結合数を、各ペプチドについて計算する。この計算は、阻害についてのポジティブコントロールの IC_{50} を、試験した各ペプチドについての IC_{50} （代表的には、放射標識プローブペプチドの非標識バージョン）で除算することによる。データベース目的のため、そして実験間比較のために、相対的結合値を集計する。これらの値を、その後、 IC_{50} nM値へと変換して戻し得る。この変換は、阻害についてのポジティブコントロールの IC_{50} nMを、目的のペプチドの相対的結合によって除算することによる。このデータ集計方法は、正確であり、そして異なる日に試験したペプチドまたは異なるロットの精製MHCを用いて試験したペプチドの比較について、一貫性がある。

【0354】

上記に概略したような結合アッセイを使用して、HLAスーパーモチーフ保有ペプチドおよび／またはHLAモチーフ保有ペプチドを分析し得る。

【0355】

(実施例11：HLAスーパーモチーフ保有CTL候補エピトープおよびHLAモチーフ保有CTL候補エピトープの同定)

本発明のHLAワクチン組成物は、マルチエピトープを含み得る。そのマルチエピトープは、広範な集団範囲を達成するように、複数のHLAスーパーモチーフまたはHLAモチーフを含み得る。本実施例は、そのようなワクチン組成物中に含めるための、スーパーモチーフ保有エピトープおよびモチーフ保有エピトープの同定および確認を示す。集団範囲の計算を、下記のストラテジーを使用して実施する。

【0356】

(スーパーモチーフ保有エピトープおよび／またはモチーフ保有エピトープの同定のためのコンピューター検索およびアルゴリズム)

「抗原性プロフィール」と題する実施例および表V～XVIIにおいてモチーフ保有ペプチド配列を同定するために実施する検索は、図2および図3に示される205P1B5の遺伝子産物からのタンパク質配列データを使用する。

【0357】

HLAクラスIスーパーモチーフもしくはHLAクラスIモチーフまたはHLAクラスIIスーパーモチーフもしくはHLAクラスIIモチーフを保有するエピトープについてのコンピューター検索を、以下のように実施する。翻訳される全ての205P1B5タンパク質配列を、文字列検索ソフトウェアプログラムを使用して分析して、適切なHLA結合モチーフを含む可能性のあるペプチド配列を同定する；そのようなプログラムを、公知の

モチーフ／スーパーモチーフの開示を考慮して、当該分野における情報に従って容易に作成する。さらに、そのような計算は、頭でなし得る。

【0358】

同定したA2スーパーモチーフ配列、A3スーパーモチーフ配列、およびDRスーパーモチーフ配列を、多項アルゴリズムを使用してスコア付けして、それらのモチーフが、特定のHLAクラスI分子またはHLAクラスII分子に結合する能力を推測する。これらの多項アルゴリズムは、種々の位置にある異なるアミノ酸の影響を考慮する。これらの多項アルゴリズムは、ペプチド-HLA分子相互作用の全親和性（または ΔG ）は、

$$「\Delta G」=a_{1i} \times a_{2i} \times a_{3i} \dots \times a_{ni}$$

の型の線形多項関数として近似し得るという前提に本質的に基づき、ここで、 a_{ji} は、 n アミノ酸のペプチド配列に沿って所定の位置（ i ）にある所定のアミノ酸（ j ）の存在の効果を示す係数である。この方法の重大な仮定は、各位置での効果は、互いに本質的に独立している（すなわち、個々の側鎖の独立した結合である）ということである。残基 j が、そのペプチド中の位置 i に存在する場合、そのペプチドの残りの配列とは関係なく、そのペプチドの結合の自由エネルギーに一定量 j_i を寄与すると仮定する。

10

【0359】

特定のアルゴリズム係数の誘導方法は、Gulukotaraら、J. Mol. Biol. 267:1258~126, 1997に記載されている（Sidneyら、Human Immunol. 45:79~93, 1996；およびSouthwoodら、J. Immunol. 160:3363~3373, 1998もまた参照のこと）。簡単に述べると、全ての i 位置について、アンカーおよび非アンカーも同様に、 j を保有する全てのペプチドの平均相対結合（ARB）の相乗平均を、その群の残りに対して計算し、そして j_i の推定値として使用する。クラスIIペプチドについて、多重アライメントが可能である場合、反復手順に従って、最高スコアリングアライメントのみを利用する。試験セット中の所定のペプチドのアルゴリズムスコアを計算するために、そのペプチドの配列に対応するARB値を乗算する。この積が、選択した閾値を超える場合、そのペプチドは結合すると推定される。適切な閾値を、望ましい推定のストリンジェンシーの程度の関数として選択する。

20

【0360】

（HLA-A2スーパータイプ交叉反応性ペプチドの選択）

30

205P1B5由来の完全タンパク質配列を、モチーフ同定ソフトウェアを利用してスクランして、HLA-A2スーパーモチーフ主要アンカー特異性を含む、8マー配列、9マー配列、10マー配列、および11マー配列を同定する。代表的には、次いで、これらの配列を、上記のプロトコルを使用してスコア付けし、そして正のスコアを持つ配列に対応するペプチドを合成し、これらのインビトロでの精製HLA-A*0201分子を結合する能力について試験する（HLA-A*0201は、プロトタイプA2スーパータイプ分子とみなされる）。

【0361】

次いで、これらのペプチドを、さらなるA2スーパータイプ分子（A*0202、A*0203、A*0206、およびA*6802）に結合する能力について試験する。試験した5つのA2スーパータイプ対立遺伝子のうちの少なくとも3つに結合するペプチドを、代表的には、A2スーパータイプ交叉反応性結合体と見なす。好ましいペプチドは、3つ以上のHLA-A2スーパータイプ分子に500nM以下の親和性で結合する。

40

【0362】

（HLA-A3スーパーモチーフ保有エピトープの選択）

上記でスクランする205P1B5タンパク質配列を、HLA-A3スーパーモチーフ主要アンカーを有するペプチドの存在についても試験する。次いで、HLA-A3スーパーモチーフ保有配列に対応するペプチドを合成し、そしてHLA-A*0301分子およびHLA-A*1101分子（最も有力な2つのA3スーパータイプ対立遺伝子によりコードされる分子）への結合について試験する。次いで、 ≤ 500 nM、しばしば ≤ 200 n

50

Mの結合親和性でその2つの対立遺伝子のうちの少なくとも1つに結合するペプチドを、他の一般的なA3スーパータイプ対立遺伝子（例えば、A*3101、A*3301およびA*6801）に対する結合交叉反応性について試験して、試験する5つのHLA-A3スーパータイプ分子のうちの少なくとも3つに結合し得る分子を同定する。

【0363】

（HLA-B7スーパーモチーフ保有エピトープの選択）

205P1B5タンパク質を、HLA-B7スーパーモチーフを含む、8マーペプチド、9マーペプチド、10マーペプチド、または11マーペプチドの存在についても分析する。対応するペプチドを合成し、そしてHLA-B*0702（最も一般的なB7スーパータイプ対立遺伝子（すなわち、プロトタイプB7スーパータイプ対立遺伝子）によりコードされる分子）への結合について試験する。IC₅₀ ≤ 500 nMでB*0702を結合するペプチドを、標準的方法を使用して同定する。次いで、これらのペプチドを、他の一般的なB7スーパータイプ分子（例えば、B*3501、B*5101、B*5301およびB*5401）への結合について試験する。それによって、試験する5つのB7スーパータイプ対立遺伝子のうちの3つ以上に結合し得るペプチドを、同定する。

10

【0364】

（A1モチーフ保有エピトープおよびA24モチーフ保有エピトープの選択）

集団範囲をさらに増大するために、HLA-A1エピトープおよびHLA-A24エピトープもまた、ワクチン組成物中に組み込み得る。205P1B5タンパク質の分析もまた、HLA-A1モチーフ含有配列およびHLA-A24モチーフ含有配列を同定するために実施し得る。

20

【0365】

他のモチーフおよび／またはスーパーモチーフを保有する、高親和性結合エピトープおよび／または交叉反応性結合エピトープを、類似する方法論を使用して同定する。

【0366】

（実施例12：免疫原性の確認）

本明細書中に記載されるように同定される交叉反応性候補CTL A2スーパーモチーフ保有ペプチドを、インビトロでの免疫原性を確認するために選択する。以下の方法論を使用して確認を実施する。

【0367】

（細胞スクリーニングのための標的細胞株）

HLA-A2.1遺伝子を、HLA-A、HLA-B、HLA-Cヌル変異体ヒトBリンパ芽球細胞株である721.221に移入することによって生成した、221A2.1細胞株を、HLA-A2.1拘束CTLの活性を測定するためのペプチド負荷標的として使用する。この細胞株を、抗生物質、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、および10%（v/v）熱非働化FCSを補充したRPMI-1640培地中で増殖させる。目的の抗原を発現する細胞、または目的の抗原をコードする遺伝子を含むトランスフェクタントを、ペプチド特異的CTLが内因性抗原を認識する能力を確認するための標的細胞として使用し得る。

30

【0368】

（一次CTL誘導培養）

（樹状細胞（DC）の産生） PBMCを、30 μg/mlのDNaseを含むRPMI中で解凍し、完全培地（RPMI-1640 + 5% ABヒト血清、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミンおよびペニシリン／ストレプトマイシン）で2回洗浄し、この完全培地中に再懸濁する。その単球を、6ウェルプレート中に10 × 10⁶ PBMC／ウェルでプレートすることによって精製する。37℃にて2時間後、そのプレートを穏やかに振盪し、その上清を吸引することによって、非接着細胞を除去する。ウェルを、3 mlのRPMIで合計3回洗浄して、非接着細胞および緩く接着する細胞のほとんどを除去する。その後、50 ng/mlのGM-CSFおよび1,000 U/mlのIL-4を含む3 mlの完全培地を、各ウェルに添加する。6日目に、75 ng/mlにてT

40

50

NF α を、DCに添加し、7日目に、その細胞を、CTL誘導培養に使用する。

【0369】

(DCおよびペプチドを用いてのCTLの誘導) CD8⁺T細胞を、Dyna1免疫磁気ビーズ(Dynabeads(登録商標)M-450)およびdetachabead(登録商標)試薬を用いるポジティブ選択によって単離する。代表的には、約 200×10^6 個 $\sim 250 \times 10^6$ 個のPBMCを、 24×10^6 個のCD8⁺T細胞(48ウェルプレート培養のために十分である)を得るために処理する。簡単に述べると、PBMCを、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ のDNaseを含むRPMI中で解凍し、そして1%ヒトAB血清を含むPBSで1回洗浄し、そしてPBS/1%AB血清中に、濃度 20×10^6 細胞/mlで再懸濁する。磁気ビーズを、PBS/AB血清を用いて3回洗浄し、細胞($140 \mu\text{l}$ ビーズ/ 20×10^6 細胞)に添加し、そして継続して混合しながら4℃で1時間インキュベートする。そのビーズおよび細胞を、PBS/AB血清を用いて4回洗浄して、非接着細胞を除去し、そして $100 \mu\text{l}/\text{ml}$ detachabead(登録商標)試薬および $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ DNaseを含むPBS/AB血清中に、 100×10^6 細胞/ml(もとの細胞数に基づく)で懸濁する。その混合物を、継続して混合しながら室温にて1時間インキュベートする。そのビーズを、PBS/AB/DNaseで再び洗浄し、CD8⁺T細胞を収集する。DCを収集し、そして 1300rpm にて5~7分間遠心分離し、1%BSAを含むPBSで1回洗浄し、計数し、そして $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の β_2 -ミクログロブリンの存在下で、20℃で4時間、細胞濃度 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ で、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドを用いてパルスする。その後、そのDCを照射(4, 200 rad)し、培地で1回洗浄し、そして再び計数する。

【0370】

(誘導培養の設定) 0.25mlのサイトカイン産生DC(1×10^5 細胞/ml)を、 $10 \text{ng}/\text{ml}$ のIL-7の存在下で、48ウェルプレートの各ウェル中で0.25mlのCD8⁺T細胞(2×10^6 細胞/ml)とともに共培養する。翌日、組換えヒトIL-10を、最終濃度 $10 \text{ng}/\text{ml}$ で添加し、48時間後に、ヒトIL-2を、 $10 \text{IU}/\text{ml}$ で添加する。

【0371】

(ペプチドでパルスした接着細胞を用いる、誘導培養物の再刺激) 一次誘導の7日後および14日後に、その細胞を、ペプチドでパルスした接着細胞を用いて再刺激する。そのPBMCを解凍し、RPMIおよびDNaseで2回洗浄する。その細胞を、 5×10^6 細胞/mlで再懸濁し、そして約4200 radで照射する。PBMCを、1ウェルあたり0.5ml完全培地中 2×10^6 にてプレートし、37℃で2時間インキュベートする。そのプレートを穏やかにタッピングすることによってRPMIで2回洗浄して非接着細胞を除去し、0.25mlのRPMI/5%AB/ウェル中 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の β_2 ミクログロブリンの存在下で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドで接着細胞を、37℃で2時間パルスする。各ウェルからペプチド溶液を吸引し、そのウェルを、RPMIで1回洗浄する。その培地のほとんどを、誘導培養物(CD8⁺細胞)から吸引し、そして新鮮な培地で0.5mlにする。その後、その細胞を、ペプチドでパルスした接着細胞を含むウェルへと移す。24時間後に、組換えヒトIL-10を、最終濃度 $10 \text{ng}/\text{ml}$ で添加し、そして翌日および2~3日後に再度、組換えヒトIL-2を、 $50 \text{IU}/\text{ml}$ で添加する(Tsaiら、Critical Reviews in Immunology 18(1~2): 65~75, 1998)。7日後に、その培養物を、 ^{51}Cr 放出アッセイにおいてCTL活性についてアッセイする。いくつかの実験において、その培養物を、2回目の再刺激の際にインサイチュIFN γ ELISAにおけるペプチド特異的認識についてアッセイし、7日後に、内因的認識のアッセイを行う。増殖後、並列比較のために両方のアッセイにおいて活性を測定する。

【0372】

(^{51}Cr 放出によるCTL溶解活性の測定)

2回目の再刺激の7日後、単一のE:Tにて個々のウェルをアッセイすることによって、

標準的（５時間） ^{51}Cr 放出アッセイにおいて細胞傷害性を測定する。細胞を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプチドとともに 37°C で一晩インキュベートすることによって、ペプチドでパルスした標的を調製する。

【0373】

接着標的細胞を、トリプシン－EDTAを用いて培養フラスコから除去する。標的細胞を、 $200\mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr クロム酸ナトリウム（Dupont, Wilmington, DE）を用いて 37°C で１時間標識する。標識した標的細胞を、 1ml あたり 10^6 で再懸濁し、K562細胞（非特異的溶解を減少するために使用されるNK感受性赤芽球株）を用いて濃度 $3.3\times 10^6/\text{ml}$ で1:10希釈する。標的細胞（ $100\mu\text{l}$ ）およびエフェクター（ $100\mu\text{l}$ ）を、96ウェル丸底プレート中にプレートし、そして 37°C で5時間インキュベートする。その時、 $100\mu\text{l}$ の上清を各ウェルから収集し、そして式：

$$\left[(\text{試験サンプルのcpm} - \text{自然発生}^{51}\text{Cr放出サンプルのcpm}) / (\text{最大}^{51}\text{Cr放出サンプルのcpm} - \text{自然発生}^{51}\text{Cr放出サンプルのcpm}) \right] \times 100$$

に従って、溶解パーセントを決定する。

【0374】

最大放出および自然発生放出を、それぞれ、標識標的を、1%Triton X-100および培地単独とともにインキュベートすることによって、決定する。特異性溶解（サブブルーバックグラウンド）が個々のウェルの場合10%以上であり、増殖した培養物をアッセイする場合には最高の2つのE:T比にて15%以上である培養物として、ポジティブ培養物を規定する。

【0375】

（ペプチド特異的かつ内因性認識の指標としてのヒトIFN γ 生成のインサイチュ測定）Immunolon 2プレートを、マウス抗ヒトIFN γ モノクローナル抗体（ $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 0.1M NaHCO₃、pH 8.2）を使用して、 4°C にて一晩コーティングする。このプレートをCa²⁺、Mg²⁺非含有PBS/0.05% Tween 20で洗浄し、PBS/10% FCSを使用して2時間ブロッキングし、その後、CTL（ $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ ）および標的（ $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ ）を各ウェルに添加し、標準物質およびブランクのためのウェルは、（培地のみを入れ）空にしておく。標的細胞（ペプチドパルスまたは内因性標的いずれか）を 1×10^6 細胞/ ml の濃度にて使用する。プレートを、5% CO₂により 37°C にて48時間インキュベートする。

【0376】

組換えヒトIFN- γ を、 400pg または $1200\text{pg}/100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ にて開始して標準ウェルに添加し、プレートを 37°C にて2時間インキュベートする。プレートを洗浄し、 $100\mu\text{l}$ のビオチン化マウス抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体（PBS/3% FCS/0.05% Tween 20中に $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加し、室温にて2時間インキュベートする。再び洗浄した後、 $100\mu\text{l}$ のHRPーストレプトアビジン（1:4000）を添加し、プレートを室温にて1時間インキュベートする。次いで、このプレートを洗浄緩衝液で6回洗浄し、 $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ の発色溶液（TMB 1:1）を添加し、プレートを5～15分間、発色させる。 $50\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 1M H₃PO₄を使用して反応を停止し、OD₄₅₀にて読み取る。少なくとも 50pg のIFN- γ / ウェル が、バックグラウンドより上で測定されかつ発現のバックグラウンドレベルの2倍である場合、培養をポジティブとみなす。

【0377】

（CTL発現）

ペプチドパルスした標的および／または腫瘍標的に対する特異的溶解活性を示す培養物を、抗CD3とともに2週間にわたり増殖させる。簡潔には、 5×10^4 CD8⁺細胞を、以下を含むT25フラスコに添加する：RPMI-1640（10%（v/v）ヒトAB血清、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、 $25\mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール、L-グルタミンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを含有する） 1ml 中、 1×1

0^6 照射 (4, 200 ラド) P B M C (自己または同種異系) / m l、 2×10^5 照射 (8, 000 ラド) E B V 形質転換細胞 / m l、および $30 \text{ ng} / \text{ml}$ の O K T 3 (抗 C D 3)。組換えヒト I L 2 を $200 \text{ IU} / \text{ml}$ の最終濃度にて 24 時間後に添加し、その後 3 日間毎に、 $50 \text{ IU} / \text{ml}$ にて新たな培地を加える。細胞濃度が $1 \times 10^6 / \text{ml}$ を超えたら細胞を分け、培養物を、 $^5 \text{ } ^1 \text{ Cr}$ 放出アッセイにて 30 : 1、10 : 1、3 : 1 および 1 : 1 の E : T 比で 13 ~ 15 日の間にアッセイするか、または増殖前と同じ標的を使用してインサイチュ I F N γ アッセイにて $1 \times 10^6 / \text{ml}$ でアッセイする。

【0378】

培養物を、以下の通り、抗 C D 3⁺ の非存在下で増殖させる。ペプチドおよび内因性標的に対する特異的溶解活性を示す培養物を選択し、 5×10^4 C D 8⁺ 細胞を、以下を含む T 25 フラスコに添加する：R P M I - 1 6 4 0 (10% (v / v) ヒト A B 血清、非必須 A A、ピルビン酸ナトリウム、25 mM 2-ME、L-グルタミンおよびゲンタマイシンを含有する) 1 ml 中、 1×10^6 自己 P B M C / m l ($10 \mu \text{g} / \text{ml}$ ペプチドを用いて 37℃ にて 2 時間ペプチドパルスし、かつ照射 (4, 200 ラド) した) ; 2×10^5 照射 (8, 000 ラド) E B V 形質転換細胞 / m l。 10

【0379】

(A 2 スーパーモチーフ保有ペプチドの免疫原性)

A 2 スーパーモチーフ交叉反応性結合ペプチドを、正常個体におけるペプチド特異的 C T L を誘導する能力について細胞アッセイにて試験する。この分析において、ペプチドは、代表的には、少なくとも個体におけるペプチド特異的 C T L を誘導し、好ましくは、内因的に発現されたペプチドもまた認識する場合、エピトープであると考えられる。 20

【0380】

205 P 1 B 5 を発現する腫瘍を保有する患者から単離された P B M C を使用して、免疫原性もまた確認し得る。簡潔には、P B M C を患者から単離し、ペプチドパルスした単球を用いて再刺激し、ペプチドパルスした標的細胞および抗原を内因的に発現するトランスフェクト細胞を認識する能力についてアッセイする。

【0381】

(A* 03 / A 1 1 免疫原性の評価)

H L A - A 3 スーパーモチーフ保有交叉反応性結合ペプチドもまた、H L A - A 2 スーパーモチーフペプチドの免疫原性を評価するために使用される方法と同様の方法を使用して 30、免疫原性について評価する。

【0382】

(B 7 免疫原性の評価)

本明細書中で示されるように同定された B 7 スーパータイプ交叉反応性結合ペプチドの免疫原性スクリーニングを、A 2 スーパーモチーフおよび A 3 スーパーモチーフを保有するペプチドの確認と類似する様式で確認する。

【0383】

他のスーパーモチーフ / モチーフ (例えば、H L A - A 1、H L A - A 2 4 など) を保有するペプチドもまた、同様の方法論を使用して確認する。

【0384】

(実施例 13 : アナログを作製することによるネイティブエピトープの結合能力を改善するための伸長したスーパーモチーフの実行)

H L A モチーフおよびスーパーモチーフ (一次残基および / または二次残基を含む) は、本明細書中に実証されるように、高度に交叉反応性のネイティブペプチドの同定および調製において有用である。さらに、H L A モチーフおよびスーパーモチーフの規定はまた、ネイティブペプチド配列内の残基を同定することにより高度に交叉反応性のエピトープを操作することを可能にする。このネイティブペプチド配列は、ペプチドに特定の特性 (例えば、スーパータイプを含む H L A 分子の群内のより大きな交叉反応性および / またはそれらの H L A 分子のいくつかまたは全てに対するより大きな結合親和性) を付与するためにアナログ化され得る (a n a l o g e d)。調節された結合親和性を示すアナログ化ペ 40 50

プチドの例は、本実施例に示される。

【0385】

(一次アンカー残基でのアナログ化)

ペプチド操作ストラテジーを、エピトープの交叉反応性をさらに増大させるために実行する。例えば、A2スーパーモチーフ保有ペプチドの主要アンカーを、例えば、好ましくは、2位にL、I、VまたはM、およびC末端にIまたはVを導入するために改変する。

【0386】

アナログペプチドの交叉反応性を分析するために、各操作アナログを、最初に、プロトタイプA2スーパータイプ対立遺伝子A*0201に対する結合について、次いで、A*0201結合能力が維持されていれば、A2スーパータイプ交叉反応性について試験する。 10

【0387】

あるいは、ペプチドを、1つまたは全てのスーパータイプメンバーを結合すると確認し、次いで、スーパータイプメンバーのいずれか1つ(または1以上)に対する結合親和性を調節するためにアナログ化して、集団範囲を付加する。

【0388】

細胞スクリーニング分析における免疫原性についてのアナログ選択は、代表的には、親野生型(WT)ペプチドが、3以上のA2スーパータイプ対立遺伝子に少なくとも弱く結合する(すなわち、5000nM以下のIC₅₀にて結合する)能力によりさらに制限される。この要件についての原理は、WTペプチドが生物学的に関連するに十分な量にて内因的に存在しなければならないということである。アナログ化ペプチドは、親エピトープに特異的なT細胞による増大した免疫原性および交叉反応性を有することが示された(例えば、Parkhurstら、J. Immunol. 157:2539, 1996; および Pogueら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8166, 1995を参照のこと)。 20

【0389】

これらのペプチドアナログの細胞スクリーニングにおいて、アナログ特異的CTLもまた、野生型ペプチド、および可能である場合は、このエピトープを内因的に発現する標的細胞を認識することが可能であることを確認することが重要である。

【0390】

(HLA-A3およびB7のスーパーモチーフを保有するペプチドのアナログ化) 30

HLA-A3スーパーモチーフ保有エピトープのアナログは、HLA-A2スーパーモチーフ保有ペプチドのアナログ化において使用されるストラテジーと同様のストラテジーを使用して生成される。例えば、A3スーパータイプ分子の3/5に結合するペプチドは、2位に好ましい残基(V、S、MまたはA)を保有するように一次アンカー残基にて操作される。

【0391】

次いで、このアナログペプチドは、A*03およびA*11(プロトタイプA3スーパータイプ対立遺伝子)を結合する能力について試験される。次いで、 ≤ 500 nMの結合能を示すペプチドは、A3スーパータイプ交叉反応性を有すると確認される。

【0392】

A2モチーフ保有ペプチドおよびA3モチーフ保有ペプチドに類似して、3以上のB7スーパータイプ対立遺伝子を結合するペプチドを改善して、可能な場合、増大した交叉反応結合性またはより大きな結合親和性もしくは結合半減期を達成し得る。B7スーパーモチーフを保有するペプチドは、Sidneyら(J. Immunol. 157:3480-3490, 1996)に示されるように、例えば、C末端一次アンカー位置にて好ましい残基(V、I、LまたはF)を有するように操作される。 40

【0393】

他のモチーフ保有エピトープおよび/またはスーパーモチーフ保有エピトープの一次アンカー残基でのアナログ化は、同様の様式で実施される。

【0394】

次いで、アナログペプチドは、代表的には、細胞スクリーニングアッセイにおいて免疫原性について確認される。繰り返すと、アナログ特異的CTLもまた、野生型ペプチド、および可能な場合、このエピトープを内因的に発現する標的を認識することが可能であることを実証することが一般に重要である。

【0395】

(二次アンカー残基でのアナログ化)

さらに、HLAスーパーモチーフは、高度に交叉反応性のペプチドおよび／または増大した親和性でHLA分子を結合するペプチドを、このような特性と関連する二次アンカー位置にて特定の残基を同定することにより、操作することにおいて価値がある。例えば、1位にF残基を有するB7スーパーモチーフ保有ペプチドの結合能力を分析する。次いで、このペプチドを、例えば、1位のFをLで置換するようにアナログ化する。このアナログ化ペプチドを、増大した結合親和性、結合半減期および／または増大した交叉反応性について評価する。このような手順は、増強した特性を有するアナログ化ペプチドを同定する。

10

【0396】

十分に改善された結合能力または交叉反応性を有する操作されたアナログを、例えば、IFA免疫またはリポペプチド免疫に従って、HLA-B7トランスジェニックマウスにおいて免疫原性についてもまた試験し得る。アナログ化ペプチドを、205P1B5発現腫瘍を有する患者由来のPBMCを使用してリコール(recall)応答を刺激する能力についてさらに試験する。

20

【0397】

(他のアナログ化ストラテジー)

ペプチドアナログ化の別の形態は、アンカー位置とは無関係に、システインを、α-アミノ酪酸で置換することを包含する。その化学的性質に起因して、システインは、ジスルフィド架橋を形成し、かつ結合能力を減少させるに十分、ペプチドを構造的に変化させる特性を有する。システインの代わりにα-アミノ酪酸での置換は、この問題を軽減するだけでなく、いくつかの場合において、結合能力および交叉結合能力を改善することもまた示される(例えば、Settlera, Persistent Viral Infections, R. AhmedおよびI. Chen編, John Wiley & Sons, England, 1999による総説を参照のこと)。

30

【0398】

従って、単一アミノ酸置換の使用により、HLAスーパータイプ分子についてのペプチドリガンドの結合特性および／または交叉反応性が調節され得る。

【0399】

(実施例14:HLA-DR結合モチーフを有する205P1B5由来配列の同定および確認)

HLAクラスIIスーパーモチーフまたはHLAクラスIIモチーフを有するペプチドエピトープは、HLAクラスIペプチドについて記載された方法と類似の方法論を使用して、以下に概説されるように同定および確認される。

【0400】

(HLA-DRスーパーモチーフ保有エピトープの選択)

205P1B5由来のHLAクラスIIHTLEピトープを同定するために、205P1B5抗原を、HLA-DRモチーフまたはHLA-DRスーパーモチーフを保有する配列の存在について分析する。具体的には、DRスーパーモチーフを含む(9マーのコアおよび3残基のN末端および3残基のC末端隣接領域を含む(計15アミノ酸))15マーの配列を選択する。

40

【0401】

DR分子に結合するペプチドを推定するためのプロトコルを開発した(Southwoodら, J. Immunol. 160:3363-3373, 1998)。個々のDR分子に対して特異的なこれらのプロトコルは、9マーコア領域のスコア付けおよび順位付けを

50

可能にする。各プロトコルは、9マーコア内のDRスーパーモチーフ一次アンカー（すなわち、1位および6位）の存在についてペプチド配列をスコア付けするのみならず、二次アンカーの存在についての配列もさらに評価する。対立遺伝子特異的選択表（例えば、S o u t h w o o dら、同書を参照のこと）を使用して、これらのプロトコルが、特定のDR分子を結合する確率が高いペプチド配列を効率的に選択することを見いだした。さらに、これらのプロトコルを連携して（i n t a n d e m）実施することは、具体的に、DR1、DR4w4、およびDR7に対する実施が、DR交叉反応性ペプチドを効率的に選択し得ることを見いだした。

【0402】

上記で同定された205P1B5由来ペプチドは、種々の一般的なHLA-DR分子についてのそれら結合能力について試験される。全てのペプチドは、一次パネル：DR1、DR4w4およびDR7においてDR分子に対する結合について最初に試験される。次いで、これら3つのDR分子のうちの少なくとも2つを結合するペプチドを、二次アッセイにおいてDR2w2β1、DR2w2β2、DR6w19、およびDR9分子に対する結合について試験する。最後に、この4つの二次パネルDR分子のうちの少なくとも2つを結合するペプチド、従って、7つの異なるDR分子のうちの少なくとも4つを累積的に結合するペプチドは、DR4w15、DR5w11、およびDR8w2分子に対する結合について三次アッセイにおいてスクリーニングされる。一次スクリーニングアッセイ、二次スクリーニングアッセイおよび三次スクリーニングアッセイを含む、この10個のDR分子のうちの少なくとも7つを結合するペプチドは、交叉反応性DR結合因子（b i n d e r）と考えられる。一般的なHLA-DR対立遺伝子を結合することが見いだされた205P1B5由来のペプチドは、特に興味深い。

【0403】

（DR3モチーフペプチドの選択）

HLA-DR3が白色人種集団、黒色人種集団およびラテンアメリカ系集団において優勢である対立遺伝子であるので、DR3結合能力は、HTLエピトープの選択において適切な基準である。従って、候補であることが示されたペプチドはまた、それらのDR3結合能力についてアッセイされ得る。しかし、DR3モチーフの結合特異性を考慮すると、DR3に対してのみ結合するペプチドはまた、ワクチン処方物中に含めるための候補物と考えられ得る。

【0404】

DR3を結合するペプチドを効率的に同定するために、標的205P1B5抗原を、G e l l u kら（J. I m m u n o l. 152:5742-5748, 1994）により報告された2つのDR3特異的結合モチーフのうちの1つを有する配列について分析する。次いで、対応するペプチドを合成し、1μMまたはより良好な（すなわち、1μM未満）の親和性でDR3を結合する能力を有すると確認する。この結合基準を満たし、HLAクラスII高親和性結合因子とみなされるペプチドが見いだされる。

【0405】

このようにして同定されるDR3結合エピトープは、DRスーパーモチーフ保有ペプチドエピトープとともにワクチン組成物中に含まれる。

【0406】

HLAクラスIモチーフ保有ペプチドの場合と同様に、クラスIIモチーフ保有ペプチドは、親和性または交叉反応性を改善するようにアナログ化される。例えば、9マーコア配列の4位のアスパラギン酸は、DR3結合についての最適残基であり、その残基についての置換は、しばしば、DR3結合を改善する。

【0407】

（実施例15：205P1B5由来HTLエピトープの免疫原性）

この実施例は、本明細書中で記載された方法論を使用して同定されたものの中から、免疫原性のDRスーパーモチーフ保有エピトープおよびDR3モチーフ保有エピトープを決定する。

10

20

30

40

50

【0408】

H T L エピトープの免疫原性を、H T L 応答を刺激する能力を評価することにより、そして／または適切なトランスジェニックマウスモデルを使用することにより、C T L エピトープの免疫原性の決定に類似の様式にて確認する。免疫原性を、以下についてスクリーニングすることにより決定する：1.) 通常P B M Cを使用するインビトロ初代誘導または2.) 205 P 1 B 5 発現腫瘍を有する患者からのリコール応答。

【0409】

(実施例16：集団の範囲の幅を決定するための種々の人種バックグラウンドにおけるH L A スーパータイプの表現型頻度の算出)

この実施例は、複数のスーパーモチーフおよび／またはモチーフを含む複数のエピトープから構成されるワクチン組成物の集団範囲の幅の評価を示す。 10

【0410】

集団範囲を分析するために、H L A 対立遺伝子の遺伝子頻度を決定する。各H L A 対立遺伝子の遺伝子頻度を、二項分布式 $g f = 1 - [S Q R T (1 - a f)]$ を利用し、抗原または対立遺伝子頻度から計算する(例えば、S i d n e y ら, H u m a n I m m u n o l . 45 : 79 - 93, 1996を参照のこと)。表現型頻度全体を得るために、累積的遺伝子頻度を計算し、累積的抗原頻度を、逆方程式 (i n v e r s e f o r m u l a) $[a f = 1 - (1 - C g f)^2]$ を使用することにより導出する。

【0411】

頻度データがD N A 型決定のレベルにて利用可能でない場合、血清学的に規定された抗原頻度に対する対応が想定される。潜在的スーパータイプ集団範囲全体を得るために、連鎖不平衡は想定されず、スーパータイプの各々に属すると確認された対立遺伝子のみが含まれる(最小評価 (m i n i m a l e s t i m a t e))。遺伝子座間の組み合わせにより達成される潜在的な範囲全体の評価を、考えられたB対立遺伝子により包含されると予測され得るAに含まれない集団の割合をA範囲に加えることにより行う(例えば、合計 $= A + B * (1 - A)$)。A 3 様スーパータイプの確認されたメンバーは、A 3、A 1 1、A 3 1、A * 3 3 0 1、およびA * 6 8 0 1である。A 3 様スーパータイプは、A 3 4、A 6 6、およびA * 7 4 0 1もまた含み得るが、これらの対立遺伝子は、頻度計算全体には含まれなかった。同様に、A 2 様スーパータイプファミリーの確認されたメンバーは、A * 0 2 0 1、A * 0 2 0 2、A * 0 2 0 3、A * 0 2 0 4、A * 0 2 0 5、A * 0 2 0 6、A * 0 2 0 7、A * 6 8 0 2、およびA * 6 9 0 1である。最後に、B 7 様スーパータイプの確認された対立遺伝子は、B 7、B * 3 5 0 1 - 0 3、B 5 1、B * 5 3 0 1、B * 5 4 0 1、B * 5 5 0 1 - 2、B * 5 6 0 1、B * 6 7 0 1、およびB * 7 8 0 1である (B * 1 4 0 1、B * 3 5 0 4 - 0 6、B * 4 2 0 1、およびB * 5 6 0 2も潜在的にはメンバーである)。 20 30 40

【0412】

A 2 スーパータイプ、A 3 スーパータイプおよびB 7 スーパータイプを組み合わせることにより達成される集団範囲は、5つの主要な人種群において約86%である。範囲は、A 1 モチーフおよびA 2 4 モチーフを保有するペプチドを含めることにより拡張され得る。平均すると、A 1 は、5つの異なる主要人種群(白人、北アメリカの黒人、中国人、日本人、およびラテンアメリカ系人)にまたがる集団の12%に存在し、A 2 4 は、29%に存在する。まとめると、これらの対立遺伝子は、これらの同じ人種集団において39%の平均頻度に相当する。A 1 およびA 2 4 が、A 2 スーパータイプ対立遺伝子、A 3 スーパータイプ対立遺伝子およびB 7 スーパータイプ対立遺伝子の範囲と組み合わせられると、主要人種にまたがる合計範囲は、95%を超える。類似のアプローチが、クラスI I モチーフ保有エピトープの組み合わせにより達成される集団範囲を評価するために使用され得る。 40

【0413】

ヒトにおける免疫原性研究(例えば、B e r t o n i ら, J . C l i n . I n v e s t . 100 : 503, 1997; D o o l a n ら, I m m u n i t y 7 : 97, 1997; 50

および Threlkeldら, J. Immunol. 159:1648, 1997) は、高度に交叉反応性の結合ペプチドが、エピトープとしてほぼ常に認識されることを示した。高度に交叉反応性の結合ペプチドを使用することは、多様な集団において免疫原性であるワクチンに含めるための候補エピトープを同定することにおける重要な選択基準である。

【0414】

(本明細書中開示されるとおりであり、そして当該分野による) 十分な数のエピトープを用いることにより、平均集団範囲は、5つの主要人種集団の各々において95%を超えると推定される。ゲームの理論であるモンテカルロシミュレーション分析(これは、当該分野で公知である(例えば、Osborne, M. J. およびRubinstein, A. 「A course in game theory」MIT Press, 1994を参照のこと))は、白人、北アメリカ黒人、日本人、中国人、およびラテンアメリカ人の人種群から構成される集団中のどの程度の百分率の個体が本明細書中に記載されるワクチンエピトープを認識するかを推定するために使用され得る。好ましい百分率は、90%である。より好ましい百分率は、95%である。

10

【0415】

(実施例17: プライミング後に内因的にプロセシングされた抗原のCTL認識)
この実施例では、本明細書中で記載されるように同定され、選択されたネイティブペプチドまたはアナログ化ペプチドのエピトープにより誘導されたCTLが、内因的に合成された抗原(すなわち、ネイティブ抗原)を認識することを確認する。

20

【0416】

ペプチドエピトープ(例えば、HLA-A2スーパーモチーフ保有エピトープ)で免疫したトランスジェニックマウスから単離したエフェクター細胞を、ペプチドでコーティングした刺激性因子細胞(stimulator cell)を用いてインビトロで再刺激する。6日後、エフェクター細胞を、細胞傷害性についてアッセイし、ペプチド特異的細胞傷害性活性を含む細胞株を、さらに再刺激する。さらに6日後、これらの細胞株を、ペプチドの存在下または非存在下で⁵¹Cr標識Jurkat-A2.1/K^b標的細胞に対する細胞傷害性活性について試験し、内因的に合成された抗原を有する⁵¹Cr標識標的細胞(すなわち、205P1B5発現ベクターで安定にトランスフェクトされた細胞)に対しても試験する。

30

【0417】

結果は、ペプチドエピトープでプライムされた動物から得られたCTL株が、内因的に合成された205P1B5抗原を認識することを実証する。このような分析のために使用されるトランスジェニックマウスモデルの選択は、評価されるエピトープに依存する。HLA-A*0201/K^bトランスジェニックマウスに加えて、ヒトA11(これはまた、A3エピトープを評価するために使用され得る)およびB7対立遺伝子を有するマウスを含むいくつかの他のトランスジェニックマウスモデルが特徴付けられ、他(例えば、HLA-A1およびA24についてのトランスジェニックマウス)が開発されている。HLA-DR1およびHLA-DR3のマウスモデルもまた開発され、これは、HTLエピトープを評価するために使用され得る。

40

【0418】

(実施例18: トランスジェニックマウスにおけるCTL-HTL結合体化エピトープの活性)

この実施例は、205P1B5由来のCTLおよびHTLのペプチドワクチン組成物の使用により、トランスジェニックマウスにおけるCTLおよびHTLの誘導を示す。本明細書中で使用されるワクチン組成物は、205P1B5発現腫瘍を有する患者に投与されるペプチドを含む。このペプチド組成物は、複数のCTLエピトープおよび/またはHTLエピトープを含み得る。このエピトープは、本明細書中に記載される方法論を用いて同定される。この実施例はまた、増強された免疫原性が、CTLワクチン組成物中に1以上のHTLエピトープを含めることにより達成され得ることを示す; このようなペプチド組成

50

物は、CTLエピトープに結合体化されたHTLエピトープを含み得る。このCTLエピトープは、500nM以下の親和性にて、複数のHLAファミリーメンバーに結合するエピトープまたはそのエピトープのアナログであり得る。このペプチドは、所望であれば、脂質化 (lipidated) され得る。

【0419】

免疫手順：トランスジェニックマウスの免疫を、記載 (Alexanderら, J. Immunol. 159: 4753-4761, 1997) のように行う。例えば、A2/K^b マウス (これは、ヒトHLA A2.1対立遺伝子についてトランスジェニックであり、かつHLA-A*0201モチーフまたはHLA-A2スーパーモチーフを保有するエピトープの免疫原性を確認するために使用される) を、フロイント不完全アジュバント中、あるいはこのペプチド組成物が脂質化CTL/HTL結合体である場合は、DMSO/生理食塩水中、またはこのペプチド組成物がポリペプチドである場合はPBSもしくはフロイント不完全アジュバント中で、0.1mlのペプチドとともに皮下で (尾の基部) プライムする。プライムして7日後、これらの動物から得た脾細胞を、ペプチドでコーティングした同系の照射LPS活性化リンパ芽球で再刺激する。 10

【0420】

細胞株：ペプチド特異的細胞傷害性アッセイのための標的細胞は、HLA-A2.1/K^b キメラ遺伝子 (例えば、Vitellioら, J. Exp. Med. 173: 1007, 1991) を使用してトランスフェクトしたJurkat細胞である。

【0421】

インビトロでのCTL活性化：プライムして1週間後、10mlの培養培地/T25フラスコ中にて脾臓細胞 (30×10^6 細胞/フラスコ) を、37℃にて同系の照射 (3000 rad) ペプチドコーティングリンパ芽球 (10×10^6 細胞/フラスコ) とともに共存培養する。6日後、エフェクター細胞を採取し、細胞傷害性活性についてアッセイする。

【0422】

細胞傷害性活性についてのアッセイ：標的細胞 ($1.0 \sim 1.5 \times 10^6$) を、200 μ lの⁵¹Crの存在下で、37℃にてインキュベートする。60分後、細胞を3回洗浄し、R10培地中に再懸濁する。ペプチドを、必要であれば1 μ g/mlの濃度にて添加する。アッセイのために、 10^4 の⁵¹Cr標識標的細胞を、U底96ウェルプレート中の異なる濃度のエフェクター細胞 (最終容積は200 μ l) に添加する。37℃にて6時間インキュベートした後、上清の0.1mlのアリコートを各ウェルから取り出し、放射能を、Micromedic自動ガンマカウンタにて測定する。特異的溶解%を、以下の式により決定する： $\% \text{特異的放出} = 100 \times (\text{実験的放出} - \text{自発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的放出})$ 。同じ条件下で行った別個のCTLアッセイの間の比較を容易にするために、 $\% ^{51}\text{Cr}$ 放出データを、溶解単位/ 10^6 細胞として表す。1溶解単位は、6時間の⁵¹Cr放出アッセイにおいて10,000個の標的細胞の30%溶解を達成するために要したエフェクター細胞の数として任意に規定される。特異的溶解単位/ 10^6 を得るために、ペプチドの非存在下で得た溶解単位/ 10^6 を、ペプチドの存在下で得た溶解単位/ 10^6 から差し引く。例えば、30%の⁵¹Cr放出が、ペプチドの非存在下では、50:1のエフェクター (E): 標的 (T) 比 (すなわち、10,000個の標的に対して 5×10^5 個のエフェクター細胞) にて得られ、そしてペプチドの存在下では5:1 (すなわち、10,000個の標的に対して 5×10^4 個のエフェクター細胞) にて得られる場合、特異的溶解単位は、以下の通りである： $[(1/50,000) - (1/500,000)] \times 10^6 = 18 \text{ LU}$ 。 30 40

【0423】

結果を分析して、免疫原性CTL/HTL結合体ワクチン調製物を注射した動物のCTL応答の大きさを評価し、実施例標題「免疫原性の確認」において上記で解説したように、例えば、CTLエピトープを使用して達成されたCTL応答の大きさと比較する。これと類似の分析を行って、複数のCTLエピトープおよび/または複数のHTLエピトープを 50

含むペプチド結合体の免疫原性を確認し得る。これらの手順に従って、C T L 応答が誘導され、同時に、H T L 応答がこのような組成物の投与の際に誘導されることが見いだされる。

【0424】

(実施例19：205P1B5特異的ワクチン中に含めるためのC T L エピトープおよびH T L エピトープの選択)

この実施例は、本発明のワクチン組成物のためのペプチドエピトープを選択するための手順を示す。この組成物中のペプチドは、ペプチドをコードする単一の配列または1以上の配列（すなわち、ミニ遺伝子）のいずれかの核酸配列の形態であり得るか、あるいは単一エピトープおよび／またはポリエピトープのペプチドであり得る。

10

【0425】

以下の原理を、ワクチン組成物中に含めるための複数のエピトープを選択する場合に利用する。以下の原理の各々を、選択を行うために釣り合わせる。

【0426】

投与の際に、205P1B5クリアランスと関連する免疫応答を模倣するエピトープを選択する。使用されるエピトープの数は、自発的に205P1B5を浄化する患者の観察に依存する。例えば、自発的に205P1B5を浄化する患者が、205P1B5抗原由来の少なくとも3つのエピトープに対する免疫応答を生じることが観察された場合、H L A クラス I について3つまたは4つ（3～4）のエピトープが含まれるべきである。同様の原理が、H L A クラス I I エピトープを決定するために使用される。

20

【0427】

しばしば、H L A クラス I 分子については500nM以下の IC_{50} 、もしくはクラス I I については1000nM以下の IC_{50} という結合親和性を有するエピトープ；またはB I M A S ウェブサイト（URL bimas.dcrt.nih.gov/）からの高結合スコアを有するH L A クラス I ペプチドが選択される。

【0428】

多様な集団全体を通じたワクチンの広い範囲を達成するために、十分なスーパーモチーフ保有ペプチド、または対立遺伝子特異的モチーフ保有ペプチドの十分なアレイを選択して、広い集団範囲が与えられる。1つの実施形態において、エピトープは、少なくとも80%の集団範囲を提供するように選択される。モンテカルロ分析（当該分野で公知の統計学的評価法）は、集団範囲の幅、すなわち重複を評価するために使用され得る。

30

【0429】

ポリエピトープ組成物、またはこれをコードするミニ遺伝子を作製する場合、目的のエピトープを含む、可能性のある最も小さなペプチドを生成することが代表的に所望される。使用される原理は、同じでないとしても、ネスト化された（n e s t e d）エピトープを含むペプチドを選択する場合に使用されるものと同様である。例えば、ワクチン組成物についてのタンパク質配列は、この配列が、配列内に含まれるエピトープの最大数を有する（すなわち、高濃度のエピトープを有する）ので、選択される。エピトープは、ネスト化されてもよいし、重複（すなわち、互いにフレームシフトしている）していてもよい。例えば、重複するエピトープを使用する場合、2つの9マーエピトープおよび1つの10マーエピトープが、10アミノ酸ペプチド中に存在し得る。各エピトープは露出され得、このようなペプチドの投与の際にH L A 分子により結合される。マルチエピトープのペプチドは、合成により、組換えにより、またはネイティブの供給源からの切断により生成され得る。あるいは、このネイティブ配列からアナログが生成され得、それにより1以上のエピトープは、このポリエピトープのペプチドの交叉反応性特性および／または結合親和性特性を変化させる置換を含む。このようなワクチン組成物は、治療目的または予防目的のために投与される。この実施形態は、免疫系の未だ発見されていない局面として、プロセッシングをネイティブのネスト化された配列に適用し、それにより治療的または予防的免疫応答誘導ワクチン組成物の生成を容易にするという可能性を提供する。さらに、このような実施形態は、現在未知のH L A 構造についてのモチーフ保有エピトープの可能性を提供

40

50

する。さらに、この実施形態（アナログを作製しない）は、免疫応答を、205P1B5に実際存在する複数のペプチド配列に方向付け、従って、何らかの連結エピトープを評価する必要性が避けられる。最後に、この実施形態は、核酸ワクチン組成物を生成する際のスケールの経済性を提供する。この実施形態に関連して、コンピュータプログラムが当該分野の原理に従って導出され得、このプログラムは、標的配列において配列長さあたりのエピトープの最大数を同定する。

【0430】

選択されたペプチドから構成されるワクチン組成物は、投与される場合、安全で、有効であり、かつ205P1B5を有するか、またはこれを過剰発現する細胞を制御または消去する免疫応答に大きさが類似の免疫応答を惹起する。

10

【0431】

（実施例20：「ミニ遺伝子」マルチエピトープDNAプラスミドの構築）

本実施例は、ミニ遺伝子発現プラスミドの構築を議論する。ミニ遺伝子プラスミドは、当然、本明細書中に記載される種々の構成のB細胞、CTLおよび／またはHTLのエピトープまたはエピトープアナログを含み得る。

【0432】

ミニ遺伝子発現プラスミドは、代表的に、複数のCTLペプチドエピトープおよびHTLペプチドエピトープを含む。本実施例において、HLA-A2スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープ、HLA-A3スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープ、HLA-B7スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープならびにHLA-A1モチーフ保有ペプチドエピトープおよびHLA-A24モチーフ保有ペプチドエピトープを、DRスーパーモチーフ保有エピトープおよび／またはDR3エピトープと組み合わせて使用する。205P1B5由来のHLAクラスIスーパーモチーフまたはHLAクラスIモチーフを保有するペプチドエピトープを、複数のスーパーモチーフ／モチーフが提示されて広範な集団の範囲を確実にするように、選択する。同様に、HLAクラスIIエピトープを、広範な集団の範囲を提供するように、205P1B5から選択する。すなわち、HLA-DR-1-4-7スーパーモチーフ保有エピトープおよびHLA-DR-3モチーフ保有エピトープの両方を、ミニ遺伝子構築物に含有させるために選択する。選択されたCTLエピトープおよびHTLエピトープを、次いで、発現ベクターにおける発現のためにミニ遺伝子へと組み込む。

20

30

【0433】

このような構築物は、HTLエピトープを小胞体に指向させる配列をさらに含み得る。例えば、Iiタンパク質（Ii protein）は、当該分野において記載されるように1つ以上のHTLエピトープに融合され得、ここでこのIiタンパク質のCLIP配列は、除去され、そしてHLAクラスIIエピトープ配列と置換され、その結果、HLAクラスIIエピトープが、小胞体に指向され、このエピトープは、HLAクラスII分子に結合する。

【0434】

本実施例は、ミニ遺伝子保有発現プラスミドの構築のために使用される方法を例示する。ミニ遺伝子組成物のために使用され得る他の発現ベクターは、当業者に利用可能であり、かつ公知である。

40

【0435】

本実施例のミニ遺伝子DNAプラスミドは、コンセンサスKozak配列およびコンセンサスマウスκIg軽鎖シグナル配列と、それに続く本明細書中に開示される原理に従い選択されるCTLおよび／またはHTLエピトープを含む。この配列は、pcDNA3.1Myc-HisベクターによりコードされるMycおよびHisの抗体エピトープタグに融合されたオープンリーディングフレームをコードする。

【0436】

例えば、15ヌクレオチドがオーバーラップしている、平均約70ヌクレオチド長であり得るオーバーラップオリゴヌクレオチドを合成し、そしてHPLC精製する。これらのオ

50

リゴヌクレオチドは、選択されたペプチドエピトープならびに適切なリンカーヌクレオチド、K o z a k 配列、およびシグナル配列をコードする。最終的なマルチエピトープミニ遺伝子を、P C Rを用いる3セットの反応においてオーバーラップオリゴヌクレオチドを伸長することによってアセンブリする。P e r k i n / E l m e r 9600 P C R機を用い、そして合計30サイクルを、以下の条件を用いて実施する：95℃で15秒、（各々のプライマー対の最も低い計算値T_mより5℃低い）アニーリング温度で30秒、そして72℃で1分間。

【0437】

例えば、ミニ遺伝子を以下のように調製する。第一のP C R反応において、各々5 μgの2つのオリゴヌクレオチドを、アニーリングし、そして伸長する。8つのオリゴヌクレオチド（すなわち、4対のプライマー）を使用する実施例において、オリゴヌクレオチド1とオリゴヌクレオチド2、オリゴヌクレオチド3とオリゴヌクレオチド4、オリゴヌクレオチド5とオリゴヌクレオチド6、およびオリゴヌクレオチド7とオリゴヌクレオチド8とを、P f uポリメラーゼ緩衝液（1×=10 mM K C L、10 mM (N H₄)₂ S O₄、20 mM T r i s-クロリド（pH 8.75）、2 mM M g S O₄、0.1% T r i t o n X-100、100 μg/ml B S A）、各々の0.25 mMのd N T P、および2.5 UのP f uポリメラーゼを含む100 μlの反応物中で合わせる。全長二量体産物を、ゲル精製し、そして1と2および3と4との産物、ならびに5と6および7と8との産物を含む2つの反応物を混合し、アニーリングし、そして10サイクルにわたり伸長する。次いで、2つの反応物の半分を混合し、そして隣接するプライマーを添加して、全長の産物を増幅する前に5サイクルのアニーリングおよび伸長を実施した。この全長産物を、ゲル精製し、p C R-b l u n t (I n v i t r o g e n) にクローニングし、そして個々のクローンを配列決定によりスクリーニングする。

【0438】

（実施例21：プラスミド構築物およびそのプラスミド構築物が誘導する免疫原性の程度）

プラスミド構築物（例えば、前出の実施例に従い構築されたプラスミド）が誘導し得る免疫原性の程度を、エピトープ発現核酸構築物を用いてA P Cを形質導入またはトランスフェクトした後、このA P Cによるエピトープ提示を決定することによりインビトロで確認する。このような研究により「抗原性」を決定し、そしてヒトA P Cの使用を可能とする。このアッセイによりこの細胞表面上のエピトープ-H L AクラスI複合体の密度を定量することによって、T細胞により認識される状態においてA P Cにより提示されるエピトープの能力を決定する。定量を、A P Cから溶出されたペプチドの量を直接測定することにより実施し得る（例えば、S i j t sら、J. I m m u n o l. 156:683~692、1996；D e m o t zら、N a t u r e 342:682~684、1989を参照のこと）か；またはペプチド-H L AクラスI複合体の数を、罹患したかまたはトランスフェクトされた標的細胞により誘導された溶解またはリンホカインの放出の量を測定し、次いで等しいレベルの溶解またはリンホカインの放出を得るために必要なペプチドの濃度を決定することにより、評価し得る（例えば、K a g e y a m aら、J. I m m u n o l. 154:567~576、1995を参照のこと）。

【0439】

あるいは、免疫原性を、マウスへのインビボでの注射、引き続くC T L活性およびH T L活性（これらの活性を、細胞傷害性および細胞増殖性のアッセイ（それぞれ、例えば、A l e x a n d e rら、I m m u n i t y 1:751~761、1994において詳述される）を用いて分析する）のインビトロでの評価を介して確認する。

【0440】

例えば、少なくとも1つのH L A-A 2スーパーモチーフペプチドを有するD N Aミニ遺伝子構築物がC T Lをインビボで誘導する能力を確認するために、例えば、H L A-A 2.1/K^b トランスジェニックマウスを、100 μgの裸のc D N Aを用いて筋肉内で免疫する。c D N A免疫により誘導されたC T Lのレベルを比較する手段として、コントロ

10

20

30

40

50

ール群の動物もまた、ミニ遺伝子によりコードされるような単一のポリペプチドとして合成された複数のエピトープを含む実際のペプチド組成物そのものを用いて免疫する。

【0441】

免疫した動物由来の脾臓細胞を、各々の組成物（ミニ遺伝子においてコードされるペプチドエピトープまたはポリエピトープペプチド）をそれぞれ用いて2回刺激し、次いで⁵¹Cr放出アッセイにおいてペプチド特異的な細胞傷害性活性についてアッセイする。これらの結果は、A2拘束エピトープに対するCTL応答の大きさを示し、従ってミニ遺伝子ワクチンおよびポリエピトープワクチンのインビボでの免疫原性を示す。

【0442】

従って、ミニ遺伝子が、ポリエピトープペプチドワクチンが誘発するような、HLA-A2スーパーモチーフペプチドエピトープに対する免疫応答を誘発することが見いだされる。HLA-A3およびHLA-B7のモチーフエピトープまたはスーパーモチーフエピトープによるCTL誘導を評価するために他のHLA-A3およびHLA-B7トランスジェニックマウスモデルを用いて同様の分析もまた実施され、それにより、このミニ遺伝子が、提供されたエピトープに対して指向される適切な免疫応答を誘発することもまた見出される。

【0443】

クラスIIエピトープをコードするミニ遺伝子がHTLをインビボで誘導する能力を確認するためには、DRトランスジェニックマウスにか、または適切なマウスMHC分子と交叉反応するエピトープについては、例えば、I-A^b拘束マウスに、100μgのプラスミドDNAを筋肉内免疫する。DNA免疫により誘導されたHTLのレベルを比較する手段として、コントロール動物の群も、フロイントの完全アジュバンド中に乳化した実際のペプチド組成物で免疫する。CD4+T細胞（すなわちHTL）を、免疫した動物の脾臓細胞から精製し、そして各々の組成物（ミニ遺伝子中にコードされるペプチド）のそれぞれを用いて刺激する。HTL応答を、³H-チミジン取り込み増殖アッセイを用いて測定する（例えば、Alexanderら、Immunity 1:751~761、1994を参照のこと）。この結果は、HTL応答の大きさを示し、従って、このミニ遺伝子のインビボでの免疫原性を実証する。

【0444】

前出の実施例において記載されるように構築されたDNAミニ遺伝子をまた、プライムブーストプロトコル（prime boost protocol）を用いてブースト剤と組み合わせたワクチンとして確認し得る。このブースト剤は、組み換えタンパク質（例えば、Barnettら、Aids Res. and Human Retroviruses 14、Supplement 3: S299~S309、1998）または例えば、完全な目的のタンパク質をコードするミニ遺伝子もしくはDNAを発現する組み換えワクチン（例えば、Hankeら、Vaccine 16: 439~445、1998；Sedegahら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7648~7653、1998；HankeおよびMcMichael、Immunol. Letters 66: 177~181、1999；ならびにRobinsonら、Nature Med. 5: 526~534、1999を参照のこと）からなり得る。

【0445】

例えば、プライムブーストプロトコルにて用いられるDNAミニ遺伝子の有効性を、最初に、トランスジェニックマウスにおいて評価する。本実施例において、A2.1/K^bトランスジェニックマウスを、免疫原性ペプチド（少なくとも1つのHLA-A2スーパーモチーフ保有ペプチドを含む）をコードする100μgのDNAミニ遺伝子でIM免疫する。インキュベーション期間（3~9週間の範囲をとる）の後、このマウスを、DNAミニ遺伝子によりコードされるのと同じ配列を発現する10⁷ pfu/マウスの組み換えワクシニアウイルスを用いてIPでブーストする。コントロールマウスを、ミニ遺伝子配列を有さない100μgのDNAもしくは組み換えワクシニアをもちいるか、またはこのミニ遺伝子をコードするDNAを用いるが、ワクシニアブーストを伴わずに免疫する。2週

間のさらなるインキュベーション期間の後、このマウス由来の脾臓細胞を、E L I S P O T アッセイにおいてペプチド特異的な活性について直ちにアッセイする。さらに、脾臓細胞を、ミニ遺伝子中にコードされる A 2 拘束ペプチドエピトープおよび組み換えワクシニアを用いてインビトロで刺激し、次いで α I F N E L I S A、 β I F N E L I S A、および/または γ I F N E L I S A においてペプチド特異的な活性についてアッセイする。

【0446】

プライムブーストプロトコルにおいて利用されるミニ遺伝子が、H L A - A 2 スーパーモチーフペプチドに対して D N A 単独より高い免疫応答を誘発することが見出される。そのような分析をまた、H L A - A 3 または H L A - B 7 のモチーフエピトープまたはスーパーモチーフエピトープによる C T L 誘導を評価するために、H L A - A 1 1 トランスジェニックマウスモデルまたは H L A - B 7 トランスジェニックマウスモデルを用いて実施し得る。ヒトにおけるプライムブーストプロトコルの使用を、「プライムブーストプロトコルを用いる C T L 応答の誘導」と題した以下の実施例において記載する。 10

【0447】

(実施例 22：予防使用のためのペプチド組成物)

本発明のワクチン組成物を使用して、この抗原を保有する腫瘍についての危険性を有するヒトにおける 2 0 5 P 1 B 5 発現を予防し得る。例えば、上記実施例において選択されるエピトープのような複数の C T L エピトープおよび H T L エピトープを含むポリエピトープペプチドエピトープ組成物（またはポリエピトープペプチドエピトープを含む核酸）（これらはまた、集団の 8 0 % より多くを標的化するように選択される）を、2 0 5 P 1 B 5 関連腫瘍についての危険性がある個体に投与する。 20

【0448】

例えば、ペプチドベースの組成物を、複数のエピトープを包含する単一のポリペプチドとして提供する。代表的には、アジュバント（例えば、フロイントの不完全アジュバンド）を含む生理学的溶液中でワクチンを投与する。最初の免疫のためのペプチド用量は、7 0 k g の患者について約 1 μ g ~ 約 5 0 , 0 0 0 μ g であり、一般的には 1 0 0 μ g ~ 5 , 0 0 0 μ g である。ワクチンの最初の投与に引き続いて、4 週間目にブースター投与をし、さらに引き続いて P B M C サンプル中のエピトープ特異的 C T L 集団の存在を決定する技術により患者における免疫応答の大きさの評価をする。さらなるブースター用量を、必要である場合に投与する。この組成物は、安全、かつ 2 0 5 P 1 B 5 関連疾患に対する予防薬として効果的、の両方であることが見出される。 30

【0449】

あるいは、代表的にトランスフェクト薬剤を含む組成物を、当該分野において公知の方法論および本明細書中で開示される方法論に従い、核酸ベースのワクチンの投与のために使用する。

【0450】

(実施例 23：ネイティブの 2 0 5 P 1 B 5 配列由来のポリエピトープワクチン組成物)

ネイティブの 2 0 5 P 1 B 5 ポリタンパク質配列を、複数のエピトープを含むポリタンパク質の「比較的短い」領域を同定するために、好ましくは、各々のクラス I および/またはクラス I I のスーパーモチーフまたはモチーフについて規定されるコンピューターアルゴリズムを用いて分析する。好ましくは、この「比較的短い」領域は、全長のネイティブの抗原より長さが短い。複数の別個の、またはオーバーラップする「ネスト化された (n e s t e d)」エピトープを含むこの比較的短い領域を、選択し；これをミニ遺伝子構築物を作製するために使用し得る。この構築物を、ネイティブのタンパク質配列に対応するペプチドを発現するように操作する。この「比較的短い」ペプチドは、一般的に 2 5 0 アミノ酸長未満であり、しばしば 1 0 0 アミノ酸長未満であり、好ましくは 7 5 アミノ酸長未満であり、より好ましくは 5 0 アミノ酸長未満である。このワクチン組成物のタンパク質配列は、この配列中に含有される最大数のエピトープを有する（すなわち、それは、高濃度のエピトープを有する）ので、このワクチン組成物のタンパク質配列を選択する。本 40 50

明細書中に示されるように、エピトープモチーフは、ネスト化されていても、オーバーラップしてもよい（すなわち、互いに対してフレームシフトしてもよい）。例えば、オーバーラップエピトープを用いて、2つの9マーエピトープおよび1つの10マーエピトープが、10アミノ酸のペプチド中に存在し得る。そのようなワクチン組成物を、治療目的または予防目的のために投与する。

【0451】

このワクチン組成物としては、例えば、205P1B5抗原由来の複数のCTLエピトープおよび少なくとも1つのHTLエピトープが挙げられる。このポリエピトープネイティブ配列を、ペプチドとしてかまたはこのペプチドをコードする核酸配列としてかのいずれかで投与する。あるいは、アナログを、そのネイティブ配列から作製し得、それにより1つ以上のエピトープが、そのポリエピトープペプチドの交叉反応性特性および／または結合親和性特性を変化させる置換を含む。

10

【0452】

本実施例の実施形態は、免疫系プロセッシングの未だ開発されていない局面を、ネイティブのネスト化された配列に適用し、それにより治療的または予防的な免疫応答を誘導するワクチン組成物の産生を容易にする可能性を提供する。さらに、そのような実施形態は、現在未知のHLA構造についてのモチーフ保有エピトープの可能性を提供する。さらに、この実施形態（類似の実施形態を除く）は、免疫応答をネイティブの205P1B5中に実際に存在する複数のペプチド配列に向け、従って、任意の連結するエピトープを評価する必要性を除外する。最後に、この実施形態は、ペプチドワクチン組成物または核酸ワクチン組成物を産生する場合のスケールの経済性を提供する。

20

【0453】

この実施形態に関して、標的配列において、配列長あたり最も多数のエピトープを同定するために使用され得るコンピュータプログラムが、当該分野において利用可能である。

【0454】

（実施例24：複数の抗原由来のポリエピトープワクチン組成物）

本発明の205P1B5ペプチドエピトープを、他の標的腫瘍関連抗原由来のエピトープと組み合わせて使用して、205P1B5およびそのような他の抗原を発現する癌の予防および処置に有用なワクチン組成物を作製する。例えば、ワクチン組成物を、205P1B5由来の複数のエピトープおよび205P1B5発現に関連する標的の癌でしばしば発現される腫瘍関連抗原を組み込む単一のポリペプチドとして提供し得るか、または1つ以上の別個のエピトープのカクテルを含む組成物として投与し得る。あるいは、このワクチンを、ミニ遺伝子構築物として、またはインビトロでペプチドエピトープを充填した樹状細胞として投与し得る。

30

【0455】

（実施例25：免疫応答を評価するためのペプチドの使用）

本発明のペプチドを、205P1B5に対する特異的抗体、CTLまたはHTLの存在についての免疫応答を分析するために使用し得る。そのような分析を、Oggら、Science 279:2103~2106、1998に記載される様式で実施し得る。本実施例において、本発明に従うペプチドを、診断目的または予防目的のための試薬として（免疫原としてではなく）使用する。

40

【0456】

本実施例において、高度に感受性なヒト白血球抗原四量複合体（「四量体」）を、例えば、疾患の異なる病期またはA*0201モチーフを含む205P1B5ペプチドを含む免疫後でのHLA A*0201陽性個体由来の205P1B5 HLA-A*0201特異的CTL頻度の縦断解析のために使用する。四量複合体を、記載される（Museyら、N. Engl. J. Med. 337:1267、1997）ように合成する。簡単には、精製したHLA重鎖（本実施例におけるA*0201）およびβ2-ミクログロブリンを、原核生物発現系によって合成する。この重鎖を、膜貫通細胞質ゾルテールの欠失およびBirA酵素ビオチン化部位を含む配列のCOOH末端付加により改変する。重鎖、

50

β 2-ミクログロブリン、およびペプチドを、希釈により再折り畳みをする。この45 kDの再折り畳み産物を、高速タンパク質液体クロマトグラフィーを用いて単離し、次いでビオチン（Sigma、St. Louis、Missouri）、アデノシン5'三リン酸およびマグネシウムの存在下でBirAによりビオチン化する。ストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体を、1：4のモル比で添加し、四量体産物を1 mg/mlまで濃縮する。得られた産物を、四量体フェコエリトリンという。

【0457】

患者の血液サンプルの分析のために、約100万のPBMCを、300 gで5分間遠心分離し、50 μ lの冷リン酸緩衝化生理食塩水に再懸濁する。三色分析を、抗CD8-トリカラー（Tricolor）、および抗CD38と共に四量体-フィコエリスリンを用いて実施する。PBMCを、氷上で四量体および抗体と共に30～60分間インキュベートし、次いでホルムアルデヒド固定の前に2回洗浄する。99.98%より多くのコントロールサンプルを含むようなゲートを適用する。四量体についてのコントロールは、A*0201陰性の個体およびA*0201陽性の罹患していないドナーの両方を含む。次いで、この四量体を用いて染色された細胞の百分率を、フローサイトメトリーを用いて決定する。この結果は、PBMCサンプル中のエピトープ拘束CTL含有細胞の数を示し、これにより205P1B5エピトープに対する免疫応答の程度、従って、205P1B5への曝露の状態、または予防的応答もしくは治療的応答を誘発するワクチンへの曝露の状態を容易に示す。

【0458】

（実施例26：リコール（recall）応答を評価するためのペプチドエピトープの使用）

本発明のペプチドエピトープを、患者におけるT細胞応答（例えば、急性またはリコール応答）を評価するための試薬として使用する。そのような分析を、205P1B5関連疾患から回復した患者または205P1B5ワクチンでワクチン接種した患者において実施し得る。

【0459】

例えば、ワクチン接種したヒトのクラスI拘束CTL応答を分析し得る。このワクチンは、任意の205P1B5ワクチンでよい。PBMCを、ワクチン接種した個体およびHLA型の個体から回収する。次いで、複合的HLAスーパータイプファミリーメンバーに交叉反応性を提供するためのスーパーモチーフを必要に応じて保有する本発明の適切なペプチドエピトープを、HLA型を保有する個体由来のサンプルの分析のために使用する。

【0460】

ワクチン接種した個体由来のPBMCを、Ficoll-Histopaque密度勾配（Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO）上で分離し、HBSS（GIBCO Laboratories）中で3回洗浄し、熱で不活性化した10%のヒトAB血清を含むL-グルタミン（2 mM）、ペニシリン（50 U/ml）、ストレプトマイシン（50 μ g/ml）およびHepes（10 mM）を補充したRPMI-1640（GIBCO Laboratories）（完全RPMI）中に再懸濁し、マイクロ培養形式を用いてプレートする。本発明のエピトープを含む合成ペプチドを、各々のウェルに10 μ g/mlで添加し、そしてHBVコア128～140エピトープを、刺激の第一週目の間、T細胞ヘルプの供給源として各々のウェルに1 μ g/ml添加する。

【0461】

マイクロ培養形式において、 4×10^5 PBMCを、100 μ l/ウェルの完全RPMIの96ウェルの丸底プレート中の8つの複製培養中のペプチドで刺激する。3日目および10日目に、100 μ lの完全RPMIおよび20 U/mlの最終濃度のrIL-2を、各々のウェルに添加する。7日目に、この培養物を、96ウェルの平底プレートに移し、そしてペプチド、rIL-2および 10^5 の放射性（3,000 rad）の自己フィーダー細胞を用いて再刺激する。この培養物を、14日目に細胞傷害性について試験する。陽性CTL応答は、以前に記載されるような（Rehermannら、Nature Me

d. 2 : 1 1 0 4、1 1 0 8、1 9 9 6 ; R e h e r m a n n ら、J . C l i n . I n v e s t . 9 7 : 1 6 5 5 ~ 1 6 6 5、1 9 9 6 ; および R e h e r m a n n ら、J . C l i n . I n v e s t . 9 8 : 1 4 3 2 ~ 1 4 4 0、1 9 9 6) 罹患していないコントロール被験体との比較に基づいて、8つの複製培養物のうち2つ以上が10%より多い特異的⁵¹Cr放出を示すことを必要とする。

【0462】

標的細胞株は、自己由来であり、そして同種異系のEBV形質転換したB-LCLであり、これらは、両方American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI、Boston、MA) から購入されたか、または記載されるように (Guilhotら、J. Virol. 66 : 2670 ~ 2678、1992) 患者のプールから確立されるかのいずれかである。

【0463】

細胞傷害性アッセイを、以下の様式で実施する。標的細胞は、同種異系のHLAに適合するBリンパ芽球細胞株または自己由来のEBV形質転換Bリンパ芽球細胞株のいずれかからなり、これらを、10 μMでの本発明の合成ペプチドエピトープと共に一晩インキュベートし、そして100 μCiの⁵¹Cr (Amersham Corp.、Arlington Heights、IL) を用いて1時間にわたり標識し、その後これらを、HBSSを用いて4回洗浄する。

【0464】

細胞傷害活性を、3,000標的／ウェルを含むU底の96ウェルプレートを用いる標準的な4時間の、別々のウェルの⁵¹Cr放出アッセイにおいて決定する。刺激されたPBMCを、20~50:1のエフェクター／標的 (E/T) の比率で14日目に試験する。細胞傷害性%を、式： $100 \times [(\text{実験的放出} - \text{自発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的放出})]$ から決定する。最大放出を、界面活性剤 (2% Triton X-100; Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO) による標的の溶解により決定する。自発的放出は、全ての実験について最大放出の25%未満である。

【0465】

このような分析の結果は、HLA拘束CTL集団が、上記の205P1B5または205P1B5ワクチンへの曝露により刺激される程度を示す。

【0466】

同様に、クラスII拘束HTL応答もまた分析し得る。精製されたPBMCを、 1.5×10^5 細胞／ウェルの密度での96ウェルの平底プレート中で、10 μg/mlの本発明の合成ペプチド、205P1B5抗原全体、またはPHAを用いて刺激する。細胞を、各々の条件について4~6ウェルの繰り返しで慣用的にプレートする。7日間の培養の後、培地を除去し、そして10 U/mlのIL-2を含む新しい培地と置換する。2日後、100 μCiの³Hチミジンを、各々のウェルに添加し、そしてさらに18時間にわたりインキュベーションを続ける。次いで、細胞DNAを、ガラスファイバーマット上に回収し、そして³Hチミジン取り込みについて分析する。抗原特異的T細胞増殖を、抗原の存在下での³Hチミジン取り込みを抗原の非存在下での³Hチミジン取り込みで割った比として計算する。

【0467】

(実施例27: ヒトにおける特異的CTL応答の誘導)

本発明のCTLエピトープおよびHTLエピトープを含む免疫原性組成物についてのヒト臨床試験を、INDフェーズI、用量上昇研究として設定し、そして無作為化した二重盲検偽薬制御試験として実施する。そのような試験を、例えば、以下のように設計した:

全体で約27人の個体を登録し、そして3つのグループに分ける;

グループI: 3人の被験体に偽薬を注射し、そして6人の被験体に5 μgのペプチド組成物を注射する;

グループII: 3人の被験体に偽薬を注射し、そして6人の被験体に50 μgのペプチド

組成物を注射する；

グループ I I I：3人の被験体に偽薬を注射し、そして6人の被験体に500 μ gのペプチド組成物を注射する。

【0468】

最初の注射の4週間後に、全ての被験体に同じ投与量で追加免疫接種した。

【0469】

この研究において測定される終点は、このペプチド組成物の安全性および安定性、ならびにその免疫原性に関連する。このペプチド組成物に対する細胞性免疫応答は、このペプチド組成物の固有の活性の指標であり、従って生物学的有効性の尺度として見られ得る。以下は、安全性および有効性の終点に関する臨床データおよび研究室データを要約する。

10

【0470】

安全性：有害な事象の影響を、偽薬処置群および薬物処置群においてモニターし、そしてその程度および可逆性をもって評価する。

【0471】

ワクチン有効性の評価：ワクチン有効性の評価のために、注射前後に、被験体から採血する。末梢血液単核細胞を、Ficoll Hypaque密度勾配遠心分離により新しいヘパリン化血液から単離し、凍結媒体中にアリコート化し、そして凍結保存する。サンプルを、CTL活性およびHTL活性についてアッセイする。

【0472】

ワクチンが、安全でありかつ有効の両方であることが見出される。

20

【0473】

(実施例28：205P1B5を発現する患者におけるフェーズII試験)

フェーズII試験を、205P1B5を発現する癌を有する患者へのCTL-HTLペプチド組成物の投与の有効性を研究するために実施する。この試験の主要な目的は、205P1B5を発現する癌患者においてCTLを誘導するために有効な用量とレジメンを決定すること、これらの患者においてCTL応答およびHTL応答を誘導することの安全性を確立すること、ならびに、どの程度のCTLの活性化が、明らかになるような、これらの患者の臨床像を改善するかをみること(例えば、病巣の減少および/または萎縮により)である。このような研究を、例えば、以下のように設計する。

【0474】

30

この研究を、複数の中枢において実施する。この試験の設計は、オープンラベル(open-label)、未制御、用量上昇プロトコルであり、ここで、このペプチド組成物を、単回容量として投与し、続いて、6週間後に同じ用量の単回の追加免疫注射を行う。この投与量は、注射一回あたり50 μ g、500 μ g、および5,000 μ gである。薬物関連の有害な効果(重篤度および可逆性)を記録する。

【0475】

3つの患者のグループ分けをする。第一のグループに50 μ gのこのペプチド組成物を注射し、第二および第三のグループにそれぞれ、500 μ gおよび5,000 μ gのペプチド組成物を注射する。各々のグループ内の患者は、21歳~65歳の範囲であり、そして種々の人種集団バックグラウンドを示す。彼らの全ては、205P1B5を発現する腫瘍を有する。

40

【0476】

臨床的発現または抗原特異的T細胞応答を、このペプチド組成物を投与することの効果を評価するためにモニタリングする。このワクチン組成物が、205P1B5関連疾患の処置において安全かつ有効の両方であることが見出される。

【0477】

(実施例29：プライムブーストプロトコルを用いるCTL応答の誘導)

「プラスミド構築物およびそれが誘導する免疫原性の程度」と題された上記実施例において記載されるような、トランスジェニックマウスにおけるDNAワクチンの有効性を確認するために使用される原理の根底にある原理に類似するプライムブーストプロトコルをま

50

た、ヒトにワクチンを投与するために使用し得る。そのようなワクチンレジメンは、例えば、裸のDNAの最初の投与と、そのワクチンをコードする組み換えウイルス、またはアジュバント中で投与される組み換えタンパク質／ポリペプチドもしくはペプチド混合物の投与を用いるその後のブーストを含み得る。

【0478】

例えば、最初の免疫を、発現ベクター（例えば、「ミニ遺伝子」マルチエプトープDNAプラスミドの構築」と題した実施例において構築されるような発現ベクター）を、複数の部位で0.5mg～5mgの量でIM（またはSCまたはID）投与される裸の核酸の形態で用いて実施し得る。この核酸（0.1μg～1000μg）をまた、遺伝子ガンを用いて投与し得る。3～4週間のインキュベーション期間の後、次いで、ブースター用量を投与する。このブースターは、 5×10^7 pfu～ 5×10^9 pfuの用量で投与される組み換え鶏痘ウイルスであり得る。代替的な組み換えウイルス（例えば、MVAウイルス、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルス）をまた、ブースターのために使用し得るか、またはポリエプトープ（polyepitopic）タンパク質もしくはこれらのペプチドの混合物を投与し得る。ワクチン有効性の評価のために、免疫前ならびに最初のワクチンおよびワクチンのブースター用量の投与後間隔を空けて患者の血液サンプルを得る。抹消血液単核細胞を、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心分離により新しいヘパリン化血液から単離し、凍結培体中にアリコート化し、そして凍結保存する。サンプルを、CTL活性およびHTL活性についてアッセイする。

10

【0479】

これらの結果の分析は、205P1B5に対する治療的免疫または保護免疫を達成するのに十分な強度の応答が産生されることを示す。

20

【0480】

（実施例30：樹状細胞（DC）を用いるワクチン組成物の投与）

本発明のペプチドエプトープを含むワクチンを、APCまたは「プロフェッショナル」APC（例えば、DC）を用いて投与し得る。本実施例において、ペプチドパルスされたDCを、患者に投与して、インビボでのCTL応答を刺激する。この方法において、樹状細胞を、単離し、伸長させ、そして本発明のペプチドCTLエプトープおよびペプチドHTLエプトープを含むワクチンでパルスする。これらの樹状細胞を患者に注入して戻し、インビボでCTL応答およびHTL応答を誘発させる。次いで、誘導されたCTLおよびHTLは、このワクチンにおけるエプトープが由来する205P1B5タンパク質を保有する標的細胞をそれぞれ破壊するか、または破壊を促進する。

30

【0481】

例えば、エプトープ含有ペプチドのカクテルを、PBMCにエキソビボで投与するか、またはそれからDCを単離する。DCの回収を容易にするための医薬（例えば、Progenipoi et inTM（Monsanto、St. Louis、MO）またはGM-CSF／IL-4）を用い得る。ペプチドを用いてDCをパルスした後、および患者への再注入の前に、このDCを洗浄して、結合していないペプチドを除去する。

【0482】

臨床的に理解され、そして臨床的結果に基づいて当業者により容易に決定されるように、患者に再注入されるDCの数は変化し得る（例えば、Nature Med. 4：328、1998；Nature Med. 2：52、1996およびProstate 32：272、1997を参照のこと）。患者1人あたり2～50×10⁶ DCを代表的に投与するが、より多い数のDC（例えば、10⁷ または10⁸）もまた、提供し得る。そのような細胞集団は、代表的に、50%～90%の間のDCを含む。

40

【0483】

いくつかの実施形態において、ペプチド充填PBMCを、DCを精製することなく患者に注射する。例えば、薬剤（例えば、Progenipoi et inTM）での処理の後に産生されたPBMCを、DCを精製することなく患者に注射する。投与されるPBMCの総数は、しばしば、10⁸～10¹⁰の範囲をとる。一般的に、患者に注射される細胞用

50

量は、例えば、特異的な抗DC抗体を用いる免疫蛍光分析により決定されるような、各々の患者の血液中のDCのパーセンテージに基づく。従って、例えば、ProgenipoietinTMが所定の患者の末梢血液中の2%のDCを起動し(mobilize)、そしてその患者が 5×10^6 DCを受容している場合、次いで、この患者に、合計 2.5×10^8 ペプチド充填PBMCを注射する。薬剤(例えば、ProgenipoietinTM)により起動したDC%は、代表的に、2~10%の間であると評価されるが、当業者に理解されるように変化し得る。

【0484】

(エキソビボでのCTL/HTL応答の活性化)

あるいは、エキソビボの205P1B5抗原に対するCTL応答またはHTL応答は、DCのようなAPCの供給源および免疫原性ペプチドと共に、患者の、または遺伝的に適合性のCTL前駆体細胞またはHTL前駆体細胞を、組織培養中でインキュベーションすることによって誘導され得る。適切なインキュベーション時間(典型的には約7~28日間)後、その前駆体細胞は活性化され、そしてエフェクター細胞中に拡大された。このエフェクター細胞は患者中に注入され、特異的標的細胞(すなわち、腫瘍細胞)を破壊する(CTL)かまたは破壊を促進する(HTL)。

【0485】

(実施例31:モチーフ保有ペプチドの同定および確認の代替方法)

モチーフ保有ペプチドを同定および確認する別の方法は、規定されたMHC分子を保有する細胞からそのペプチドを溶出することである。例えば、組織型決定に使用されるEBVで形質転換されたB細胞株は、どのHLA分子をこれらが発現するかを決定するように広範に特徴付けられている。特定の場合において、これらの細胞は、HLA分子の単一型のみを発現する。これらの細胞は、目的の抗原(例えば、205P1B5)を発現する核酸でトランスフェクトされ得る。次いで、トランスフェクトの結果として産生されるペプチドの内在性抗原プロセッシングによって産生されるペプチドは、細胞内のHLA分子に結合し、そして輸送されて細胞表面に提示される。次いで、温和な酸条件にさらすことによって、ペプチドをHLA分子から溶出し、そしてこれらのアミノ酸配列を決定する(例えば、質量分析器(例えば、Kubota, J. Immunol. 152:3913, 1994)を使用して)。特定のHLA分子に結合するペプチドの大部分はモチーフを保有しているために、これは、細胞上で発現される特定のHLA分子と関連するモチーフ保有ペプチドを得るための代替の様式である。

【0486】

あるいは、内在性HLA分子を発現しない細胞株は、単一のHLA対立遺伝子をコードする発現構築物でトランスフェクトされ得る。次いで、これらの細胞は、記載されるように使用され得る(すなわち、これらの細胞は、細胞表面上に提示される205P1B5に対応するペプチドを単離するために、205P1B5をコードする核酸でトランスフェクトされ得る)。このような分析から得られたペプチドは、細胞中で発現される単一のHLA対立遺伝子への結合に対応するモチーフを保有する。

【0487】

当業者に理解されるように、1つより多いHLA対立遺伝子を保有する細胞における同様の分析、そしてそれに続く発現された各々のHLA対立遺伝子に対して特異的なペプチドの決定が実施され得る。さらに、当業者はまた、タンパク質抗原でのローディングのようなトランスフェクション以外の手段が、細胞に対する抗原供給源の提供のために使用され得ることを認識する。

【0488】

(実施例32:相補ポリヌクレオチド)

205P1B5コード配列またはその任意の部分に相補的な配列を使用して、天然に存在する205P1B5の発現を検出するか、減少するか、または阻害する。約15~30塩基対からなるオリゴヌクレオチドの使用が記載されるが、実質的には、より小さい配列フラグメントまたはより大きい配列フラグメントを用いて同一の手段を使用する。適切なオ

リゴヌクレオチドは、例えば、OLIGO 4. 06 ソフトウェア (National Biosciences) および 205 P1 B5 のコード配列を使用して設計される。転写を阻害するために、相補オリゴヌクレオチドを、最も独特な 5' 側配列から設計し、そしてその相補オリゴヌクレオチドを使用して、コード配列へのプロモーターの結合を阻止する。翻訳を阻害するために、相補オリゴヌクレオチドを設計して、205 P1 B5 をコードする転写産物へのリボソーム結合を阻止する。

【0489】

(実施例 33: 205 P1 B5 特異的抗体を使用する、天然に存在する 205 P1 B5 または組換え 205 P1 B5 の精製)

天然に存在する 205 P1 B5 または組換え 205 P1 B5 は、205 P1 B5 に特異的な抗体を使用して、免疫親和性クロマトグラフィーによって実質的に精製される。免疫親和性カラムを、活性化されたクロマトグラフィー樹脂 (例えば、CNBr-活性化 SEP H A R O S E (Amersham Pharmacia Biotech)) に抗 205 P1 B5 抗体を共有結合させることによって構築する。この結合後、樹脂をブロックし、そして製造者の指示書に従って洗浄する。

【0490】

205 P1 B5 を含む培地を、免疫親和性カラムを通過させ、そしてそのカラムを 205 P1 B5 を優先的に吸着する条件下 (例えば、界面活性剤の存在下における高イオン強度緩衝液) で洗浄する。このカラムを、抗体/205 P1 B5 の結合を妨害する条件下 (例えば、pH 2 ~ pH 3 の緩衝液、または高濃度のカオトロップ (例えば、尿素またはチオシアネートイオン)) で溶出し、そして GCR. P を回収する。

【0491】

(実施例 34: 205 P1 B5 と相互作用する分子の同定)

205 P1 B5 または生物学的に活性なそのフラグメントを、121 1 Bolton-Hunter 試薬で標識する。(例えば、Bolton ら (1973) Biochem. J. 133: 529. を参照のこと。) マルチウエルプレートのウェル中に事前に並べられた候補分子を、標識した 205 P1 B5 とインキュベートし、洗浄し、そして標識された 205 P1 B5 複合体を有する任意のウェルをアッセイする。異なる濃度の 205 P1 B5 を使用して得られたデータを使用して、205 P1 B5 の数、親和性、および 205 P1 B5 と候補分子との会合の値を算出する。

【0492】

(実施例 35: 205 P1 B5 腫瘍増殖促進についてのインビボアッセイ)

腫瘍細胞増殖に対する 205 P1 B5 タンパク質の効果を、腫瘍保有マウスでの遺伝子の過剰発現によってインビボで評価する。例えば、SCID マウスに、 1×10^6 個の、PC3 細胞、TSUPR1 細胞、または DU145 細胞のいずれか (tkNeo 空ベクター (empty vector) または 205 P1 B5 を含む) を、各側腹部に皮下注射し得る。以下の少なくとも 2 つのストラテジーを使用し得る: (1) ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス (UK2, 211, 504 (1989 年 7 月 5 日公開))、アデノウイルス (例えば、アデノウイルス 2)、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス 40 (SV40) のようなウイルスのゲノムまたは異種哺乳動物プロモーター (例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター) (これらのプロモーターが宿主細胞系と適合性である限り) から得られる構築プロモーターのようなプロモーターの制御下での構成的 205 P1 B5 の発現、ならびに (2) 誘導性ベクター系 (例えば、エクジソン、tet など) の制御下での調節された発現 (これらのプロモーターが宿主細胞系と適合性である限り)。次いで、腫瘍体積を、明らかな腫瘍の出現においてモニターし、205 P1 B5 発現細胞がより早い速度で増殖し、205 P1 B5 発現細胞によって産生される腫瘍が変化された病原力 (例えば、増強された転移、血管新生、化学療法薬物に対する減少された応答) の特徴を示すことを確認する時間続ける。

【0493】

さらに、マウスに 1×10^5 個の同じ細胞を同所移植して、205P1B5が、前立腺における局所増殖に対する効果または細胞が肺、リンパ節、および骨髄に特異的に転移する能力に対する効果を有するか否かを決定し得る。

【0494】

このアッセイはまた、候補治療組成物（例えば、205P1B5細胞内発現抗体（intrabody）、205P1B5アンチセンス分子およびリボザイム）の205P1B5阻害効果を決定するために有用である。

【0495】

（実施例36：インビボにおける前立腺腫瘍の205P1B5モノクローナル抗体媒介性阻害）

癌組織における205P1B5の有意な発現、および正常組織において予測された細胞表面発現と共にその制限された発現は、205P1B5を、抗体治療の優れた標的にする。同様に205P1B5は、T細胞ベースの免疫治療のための標的である。従って、ヒト前立腺癌異種移植マウスモデルにおける抗205P1B5mAbの治療有効性を、アンドロゲン非依存性LAPC-4異種移植片およびLAPC-9異種移植片（Craft, N. ら, Cancer Res, 1999, 59 (19) 5030-6頁）およびアンドロゲン非依存性組み換え細胞株PC3-205P1B5（例えば、Kaighn, M. E. ら, Invest Urol, 1979, 17 (1) : 16-23頁を参照のこと）を使用することにより評価する。

【0496】

腫瘍増殖および転移形成における抗体効果は、例えば、マウスの異種移植片モデルにおいて研究される。この抗体は、当業者に理解されるような治療様式と実施例に議論されるように組み合わせられ得ないか、または組み合わせられ得る。抗205P1B5 mAbは、アンドロゲン依存性LAPC-9腫瘍異種移植片およびアンドロゲン依存性PC3-205P1B5腫瘍異種移植片の両方の形成を阻害する。抗205P1B5 mAbはまた、確立された同所性腫瘍の増殖を遅らせ、そして腫瘍保有マウスの生存を延長させる。これらの結果は、前立腺癌の局所的段階および進行した段階の処置における抗205P1B5 mAbの有効性を示す（例えば、Saffran, D. ら, PNAS 10:1073-1078またはworld wide web URL pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698を参照のこと）。

【0497】

抗205P1B5 mAbの投与は、確立された同所性腫瘍増殖を遅らせ、そして離れた部位への転位を阻害し、腫瘍保有マウスの生存の有意な延長を生じる。これらの研究は、205P1B5が、免疫治療のための魅力的な標的であることを示し、そして局所性および転移性の前立腺癌の処置のための抗205P1B5 mAbの治療可能性を示す。この実施例は、SCIDマウス中で増殖されるヒト前立腺腫瘍異種移植片の増殖を阻害するために、非結合体化205P1B5モノクローナル抗体が有効であることを示し；従って、このような有効なモノクローナル抗体の組み合わせがまた、有効である。

【0498】

（複数の非結合体化205P1B5 mAbを使用する腫瘍阻害）

（材料および方法）

（205P1B5モノクローナル抗体）：

モノクローナル抗体は、表題「Generation of 205P1B5 Monoclonal Antibodies (mAbs)」の実施例に記載されるように、205P1B5に対して惹起される。この抗体は、205P1B5に結合し得るそれらの能力について、ELISA、ウェスタンブロット、FACS、および免疫沈降によって特徴付けられる。ELISAおよびウェスタン分析によって測定されるような抗205P1B5 mAbについてのエピトープマッピングデータは、205P1B5タンパク質上のエピトープを認識する。前立腺癌組織および細胞の、これらの抗体を用いる免疫組織化学分析が実施される。

10

20

30

40

50

【0499】

モノクローナル抗体が、プロテインGセファロースクロマトグラフィー、PBSに対する透析、フィルター滅菌、および-20℃での貯蔵によって復水またはハイブリドーマ組織培養上清から精製される。タンパク質測定をBradfordアッセイ(Bio-Rad, Hercules, CA)によって実施する。治療モノクローナル抗体または個々のモノクローナル抗体の混合物を含むカクテルを調製し、LAPC-9前立腺腫瘍異種移植片の皮下または同所的な注射を受けるマウスの処置のために使用する。

【0500】

(前立腺癌異種移植片および細胞株)

LAPC-9異種移植片(野生型アンドロゲンレセプターを発現し、そして前立腺特異的抗原(PSA)を産生する)を、皮下トロカル移植により、6~8週齢の雄性ICR重篤複合免疫不全(SCID)マウス(Taconic Farms)において継代する(Craft, N.ら、前出)。LAPC-9腫瘍細胞の単一細胞懸濁液を、Craftらに記載されるように調製する。前立腺癌細胞株PC3(American Type Culture Collection)を、L-グルタミン酸および10%(体積/体積)FBSを補充したDMEM中で維持する。

【0501】

PC3-205P1B5細胞集団を、Hubert, R. S.ら, STEAP: ヒト前立腺腫瘍において高度に発現される前立腺特異的細胞表面抗原(Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(25): 14523-8頁)に記載されるようにレトロウイルス遺伝子の移送によって作製する。抗205P1B5染色を、FITC結合体化ヤギ抗マウス抗体(Southern Biotechnology Associates)を使用し、次いでCoulter Epics-XLフローサイトメーターで分析することにより検出する。

【0502】

(異種移植片マウスモデル)

皮下(s.c.)腫瘍を、雄SCIDマウスの右脇腹に、Matrigel(Collaborative Research)と1:1の希釈で混合された 1×10^6 個のLAPC-9細胞、PC3細胞、PC3-205P1B5細胞を注射することによって作製する。腫瘍形成における抗体効果を試験するために、i.p.抗体注射を、腫瘍細胞注射と同じ日に開始する。コントロールとして、マウスに、精製マウスIgG(ICN)もしくはPBS;またはヒト細胞中に発現されない無関係の抗原を認識する精製モノクローナル抗体のいずれかを注射する。予備研究において、腫瘍増殖におけるマウスIgGまたはPBSの間に差異は見られない。腫瘍サイズは、ノギス測定によって決定され、そして腫瘍体積は、長さ×幅×高さから算出される。1.5cmよりも大きい直径のs.c.腫瘍を有するマウスを屠殺する。PSAレベルを、PSA ELISAキット(Anogen, Mississauga, Ontario)を使用することにより決定する。抗205P1B5 mAbの循環レベルを、捕捉ELISAキット(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)により決定する。(例えば、Saffran, D.ら, PNAS 10:1073-1078またはworld wide web URL pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698を参照のこと)。

【0503】

同所性の注射をケタミン/キシラジンを使用することによって、麻酔下で実施する。膀胱および精嚢を曝露するために腹筋を通して切開し、次いで同所性研究のために、前立腺背部を曝露するために切開を送達する。Matrigelと混合されたLAPC-9細胞(5×10^5 個)を10μl容量で各背部葉に注射する。腫瘍成長をモニターするために、PSAレベルを測定するために1週間おきにマウスを採血する。このPSAレベルに基づいて、このマウスを適切な処置のためにグループに分離する。樹立された同所腫瘍に対する抗205P1B5 mAbの効果を試験するために、i.p.抗体注射を、PSAレベ

10

20

30

40

50

ルが $2 \sim 80 \text{ ng/ml}$ に到達する場合に開始する。

【0504】

(抗205P1B5 mAbは、205P1B5発現前立腺癌腫瘍の増殖を阻害する) 腫瘍形成に対する抗205P1B5 mAbの効果、LAPC-9同所性モデルを使用して試験する。s.c.腫瘍モデルと比較して、同所性モデルは、マウスの前立腺における腫瘍細胞の直接的な注射を必要とし、局所的腫瘍増殖、遠位部位への転移の発達、マウスの健康の悪化、およびそれに続く死を生じる(Saffran, D.ら, PNAS (前出); Fu, X.ら, Int J Cancer, 1992, 52(6): p. 987-90; Kubota, T., J Cell Biochem, 1994, 56(1): p. 4-8)。この特徴は、同所性モデルをより代表的なヒトの疾患進行のモデルとし、そして臨床的に関連する終点におけるmAbの治療効果をもたらすことを可能にする。 10

【0505】

従って、LAPC-9腫瘍細胞をマウスの前立腺に注射し、そして2日後、このマウスを2つのグループに分けて以下のいずれかで処理する: a) $50 \sim 2000 \mu\text{g}$ (通常、 $200 \sim 500 \mu\text{g}$) の抗205P1B5 Ab、またはb) PBS (2~5週間の間、1週間に3度)。マウスを、腫瘍成長の指標として循環PSAレベルについて週に一度モニタリングする。

【0506】

同所性前立腺癌モデルの主要な利点は、転移の発達を研究するための能力である。確立された同所性腫瘍を保有するマウス中の転移の形成は、LAPC-9異種移植片において高レベルで発現される前立腺特異的細胞表面タンパク質STEAPに対する抗体を使用して肺切片におけるIHC分析によって研究される(Hurbert, R. S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(25): 14523-8)。 20

【0507】

樹立された同所性LAPC-9腫瘍を保有するマウスは、4週間にわたって抗205P1B5 mAbまたはPBSのいずれかの $1000 \mu\text{g}$ 注射を投与される。両方のグループのマウスは、高い全身腫瘍組織量(300 ng/ml より高いPSAレベル)を確立し得、マウスの肺における転移形成を確実に高頻度にさせる。次いで、マウスを殺傷し、それらの前立腺および肺を抗STEAP IHC分析によってLAPC-9細胞の存在について分析する。 30

【0508】

これらの研究は、異種移植片マウスモデル中の前立腺癌の発生および進行における、抗205P1B5抗体の広範な抗腫瘍効果を示す。抗205P1B5抗体は、アンドロゲン依存性腫瘍およびアンドロゲン非依存性腫瘍の腫瘍形成を阻害し、既に確立された腫瘍の増殖を遅らせ、処置されたマウスの生存を延長させる。さらに、抗205P1B5 mAbは、大きい全身腫瘍組織量の存在下でさえも局所的な前立腺腫瘍の、遠位部位への拡散に対して劇的な阻害効果を示す。従って、抗205P1B5 mAbは、主要な臨床的に関連する終点/PSAレベル(腫瘍増殖)、生存性の延長および健康に対して効果的である。

【0509】

(実施例37: 既知の遺伝子との205P1B5の比較) 205P1B5は、 59.7 kDa の計算された分子量、および5.69のpIを有する529アミノ酸のタンパク質である。図4に示されるように、205P1B5は、ヒトコリン作用性レセプター、ニコチン性 α ポリペプチド2(gi:12734121)に対して100%の同一性を示す。205P1B5は、イオン輸送体として機能する細胞表面タンパク質であると推定される(Vizi ESおよびLendvai B. Brain Res Brain Res Rev. 1999, 30: 219; Shao ZおよびYakel J.L. J Physiol. 2000, 527: 507)。Vizi et Lendvaiにより記載されるように、ニコチン性アセチルコリンレセプターは、シナプス位置および非シナプス位置の両方におけるカルシウムシグナル伝達およびナトリウム 40 50

シグナル伝達に關与する (Vizi ES および Lendvai B. Brain Res Brain Res Rev. 1999, 30:219)。ニコチン性コリン作用性レセプターの発現は、小細胞肺癌において示されており、ここでこれらは、機能的に活性であり、そして刺激に応じてカルシウムフラックスを誘導する (Coddignola A ら、FEBS Lett. 1994, 342:286)。従って、コリン作用性レセプターの存在または効果を調節する物質は、本明細書中に開示される疾患状態 (例えば、表 I に列挙される癌) の診断、予防、予後および／または処置に使用される。

【0510】

(実施例 38: 潜在的なシグナル伝達経路の同定)

多くの哺乳動物のタンパク質は、シグナル伝達分子と相互作用し、そしてシグナル伝達経路を調節する役割を担うことが報告されている (J Neurochem. 2001; 76:217-223)。免疫沈降技術およびウェスタンブロッティング技術を使用して、205P1B5 と結合し、そしてシグナル伝達事象を媒介するタンパク質を同定する。リン脂質経路 (例えば、PI3K、AKT など)、接着経路および移動経路 (FAK、Rho、Rac-1 などを含む)、ならびに ERK、p38 などのような有糸分裂／生存カスケードを含む、癌の生物学において役割を果たすことが知られるいくつかの経路が、種々のこれらの遺伝子によって調節され得る (Cell Growth Differ. 2000, 11:279; J Biol Chem. 1999, 274:801; Oncogene. 2000, 19:3003; J. Cell Biol. 1997, 138:913)。ウェスタンブロッティング技術を使用して、205P1B5 がこれらの経路を調節する能力を調べる。205P1B5 を発現する細胞およびこれらの遺伝子を欠損した細胞を、未処理のままか、またはイオン、チャネルアクチベーター、または抗体で刺激した、いずれかの状態に置く。ERK、p38、AKT、PI3K、PLC および他のシグナル伝達分子のリン酸化および調節を検出するために、抗ホスホ特異的抗体 (Cell Signaling, Santa Cruz Biotechnology) を使用して、細胞溶解物を分析する。

【0511】

205P1B5 はシグナル伝達経路において、単独であれ協調的であれ、調節の役割を果たすので、これは、診断目的、予防目的および治療目的の標的として使用される。

【0512】

205P1B5 が細胞内で、直接的または間接的に既知のシグナル伝達経路を活性化することを確認するために、個々の遺伝子を発現する細胞において、ルシフェラーゼ (luc) ベースの転写レポーターアッセイを実行する。これらの転写レポーターは、十分に特徴付けられたシグナル伝達経路の下流に存在する、既知の転写因子についてのコンセンサス結合部位を含む。レポーターおよびこれらの関連転写因子の例、シグナル伝達経路、ならびに活性化刺激を、以下に列挙する。

【0513】

1. NFκB-luc、NFκB/Rel; Iκ-キナーゼ/SAPK; 増殖/アポトーシス/ストレス
2. SRE-luc、SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; 増殖/分化
3. AP-1-luc、FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; 増殖/アポトーシス/ストレス
4. ARE-luc、アンドロゲンレセプター; ステロイド/MAPK; 増殖/分化/アポトーシス
5. p53-luc、p53; SAPK; 増殖/分化/アポトーシス
6. CRE-luc、CREB/ATF2; PKA/p38; 増殖/アポトーシス/ストレス。

【0514】

遺伝子媒介性の影響を、mRNA 発現を示す細胞においてアッセイする。ルシフェラーゼレポータープラスミドを、脂質媒介性トランスフェクション (TFX-50、Promega) を用いて導入する。

g a) によって導入し得る。細胞抽出物をルシフェリン基質と共にインキュベートすることによって、相対的な転写活性の指標であるルシフェラーゼ活性を測定し、そしてこの反応の発光をルミノメーターでモニタリングする。205P1B5によって活性化されるシグナル伝達経路をマップし、そして治療標的の同定および確認のために使用する。これらの遺伝子は、細胞シグナル伝達に関するもので、これらは、診断目的、予防目的および治療目的の標的として使用される。

【0515】

(実施例39：腫瘍進行との関与)

205P1B5は、癌細胞の増殖に寄与し得る。腫瘍増殖における205P1B5の役割を、種々の初代細胞株またはトランスフェクトした細胞株（前立腺細胞株、結腸細胞株、膀胱細胞株および腎臓細胞株、ならびに205P1B5を安定に発現するよう操作されたNIH 3T3細胞が挙げられる）において研究する。本発明者らの205P1B5を欠損した親細胞およびこの遺伝子を発現する細胞を、十分に記載された増殖アッセイ（Fraser SP, Grimes JA, Djamgoz MB. Prostate 2000; 44: 61, Johnson DE, Ochieng J, Evans SL. Anticancer Drugs. 1996, 7: 288）を使用して細胞増殖について評価する。コントロール3T3および3T3-205P1B5の増殖を、Alamarブルーアッセイを使用して比較した。コントロール細胞および205P1B5発現細胞を、0.5%または10%のFBS中で増殖させ、48時間後および72時間後に分析した。図16に示されるように、205P1B5の発現は、205P1B5を安定に発現するNIH 3T3細胞の増殖を増強した。これらの結果は、205P1B5が腫瘍細胞増殖において、決定的な役割を果たすことを示す。

【0516】

形質転換プロセスにおける205P1B5の役割を確認するために、コロニー形成アッセイにおいて205P1B5の効果を評価する。ストリンジェントな条件下およびより許容的な条件下でのソフトアガーアッセイ（Song Z.ら Cancer Res. 2000; 60: 6730）を使用して、205P1B5を欠損した親NIH 3T3細胞を、205P1B5を発現するNIH-3T3細胞と比較する。205P1B5が、細胞の形質転換を引き起こすことがわかる。

【0517】

癌細胞の侵襲および転移における205P1B5の役割を確認するために、十分に確立されたTranswell Insert Systemアッセイ（Becton Dickinson）（Cancer Res. 1999; 59: 6010））を使用する。コントロール細胞（205P1B5を欠損する前立腺細胞株、結腸細胞株、膀胱細胞株および腎細胞株を含む）を、205P1B5を発現する細胞と比較する。細胞に、蛍光染料（カルセインをロードし、そして細胞を基底膜アナログでコートされたトランスウェル挿入（transwell insert）の上部ウェルにプレーティングする。侵襲を、細胞集団全体の蛍光に対する、下方チャンバー中の細胞の蛍光によって決定する。205P1B5が、侵襲を引き起こすことがわかる。

【0518】

205P1B5はまた、細胞周期およびアポトーシスにおいて役割を果たし得る。親細胞および205P1B5を発現する細胞を、十分に確立されたBrdUアッセイ（Abdel-Malek ZA. J Cell Physiol. 1988, 136: 247））を使用して細胞周期調節における差異について比較する。簡単に言えば、細胞を、最適な条件下（十分な血清）および限定された条件下（低血清）の両方で増殖させ、BrdUで標識し、そして抗BrdU Abおよびヨウ化プロピジウムで染色する。細胞を、細胞周期のG1期、S期およびG2M期への進入について分析する。あるいは、アポトーシスに対するストレスの効果を、コントロール親細胞および考慮中の遺伝子を発現する細胞（正常および腫瘍性の前立腺細胞、結腸細胞および肺細胞を含む）において評価する。操作された細胞および親細胞を、様々な化学療法剤（例えば、エトポシド、フルタミドなど）およ

びタンパク質合成インヒビター（例えば、シクロヘキシミド）で処理する。細胞を、アネキシンV-FITCで染色し、そして細胞死をFACS分析によって測定する。205P1B5は、細胞周期およびアポトーシスに悪影響を与えることがわかる。

【0519】

205P1B5の機能を、上記の種々の機能アッセイ（例えば、増殖、侵襲および移動）と組み合わせたアンチセンスRNA技術を使用して評価する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、205P1B5発現細胞へと導入され得、それによって205P1B5の発現を防止する。コントロール細胞およびアンチセンス含有細胞を、増殖、侵襲、移動、アポトーシスの潜在性および転写の潜在性について分析する。205P1B5発現の欠失の局所的効果ならびに全身の効果を評価する。205P1B5発現は、性質（例えば、増殖、侵襲、移動、アポトーシスおよび転写）に悪影響を与えることがわかる。 10

【0520】

205P1B5が細胞増殖、形質転換、侵襲またはアポトーシスにおいて役割を果たす場合、診断目的、予防目的および治療目的のための標的として使用される。

【0521】

（実施例40：転写の調節）

様々なイオントランスポーターが、真核生物遺伝子の転写調節において役割を果たすことが示されている。遺伝子発現の調節は、205P1B5を発現するかまたは欠損する細胞における遺伝子発現を研究することによって評価され得る。この目的のために、2つの型の実験を行う。第1のセットの実験において、親細胞および遺伝子発現細胞由来のRNAを抽出し、そして市販される遺伝子アレイ（Clontech）にハイブリダイズする（Smid-Koopman Eら Br. J. Cancer. 2000. 83: 246）。休止細胞とイオン、FBSまたはアンドロゲンで処理した細胞とを比較する。差示的に発現した遺伝子を、当該分野で公知の手順に従って同定する。次いで、示差的に発現した遺伝子を、生物学的経路にマッピングする（Chen Kら Thyroid. 2001. 11: 41. を参照のこと）。 20

【0522】

第2のセットの実験において、特定の転写経路活性化を、市販されるルシフェラーゼレポーター構築物（Stratagene）（NFκB-luc、SRE-luc、ELK1-luc、ARE-luc、p53-lucおよびCRE-lucを含む）を使用して評価する。これらの転写レポーターは、十分に特徴付けられたシグナル変換経路の下流に位置する公知の転写因子に対するコンセンサスな結合部位を含み、そして経路活性化を確かめるためおよび経路活性化のポジティブな調節因子およびネガティブな調節因子についてスクリーニングするための良好なツールを表す。 30

【0523】

従って、205P1B5は、遺伝子調節に悪影響を与え、そして診断目的、予後目的、予防目的および治療目的のための標的として使用される。

【0524】

（実施例41：亜細胞の局在化および細胞結合）

生命情報科学分析および機能に基づいて、205P1B5は、細胞表面に局在することが示される。205P1B5の細胞の位置は、細胞生物学に広範に使用される亜細胞分別技術を使用して確認される（Storrie B, ら Methods Enzymol. 1990; 182: 203-25）。細胞株のバラエティー（前立腺細胞株、腎臓細胞株および膀胱細胞株を含む）は、核、細胞質および膜画分へと分離され得る。核、重膜（heavy membrane）（リソソーム、ペルオキシソームおよびミトコンドリア）、軽膜（light membrane）（形質膜および小胞体）および可溶性タンパク質画分における遺伝子発現および位置を、ウェスタンブロット技術を使用して試験する。 40

【0525】

あるいは、293T細胞は、205P1B5 HISタグ（PCDNA 3.1 MYC/HIS, Invitrogen）をコードする発現ベクターを用いてトランスフェクト 50

され、そして205P1B5の亜細胞局在化は、免疫蛍光によって確認される。あるいは、HISタグ205P1B5の位置決定の後、ウェスタンブロットを行って細胞表面の局在化を確認する。

【0526】

205P1B5が特定の亜細胞の場所（例えば、細胞表面）に局在化される場合、当業者により理解されるように、診断目的、予防目的および治療目的のための標的として使用される

（実施例42：タンパク質およびイオントランスポーター機能）

生命情報科学分析に基づいて、205P1B5は、トランスポーターとして機能することが示される。205P1B5がイオンチャネルとして機能することを確認するために、FACS分析および電気生理学技術を使用する（Gergely L, Cook L, Agnello V. Clin Diagn Lab Immunol. 1997; 4: 70; Skryma R, ら J Physiol. 2000, 527: 71）。FACS分析および市販の指標（Molecular Probes）を使用して、親細胞および205P1B5を発現する細胞を、カルシウム、ナトリウムおよびカリウムを輸送する能力についてそれらを比較する。前立腺、結腸、膀胱および腎臓の正常な細胞株および腫瘍細胞株を、これらの研究に使用する。例えば、カルシウム応答性指標（例えば、Fluo4およびFura red）をロードされた細胞を、イオンの存在または非存在下でインキュベートし、そしてフローサイトメトリーによって分析する。

【0527】

これらの手順に由来する情報は、癌細胞が205P1B5によって調節される重要な機構を確認する。205P1B5は、カルシウムの細胞内レベルを調節することによって前立腺癌増殖を調節する。注目すべきは、カルシウムチャネルインヒビターが、特定の癌細胞（前立腺癌細胞株を含む）の死を誘発することを報告している（Batra S, Popper LD, Hartley-Asp B. Prostate. 1991, 19: 299）。

【0528】

改変したローダミン保持アッセイ（Davies JらScience 2000, 290: 2295; Leith CらBlood 1995, 86: 2329）を使用して、205P1B5がタンパク質トランスポーターとして機能することを確認する。205P1B5を発現するかまたは欠損する細胞株（例えば、前立腺、結腸、膀胱および腎臓の癌細胞および正常細胞）を、Calcein AM（Molecular Probes）を用いてロードする。細胞を、蛍光顕微鏡またはフルオロメーターを使用して染料輸送について経時的に試験する。定量を、フルオロメーターを使用して行う（Holllo Z. らBiochim. Biophys. Acta. 1994. 1191: 384）。このような実験から得られた情報は、205P1B5が、腫瘍細胞から化学療法薬物（例えば、ドキソルビシン、パクリタキセル、エトポシドなど）を押出すことに役立ち、それによって、薬物含量を低くし、そして処置に対する腫瘍応答性を減少することを決定する。このようなシステムはまた、205P1B5が低分子の輸送に機能することを決定する。

【0529】

205P1B5がトランスポーターとして機能する場合、予防目的、予後目的、診断目的および／または治療目的ならびに薬物感受性／薬物耐性のための標的として使用される。

【0530】

電気生理学を使用して、注入されていない卵母細胞および遺伝子特異的cRNAを用いて注入された卵母細胞を、イオンチャネル活性について比較する。パッチ／電圧クランプアッセイを、選択したイオン（カルシウム、カリウム、ナトリウムなどを含む）の存在または非存在下で卵母細胞に対して行う。イオンチャネルアクチベーター（例えば、cAMP／GMP、フロスコリン、TPAなど）およびインヒビター（例えば、カルシクルジン（calciclude）、コノトキシン、TEA、テトロドトキシンなど）は、205P1B5がイオンチャネルとして機能することを確認する（Schweitz H. ら

Proc. Natl. Acad. Sci. 1994, 91:878; Skryma R.ら Prostate. 1997, 33:112)。類似の技術を使用して、hCaTが293T細胞でカルシウムフラックスを誘発することを近年証明した(Wissenbach, U.ら J. Biol. Chem. 2001, 276:19461)。この論文において示されたフラックスの大きさは、図Aに観察される大きさに類似し、hCaTは、前立腺癌細胞において発現された。

【0531】

従って、205P1B5がイオンチャネルとして機能し、そして診断目的、予防目的、予後目的および治療目的のための標的として使用される。

【0532】

(実施例43：細胞－細胞連絡における関与)

細胞－細胞連絡は、器官の完全性および恒常性（この両方は、腫瘍形成および腫瘍増殖の間、調節不全となる）を維持するのに必須である。細胞間連絡は、2つの型のアッセイを使用して測定され得る(J. Biol. Chem. 2000, 275:25207)。第1のアッセイにおいて、蛍光染料を用いてロードされた細胞を、標識されていないレシピエント細胞の存在下でインキュベートし、そして細胞集団を、蛍光顕微鏡下で調べる。この定性的アッセイは、隣接する細胞の間の染料の交換を測定する。第2のアッセイ系において、ドナー細胞集団およびレシピエント細胞集団を、上記のように処理し、そしてレシピエント細胞集団の定量測定を、FACS分析によって行う。これらの2つのアッセイ系を使用して、205P1B5を発現するかまたは205P1B5を欠損する細胞は、比較され、そして205P1B5が細胞連絡に悪影響を与えることを決定する。このアッセイはまた、細胞－細胞連絡を調節する低分子および／または特定の抗体を同定する。

【0533】

従って、205P1B5が細胞－細胞連絡に悪影響を与え、そして診断目的、予後目的、予防目的および治療目的のための標的として使用される。

【0534】

(実施例44：タンパク質－タンパク質相互作用)

いくつかのイオントランスポーターは、他のタンパク質と相互作用し、それによって、イオン輸送、細胞分裂、遺伝子転写および細胞形質転換を調節し得るタンパク質複合体を形成することが示されている(Biochem Biophys Res Commun. 2000, 277:611; J Biol Chem. 1999; 274:20812)。免疫沈降技術および酵母ツーハイブリッドシステムを使用して、205P1B5と会合するタンパク質を同定する。205P1B5を発現する細胞および205P1B5を欠損する細胞からの免疫沈降物を、特定のタンパク質－タンパク質会合について比較する。205P1B5はまた、例えば、エフェクター分子（例えば、アダプタータンパク質、SNAREタンパク質、シグナル分子、シタキシン、ATPaseサブユニットなど）と会合し得る(J Biol Chem. 1999; 274:20812; proc Natl Acad Sci USA 1998 95:14523)。205P1B5ポジティブ細胞および205P1B5ネガティブ細胞を比較する研究ならびに刺激されない細胞／休止細胞と上皮細胞アクチベーター（例えば、サイトカイン、成長因子、アンドロゲンおよび抗インテグリンAb）で処理された細胞を比較する研究は、独特の相互作用を明らかにする。

【0535】

さらに、タンパク質－タンパク質相互作用を、酵母ツーハイブリッド方法論を使用して確認する（例えば、Curr Opin Chem Biol. 1999, 3:64を参照のこと）。転写因子の活性化ドメインに融合したタンパク質のライブラリーを保有するベクターを、205P1B5-DNA-結合ドメイン融合タンパク質およびレポーター構築物を発現する酵母へと導入する。タンパク質－タンパク質相互作用を、比色レポーター活性によって検出する。エフェクター分子と転写因子との特異的会合は、当業者を205P1B5の作用様式に導き、従って、癌に対する治療的、予防的および／または診断的標的

10

20

30

40

50

を同定する。このアッセイおよび類似のアッセイをまた使用して、205P1B5と相互作用する低分子を同定し、そしてこのような低分子についてスクリーニングする。

【0536】

従って、205P1B5は、タンパク質および低分子と会合し、そして診断的、予後的、予防的および治療的目的のための標的として使用される。

【0537】

(実施例45：205P1B5の転写産物改変体)

転写産物改変体は、選択的転写または選択的スプライシングによる同一遺伝子からの成熟mRNAの改変体である。選択的転写産物は、同一遺伝子からの転写産物であるが、異なる点で転写を開始する。スプライシング改変体は、同一転写産物から差示的にスプライシングされたmRNA改変体である。真核生物において、複数のエキソンを有する遺伝子(mult-exon gene)が、ゲノムDNAから転写される場合、最初のRNAがスプライシングされて、エキソンのみを有しかつアミノ酸配列への翻訳に使用される機能的mRNAを産生する。従って、所定の遺伝子は、0から多くの選択的転写産物を有し得、そして各転写産物は、0から多くのスプライシング改変体を有し得る。各転写産物改変体は、独特のエキソン構成(makeup)を有し、そしてオリジナルの転写産物由来の異なるコード部分および／または非コード部分(5'末端または3'末端)を有し得る。転写産物改変体は、同一または同様の機能を有する同様または異なるタンパク質をコードしても、異なる機能を有するタンパク質をコードしてもよく、そして同一の時点で同一組織に発現しても、同一の時点で異なる組織に発現しても、異なる時点で同一の組織に発現しても、異なる時点で異なる組織に発現してもよい。転写産物改変体によりコードされるタンパク質は、同様または異なる細胞内局在または細胞外局在(例えば、分泌型)を有し得る。

【0538】

転写産物改変体は、当該分野において受容された種々の方法によって同定される。例えば、選択的な転写産物およびスプライシング改変体は、全長クローニング実験によって、または全長転写産物およびEST配列の使用によって、同定される。第1に、全てのヒトESTを、互いに直接的または間接的に同一性を示すクラスターにグループ化した。第2に、同一クラスター中のESTをさらに、サブクラスターにグループ化し、そしてコンセンサス配列に集合させた。オリジナルの遺伝子配列を、コンセンサス配列または他の全長配列と比較する。各コンセンサス配列は、その遺伝子についての潜在的なスプライシング改変体である(例えば、Kan, Z.ら、Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs, Genome Research, 2001 May, 11(5):889-900を参照のこと)。全長クローニングではない改変体が同定された場合でさえ、その改変体のその部分は、当該分野において公知の技術を使用する抗原生成および全長スプライシング改変体のさらなるクローニングに非常に有用である。

【0539】

さらに、ゲノム配列に基づいて転写産物改変体を同定するコンピュータープログラムが当該分野において利用可能である。ゲノムベースの転写産物改変体同定プログラムとしては、FgenesH(A. SalamovおよびV. Solovyev, 「Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA,」 Genome Research. 2000 April; 10(4):516-22); Grail(world wide web URL//compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm)およびGenScan(world wide web URL//genes.mit.edu/GENSCAN.html)が挙げられる。スプライシング改変体同定プロトコルの一般的議論については、例えば、以下を参照のこと: Southan, C., A genomic perspective on human proteases, FEBS Lett 50

. 2001 Jun 8; 498 (2-3): 214-8; de Souza, S. J. ら, Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags, Proc. Natl Acad Sci USA. 2000 Nov 7; 97 (23): 12690-3.

【0540】

転写産物改変体のパラメーターをさらに確認するために、種々の技術（例えば、全長クローニング、タンパク質確認 (proteomic validation)、PCRベースの確認、および5' RACE確認など）が当該分野において利用可能である（例えば、タンパク質確認：Brennan, S. O. ら, Albumin banks peninsula: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry, Biochem Biophys Acta. 1999 Aug 17; 1433 (1-2): 321-6; Ferranti P ら, Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha (s1)-casein, Eur J Biochem. 1997 Oct 1; 249 (1): 1-7を、PCRベースの確認については：Wellmann S ら, Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology, Clin Chem. 2001 Apr; 47 (4): 654-60; Jia, H. P. ら, Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach, Gene. 2001 Jan 24; 263 (1-2): 211-8を、PCRベースの確認および5' RACE確認については：Brigle, K. E. ら, Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms, Biochem Biophys Acta. 1997 Aug 7; 1353 (2): 191-8を参照のこと）。 10 20 30

【0541】

ゲノム領域が癌において調節されることは、当該分野において公知である。遺伝子マップに対するゲノム領域が特定の癌において調節される場合、その遺伝子の選択的な転写産物またはスプライシング改変体もまた調節される。205P1B5は癌に関連する特定の発現プロファイルを有するということが、本明細書中に開示される。205P1B5の選択的な転写産物およびスプライシング改変体はまた、同一または異なる組織における癌に関与し得、従って腫瘍関連マーカー／抗原として働く。

【0542】

（実施例46：205P1B5の単一ヌクレオチド多型）

単一ヌクレオチド多型 (SNP) は、ヌクレオチド配列中の単一塩基対改変である。ゲノム 40
 の特定の点で、可能性のある4つのヌクレオチド塩基対 (A/T、C/G、G/CおよびT/A) が存在する。遺伝子型は、個々のゲノム中の1つ以上の位置の塩基対構成 (make-up) をいう。ハプロタイプは、同一のDNA分子 (高等生物における染色体) 上の1つより多い変更された位置の塩基対構成をいう。cDNA上に生じるSNPは、cSNPと呼ばれる。これらのcSNPは、その遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸を変化し得、従ってそのタンパク質の機能を変化し得る。いくつかのSNPは、遺伝的疾患を生じ、そして他は、個体間の表現型および環境因子 (食餌および薬物を含む) に対する応答における定量的バリエーションに寄与する。従って、SNPおよび／または対立遺伝子の組み合わせ (ハプロタイプと呼ばれる) は、多くの適用 (遺伝的疾患の診断、薬物反応および投薬量の決定、疾患に应答性の遺伝子の同定、および個体間での遺伝的 50

関係を含む)を有する(P. Nowotny, J. M. KwonおよびA. M. Goate, 「SNP analysis to dissect human traits」*Curr. Opin. Neurobiol.* 2001 Oct; 11(5): 637-641; M. PirmohamedおよびB. K. Park, 「Genetic susceptibility to adverse drug reactions」*Trends Pharmacol. Sci.* 2001 Jun; 22(6): 298-305; J. H. Riley, C. J. Allan, E. LaiおよびA. Roses, 「The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes」*Pharmacogenomics*. 2000 Feb; 1(1): 39-47; R. Judson, J. C. StephensおよびA. Windemuth, 「The predictive power of haplotypes in clinical response」*Pharmacogenomics*. 2000 feb; 1(1): 15-26)。

【0543】

SNPは、当該分野において受容された種々の方法によって同定される(P. Bean, 「The promising voyage of SNP target discovery」*Am. Clin. Lab.* 2001 Oct-Nov; 20(9): 18-20; K. M. Weiss, 「In search of human variation」*Genome Res.* 1998 Jul; 8(7): 691-697; M. M. She, 「Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies」*Clin. Chem.* 2001 Feb; 47(2): 164-172)。例えば、SNPは、ゲルベースの方法(例えば、制限フラグメント長多型(RFLP)および変性勾配ゲル電気泳動(DGGE))によって多型を示すDNAフラグメントを配列決定することによって同定される。これらはまた、異なる個体からプールされたDNAサンプルの直接配列決定によってか、または異なるDNAサンプルからの配列を比較することによって、見出され得る。公的データベースおよび私的データベースにおける配列データの迅速な蓄積を用いて、コンピュータープログラム(Z. Gu, L. HillierおよびP. Y. Kwok, 「Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace」*Hum. Mutat.* 1998; 12(4): 221-225)を使用して配列を比較することによってSNPが見出され得る。SNPが確認され得、そして個々の遺伝型またはハプロタイプは、直接配列決定およびハイスループットマイクロアレイを含む種々の方法によって決定され得る(P. Y. Kwok, 「Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms」*Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001; 2: 235-258; M. Kokoris, K. Dix, K. Moynihan, J. Mathis, B. Erwin, P. Grass, B. HinesおよびA. Duesterhoeft, 「High-throughput SNP genotyping with the Masscode system」*Mol. Diagn.* 2000 Dec; 5(4): 329-340)。

【0544】

2つの改変体は、205P1B5について同定される。これらを図2および図3に示す。

【0545】

本出願の全体にわたって、様々なウェブサイトのデータコンテンツ、刊行物、特許出願および特許を参照する。(ウェブサイトは、Uniform Resource LocatorまたはURLによって、World Wide Web上のアドレスを参照される。各々これらの参照の開示は、これらの全体が本明細書中の参考として援用される。) 本発明は、本明細書中に開示される実施形態によって範囲を限定されるべきでなく、この

実施形態は、本発明の個々の局面の一つの例示として意図され、そして任意の機能的な等価物も、本発明の範囲内である。本明細書中に記載される改変に加えて、本発明のモデルおよび方法に対する種々の改変が、先の説明および教示から当業者に明らかになり、そして本発明の範囲内にいることが同様に意図される。このような改変または他の実施形態は、本発明の真の範囲および精神から逸脱することなく実施され得る。

【0546】

(表)

表 I : 悪性前立腺の場合に 205P1B5 を発現する組織。

【0547】

【表 2】

表 I I : アミノ酸略語

一文字	三文字	フルネーム
F	Phe	フェニルアラニン
L	Leu	ロイシン
S	Ser	セリン
Y	Tyr	チロシン
C	Cys	システイン
W	Trp	トリプトファン
P	Pro	プロリン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
I	Ile	イソロイシン
M	Met	メチオニン
T	Thr	トレオニン
N	Asn	アスパラギン
K	Lys	リジン
V	Val	バリン
A	Ala	アラニン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
G	Gly	グリシン

【0548】

【表 3】

10

20

30

表 111 : アミノ酸置換マトリクス

GCG ソフトウェア 9.0 BLOSUM62 アミノ酸置換マトリクス (ブロック置換マトリクス) にから適合された。
値が高いほど、関連する天然タンパク質において置換が見出される可能性が高くなる。(ワールドワイドウェブ
URL ikp.umibe.ch/manual/blosum62.html を参照のこと)

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
	9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C
		6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D
			5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E
				6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F
					6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G
						8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H
							4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I
								5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K
									4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L
										5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M
											6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N
												7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P
													5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q
														5	-1	-1	-3	-3	-2	R
															4	1	-2	-3	-2	S
																5	0	-2	-2	T
																	4	-3	-1	V
																		11	2	W
																			7	Y

10

20

【 0 5 4 9 】
【 表 4 】

表 IV A

スーパーモチーフ	位置	位置	位置
	2 (一次アンカー)	3 (一次アンカー)	C 末端 (一次アンカー)
A1	T LVMS		F WY
A2	L IVMAT Q		I VMAT L
A3	V SMAT L I		R K
A24	Y FWIV L MT		F IYW L M
B7	P		V ILFMW Y A
B27	R HK		F Y L WM I V A
B44	E D		F WY L IM V A
B58	A T S		F WY L IV M A
B62	Q LIV M P		F WY M IV L A
モチーフ			
A1	T S M		Y
A1		D E A S	Y
A2.1	L MV Q I A T		V LIM A T
A3	L MVISAT F CG D		K Y R H F A
A11	V T M LISAG N C D F		K RY H
A24	Y FW M		F LI W
A*3101	M V T ALIS		R K
A*3301	M VAL F IST		R K
A*6801	A VT M SLI		R K
B*0702	P		L MF W Y A IV
B*3501	P		L MF W Y I V A
B51	P		L IV F WY A M
B*5301	P		I MF W Y A LV
B*5401	P		A TIV L MF W Y

太字の残基が好ましく、斜体の残基は、あまり好ましくない。ペプチドは、上記表に特定されるようなモチーフまたはスーパーモチーフに対する各一次アンカー位置に一次アンカーを有する場合、モチーフを保有するとみなされる。

表 IV (B): HLA クラス II スーパーモチーフ

1	6	9
W, F, Y, V, I, L	A, V, I, L, P, C, S, T	A, V, I, L, C, S, T, M, Y

表 IV (C): HLA クラス II モチーフ

モチーフ	1°アンカー-1	2	3	4	5	1°アンカー-6	7	8	9
DR4	好ましい 有害な	FMYLVW	M	T		VSTCPALIM	MH R		MH WDE
DR1	好ましい 有害な	MFLIVWY	C	CH		VMATSP LIC	M		AVM
DR7	好ましい 有害な	MFLIVWY	M	W		IVMSACTPL	M		IV
DR3	好ましい モチーフ a	1°アンカー-1 LIVMFY	2	3	1°アンカー-4 D	1°アンカー-6	GRD	N	G
好ましい モチーフ b		LIVMFAY			DNQEST	KRH			
DR		MFLIVWY				VMSTACPLI			
スーパーモチーフ									

斜体の残基は、あまり好ましくない残基または「許容される」残基を示す。

10

20

30

40

表 IV (D): HLA クラス I スーパーモチーフ

スーパー モチーフ	位置:	1	2	3	4	5	6	7	8	C-末端
A1			1°アンカー TLVMS							1°アンカー FWY
A2			1°アンカー LIVMATQ							1°アンカー LIVMAT
A3	好ましい 有害な	DE (3/5); P (5/5)	1°アンカー VSMATLI	YFW (4/5) DE (4/5)		YFW (3/5)	YFW (4/5)	P (4/5)		1°アンカー RK
A24			1°アンカー YFWIVLMT							1°アンカー FIYWLMT
B7	好ましい 有害な	FWY (5/5) LIVM (3/5); DE (3/5); P (5/5); G (4/5); A (3/5); QN (3/5)	1°アンカー P	FWY (4/5)		DE (3/5)	G (4/5)	QN (4/5)	FWY (3/5) DE (4/5)	1°アンカー VILFMWYA
B27			1°アンカー RHK							1°アンカー FYLWMIVA
B44			1°アンカー ED							1°アンカー FWYLMVA
B58			1°アンカー ATS							1°アンカー FWYLVMA
B62			1°アンカー QLIVMP							1°アンカー FWYMIYLA

斜体の残基は、あまり好ましくない残基または「許容される」残基を示す。

10

20

30

40

表 IV (E): HLA クラス I モチーフ

位置:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-末端
A1 9-マ-	好ましい	GFY	I°アンカ- STM	DEA	YFW		P	DEQN	YFW	または C-末端 I°アンカ- Y	
	有害な	DE		RHKLIVMP I°アンカ- DEAS	A	G	A				
A1 9-マ-	好ましい	GRHK	ASTCLIVM		GSTC		ASTC	LIVM	DE	I°アンカ- Y	
	有害な	A	RHKDEPY FW		DE	PQN	RHK	PG	GP		
A1 10-マ-	好ましい	YFW	I°アンカ- STM	DEAQN	A	YFWQN		PASTC	GDE	P	I°アンカ- Y
	有害な	GP		RHKLIVM	DE	RHK	QNA	RHKYFW	RHK	A	
A1 10-マ-	好ましい	YFW	STCLIVM		A	YFW		PG	G	YFW	I°アンカ- Y
	有害な	RHK	RHKDEPY FW			P	G		PRHK	QN	
A2.1 9-マ-	好ましい	YFW	I°アンカ- LMIVQAT	YFW	STC	YFW		A	P	I°アンカ- VLIMAT	
	有害な	DEP		DERKH			RKH	DERKH			

斜体の残基は、あまり好ましくない残基または「許容される」残基を示す。

10

20

30

40

表 IV (E): HLA クラス I モチーフ、続き

	位置: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 C-末端									
A2.1 10-マー	好ましい	AYFW	<u>1°アンカー</u> LMIVQA T	LVIM	G	G	FYWL VIM		<u>1°アンカー</u> VLMAT	
A3	有害な 好ましい	DEP RHK	DE <u>1°アンカー</u> LMVISA TFCGD	YFW	RKHA PRHKYFW	P A	YFW	RKH DERKH P	RKH <u>1°アンカー</u> KYRHFA	
A11	有害な 好ましい	DEP A	DE <u>1°アンカー</u> VTLMIS AGNCDF	YFW	YFW	A YFW	YFW	P	<u>1°アンカー</u> KRYH	
A24 9-マー	有害な 好ましい 有害な	DEP YFWRHK DEG	DE <u>1°アンカー</u> YFWM	DE	G	QNP DERH K	YFW G AQN	G YFW	<u>1°アンカー</u> FLIW	
A24 10-マー	好ましい 有害な	<u>1°アンカー</u> YFWM	P	YFWP	P				<u>1°アンカー</u> FLIW	
A3101	好ましい	RHK	GDE <u>1°アンカー</u> MVTALIS	YFW	P	RHK YFW	DE YFW	QN AP	DEA <u>1°アンカー</u> RK	
A3301	有害な 好ましい	DEP	DE <u>1°アンカー</u> MVALFI ST	YFW		ADE YFW	DE AYFW	DE	<u>1°アンカー</u> RK	
	有害な	GP	DE							

飼体の残基は、あまり好ましくなくない残基または「許容される」残基を示す。

斜体の残基は、あまり好ましくない残基または「許容される」残基を示す。

10

20

30

40

表 IV (E): HLA クラス I モチーフ、続き

	位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-末端
A6801	好ましい	YFWSTC	<u>1°アンカー</u> AVTMSLI			YFWLIV M		YFW	P	<u>1°アンカー</u> RK	
	有害な	GP		DEG		RHK			A		
B0702	好ましい	RHKFW Y	<u>1°アンカー</u> P	RHK		RHK	RHK	RHK	PA	<u>1°アンカー</u> LMFWYIV	
	有害な	DEQNP		DEP	DE	DE	GDE	QN	DE		
B3501	好ましい	FWYLIV M	<u>1°アンカー</u> P	FWY				FWY		<u>1°アンカー</u> LMFWYIV A	
	有害な	AGP				G	G				
B51	好ましい	LIVMFW Y	<u>1°アンカー</u> P	FWY	STC	FWY		G	FWY	<u>1°アンカー</u> LIVFWYAM	
	有害な	AGPDER HKSTC				DE	G	DEQN	GDE		
B5301	好ましい	LIVMFW Y	<u>1°アンカー</u> P	FWY	STC	FWY		LIVMFWY	FWY	<u>1°アンカー</u> IMFWYAL V	
	有害な	AGPQN					G	RHKQN	DE		
B5401	好ましい	FWY	<u>1°アンカー</u> P	FWYL IVM		LIVM		ALIVM	FWYAP	<u>1°アンカー</u> ATVLMF WY	
	有害な	GPQNDE		GDES TC		RHKDE	DE	QNDE	DE		

斜体の残基は、あまり好ましくない残基または「許容される」残基を示す。この表の情報は、他に特定されない限り、9マーに対して特異的である。

【 0 5 5 0 】
【 表 5 】

表 V				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A1, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	184	SIDVTFFPF	25.000	1.
2	55	HTETEDRLF	22.500	2.
3	80	TSDVVIVRF	15.000	3.
4	57	ETEDRLFKH	11.250	4.
5	215	QMEQTVDLK	9.000	5.
6	323	LVIPLIGEY	5.000	6.
7	210	KIDLEQMEQ	2.500	7.
8	314	ITEIPSTS	2.250	8.
9	386	PVELCHPLR	1.800	9.
10	469	ALEGVHYIA	1.800	10.
11	409	DAEEREVVV	1.800	11.
12	481	RSEDADSSV	1.350	12.
13	244	KYDCCAEIY	1.250	13.
14	79	NTSDVVIVR	1.250	14.
15	255	VTYAFVIRR	1.250	15.
16	328	IGEYLLFTM	1.125	16.
17	280	SCLTVLVFY	1.000	17.
18	150	NADGEFAVT	1.000	18.
19	460	LLLSPHMQK	1.000	19.
20	248	CAEIYPDVT	0.900	20.
21	416	VVEEDRWA	0.900	21.
22	450	KAEALLQEG	0.900	22.
23	212	DLEQMEQTV	0.900	23.
24	3	PSCPVFLSF	0.750	24.
25	115	WSDYKLRWN	0.750	25.
26	279	ISCLTVLVF	0.750	26.
27	455	LQEGELLS	0.675	27.
28	124	PTDFGNITS	0.625	28.
29	232	AIVNATGTY	0.500	29.
30	95	LIDVDEKNQ	0.500	30.
31	389	LCHPLRLKL	0.500	31.
32	407	NVDAEEREV	0.500	32.
33	372	GCVPRWLLM	0.500	33.
34	97	DVDEKNQMM	0.500	34.

10

20

30

40

表 V				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A1, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
35	360	HTMPHWVRG	0.500	35.
36	482	SEDADSSVK	0.500	36.
37	236	ATGTYNSSKK	0.500	37.
38	172	HWVPPAIYK	0.500	38.
39	272	LIIPCLLIS	0.500	39.
40	140	IWIPDIVLY	0.500	40.
41	228	SGEWAIVNA	0.450	41.
42	486	DSSVKEDWK	0.300	42.
43	181	SSCSIDVTF	0.300	43.
44	112	KQEWSYKYL	0.270	44.
45	142	IPDIVLYNN	0.250	45.
46	499	VIDRIFLWL	0.250	46.
47	5	CPVFLSFTK	0.250	47.
48	252	YPDVTYAFV	0.250	48.
49	457	EGELLSPH	0.225	49.
50	152	DGEFAVTHM	0.225	50.

10

20

【 0 5 5 1 】

【 表 6 】

表 VI				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A1, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	55	HTETEDRLF	225.000	51.
2	248	CAEIYPDVTY	90.000	52.
3	481	RSEDADSSVK	27.000	53.
4	97	DVDEKNQMMT	2.500	54.
5	57	ETEDRLFHL	2.250	55.
6	314	ITEHPSTSL	2.250	56.
7	250	EIYPDVTYAF	2.000	57.
8	279	ISCLTVLVFY	1.500	58.
9	112	KQEWSYKLR	1.350	59.
10	236	ATGTYNSSKKY	1.250	60.
11	150	NADGEFAVTH	1.000	61.
12	170	TVHWVPPAIY	1.000	62.
13	4	SCPVFLSFTK	1.000	63.
14	459	ELLSPHMQK	1.000	64.

30

40

表 VI				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A1, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
15	416	VVEEEDRWAC	0.900	65.
16	26	GEEAKRPPPR	0.900	66.
17	486	DSSVKEDWKY	0.750	67.
18	183	CSIDVTFFPF	0.750	68.
19	80	TSDVVIVRFG	0.750	69.
20	252	YPDVTYAFVI	0.625	70.
21	95	LIDVDEKNQM	0.500	71.
22	476	IADHLRSEDA	0.500	72.
23	278	LISCLTVLVF	0.500	73.
24	484	DADSSVKEDW	0.500	74.
25	372	GCVPRWLLMN	0.500	75.
26	322	SLVIPLIGEY	0.500	76.
27	499	VIDRIFLWLF	0.500	77.
28	515	GTIGLFLPPF	0.500	78.
29	254	DVTYAFVIRR	0.500	79.
30	407	NVDAEEREVV	0.500	80.
31	316	EIPSTSLVI	0.500	81.
32	210	KIDLEQMEQT	0.500	82.
33	79	NTSDVVIVRF	0.500	83.
34	219	TVDLKDYWES	0.500	84.
35	272	LHPCLLISC	0.500	85.
36	231	WAIVNATGTY	0.500	86.
37	21	LTPAGGEEAK	0.500	87.
38	386	PVELCHPLRL	0.450	88.
39	457	EGELLLSPHM	0.450	89.
40	469	ALEGVHYIAD	0.450	90.
41	290	PSDCGEKITL	0.375	91.
42	446	ASGPKAEALL	0.300	92.
43	180	KSSCSIDVTF	0.300	93.
44	136	PSEMIWIPDI	0.270	94.
45	360	HTMPHWVRGA	0.250	95.
46	358	STHTMPHWVR	0.250	96.
47	157	VTHMTKAHLF	0.250	97.
48	339	VTLSIVITVF	0.250	98.
49	259	FVIRRLPLFY	0.250	99.

10

20

30

40

表 VI				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A1, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
50	228	SGEWAIVNAT	0.225	100.

【 0 5 5 2 】

【 表 7 】

表 VII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A2, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	331	YLLFTMIFV	14974.754	101.
2	506	WLFHIVCFL	4599.389	102.
3	281	CLTVLVFYL	1567.359	103.
4	303	VLLSLTVFL	739.032	104.
5	504	FLWLFHIVC	679.693	105.
6	396	KLSPSYHWL	616.839	106.
7	513	FLGTIGLFL	540.469	107.
8	304	LLSLTVFLL	484.457	108.
9	103	QMMTTNVWL	313.968	109.
10	276	CLLISCLTV	257.342	110.
11	332	LLFTMIFVT	256.368	111.
12	520	FLPPFLAGM	199.733	112.
13	454	LLQEGELL	148.896	113.
14	344	VITVFVLNV	142.093	114.
15	13	KLSLWWLLL	127.106	115.
16	518	GLFLPPFLA	106.613	116.
17	8	FLSFTKLSL	98.267	117.
18	468	KALEGVHYI	97.322	118.
19	306	SLTVFLLLI	91.183	119.
20	327	LIGEYLLFT	90.344	120.
21	379	LMNRPPPPV	85.394	121.
22	497	AMVIDRIFL	84.856	122.
23	336	MIFVTLISV	56.725	123.
24	370	LLGCVPRWL	39.948	124.
25	453	ALLQEGELL	38.730	125.
26	310	FLLLITEII	35.673	126.
27	277	LLISCLTVL	34.246	127.
28	502	RIFLWLFII	29.030	128.
29	166	FSTGTVHWV	26.419	129.
30	499	VIDRIFLWL	20.873	130.

10

20

30

40

表 VII HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A2, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
31	461	LLSPHMQKA	19.425	131.
32	139	MIWPDIVL	16.993	132.
33	313	LITEHPST	16.426	133.
34	278	LISCLTVLV	16.258	134.
35	342	SIVITVFVL	16.065	135.
36	339	VTLSIVITV	13.975	136.
37	324	VIPLIGEYL	13.457	137.
38	134	RVPSEMIWI	11.548	138.
39	149	NNADGEFAV	10.797	139.
40	271	NLIIPCLLI	10.433	140.
41	296	KITLCISVL	9.695	141.
42	84	VIVRFGLSI	9.267	142.
43	508	FHVCFLGT	8.955	143.
44	488	SVKEDWKYV	8.165	144.
45	335	TMIFVTLIS	7.535	145.
46	48	ALPQGGSHI	7.452	146.
47	252	YPDVTYAFV	6.892	147.
48	269	TNLIIPCL	6.756	148.
49	358	STHTMPHWV	5.313	149.
50	517	IGLFLPPFL	4.824	150.

10

20

30

40

【 0 5 5 3 】

【 表 8 】

表 VIII HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A2, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	303	VLLSLTVFLL	1792.489	151.
2	331	YLLFTMIFVT	693.701	152.
3	378	LLMNRPPPPV	437.482	153.
4	340	TLSIVITVFV	382.536	154.
5	370	LLGCVPRWLL	272.371	155.
6	332	LLFTMIFVTL	255.302	156.
7	89	GLSIAQLIDV	159.970	157.
8	498	MVIDRIFLWL	136.147	158.
9	277	LLISCLTVLV	118.238	159.
10	15	SLWWLLLTPA	94.839	160.
11	343	IVITVFVLNV	90.423	161.

表 VIII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A2, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
12	369	ALLGCVPRWL	86.945	162.
13	453	ALLQEGELLL	79.041	163.
14	276	CLLISCLTVL	74.536	164.
15	460	LLSPHMQKA	71.872	165.
16	304	LLSLTVFLLL	69.001	166.
17	338	FVTLIVITV	64.388	167.
18	327	LIGEYLLFTM	63.515	168.
19	13	KLSLWWLLLT	59.989	169.
20	298	TLCISVLLSL	49.134	170.
21	335	TMIFVTLIV	47.369	171.
22	102	NQMMTTNVWL	44.076	172.
23	302	SVLLSLTVFL	38.038	173.
24	280	SCLTVLVFYL	37.856	174.
25	461	LLSPHMQKAL	36.316	175.
26	312	LLITEIIPST	29.137	176.
27	502	RIFLWLFIV	27.565	177.
28	288	YLPSCGGEKI	23.516	178.
29	263	RLPLFYTNL	21.362	179.
30	204	WTYDKAKIDL	17.906	180.
31	516	TIGLFLPPFL	16.155	181.
32	148	YNNADGEFAV	12.113	182.
33	273	IIPCLLISCL	11.485	183.
34	296	KITLCISVLL	10.281	184.
35	496	VAMVIDRIFL	10.264	185.
36	260	VIRRLPLFYT	9.713	186.
37	300	CISVLLSLTV	9.563	187.
38	323	LVIPLIGEYL	8.564	188.
39	284	VLVFYLPSCD	8.446	189.
40	308	TVFLLLITEI	7.769	190.
41	508	FIIVCFLGTI	7.497	191.
42	506	WLFIIIVCFLG	7.356	192.
43	306	SLTVFLLLIT	7.027	193.
44	504	FLWLFIIIVCF	6.544	194.
45	520	FLPPFLAGMI	6.239	195.
46	83	VVIVRFGLSI	5.897	196.

10

20

30

40

表 VIII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A2, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
47	257	YAFVIRRLPL	5.050	197.
48	324	VIPLIGEYLL	4.993	198.
49	490	KEDWKYVAMV	4.355	199.
50	487	SSVKEDWKYV	4.245	200.

10

【 0 5 5 4 】

【 表 9 】

表 IX				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A3, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	104	MMTTNVWLK	180.000	201.
2	460	LLSPHMQK	90.000	202.
3	215	QMEQTVDLK	60.000	203.
4	198	KMKFGSWTY	36.000	204.
5	255	VTYAFVIRR	18.000	205.
6	506	WLFHVCFL	13.500	206.
7	518	GLFLPPFLA	13.500	207.
8	13	KLSLWWLLL	10.800	208.
9	504	FLWLFIIVC	9.000	209.
10	288	YLPSDCGEK	6.000	210.
11	119	KLRWNPTDF	6.000	211.
12	281	CLTVLVFYL	5.400	212.
13	306	SLTVFLLLI	5.400	213.
14	304	LLSLTVFLL	5.400	214.
15	340	TLSIVITVF	4.500	215.
16	502	RIFLWLFH	4.050	216.
17	110	WLKQEWSDY	4.000	217.
18	236	ATGTYNKK	3.000	218.
19	396	KLSPSYHWL	2.700	219.
20	93	AQLIDVDEK	2.700	220.
21	271	NLIIPCLLI	2.700	221.
22	335	TMIFVTLSI	2.700	222.
23	202	GSWTYDKAK	2.250	223.
24	332	LLFTMIFVT	2.250	224.
25	79	NTSDVVIVR	1.800	225.
26	184	SIDVTFFPF	1.800	226.
27	454	LLQEGELL	1.800	227.

20

30

40

表 IX HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A3, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
28	497	AMVIDRIFL	1.800	228.
29	513	FLGTIGLFL	1.800	229.
30	310	FLLSITEI	1.350	230.
31	277	LLISCLTVL	1.350	231.
32	388	ELCHPLRLK	1.350	232.
33	369	ALLGCVPRW	1.350	233.
34	469	ALEGVHYIA	1.350	234.
35	520	FLPPFLAGM	1.350	235.
36	8	FLSFTKLSL	1.200	236.
37	164	HLFSTGTVH	1.000	237.
38	190	FPGDQQNCK	1.000	238.
39	65	HLFRGYNRW	1.000	239.
40	453	ALLQEGELL	0.900	240.
41	516	TIGLFLPPF	0.900	241.
42	132	SLRVPSEMI	0.900	242.
43	5	CPVFLSFTK	0.900	243.
44	139	MIWIPDIVL	0.900	244.
45	103	QMMTTNVWL	0.900	245.
46	331	YLLFTMIFV	0.900	246.
47	303	VLLSLTVFL	0.900	247.
48	326	PLIGEYLLF	0.900	248.
49	342	SIVITVFVL	0.810	249.
50	260	VIRRLPLFY	0.800	250.

10

20

30

【 0 5 5 5 】

【 表 1 0 】

表 X HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A3, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	103	QMMTTNVWLK	270.000	251.
2	110	WLKQEWSDYK	60.000	252.
3	459	ELLSPHMQK	27.000	253.
4	504	FLWLFIIVCF	22.500	254.
5	332	LLFTMIFVTL	13.500	255.
6	303	VLLSLTVFLL	8.100	256.
7	61	RLFKHLFRGY	6.000	257.
8	441	HLHSGASGPK	6.000	258.

40

表 X				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A3, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
9	346	TVFVLNVHHR	6.000	259.
10	304	LLSLTVFLL	5.400	260.
11	263	RLPLFYTNL	3.600	261.
12	515	GTIGLFLPPF	3.038	262.
13	146	VLYNNADGEF	3.000	263.
14	139	MIWIPDIVLY	3.000	264.
15	370	LLGCVPRWLL	2.700	265.
16	298	TLCISVLLSL	2.700	266.
17	499	VIDRIFLWLF	2.700	267.
18	13	KLSLWWLLLT	2.700	268.
19	518	GLFLPPFLAG	2.700	269.
20	322	SLVIPLIGEY	2.700	270.
21	254	DVTYAFVIRR	2.160	271.
22	250	EIYPDVTYAF	2.025	272.
23	55	HTETEDRLF	2.000	273.
24	453	ALLQEGELL	1.800	274.
25	89	GLSIAQLIDV	1.800	275.
26	153	GEFAVTHMTK	1.800	276.
27	15	SLWWLLTPA	1.500	277.
28	276	CLISCLTVL	1.350	278.
29	199	MKFGSWTYDK	1.350	279.
30	497	AMVIDRIFLW	1.350	280.
31	214	EQMEQTVDLK	1.215	281.
32	472	GVHYIADHLR	1.200	282.
33	259	FVIRRLPLFY	1.200	283.
34	373	CVPRWLLMNR	1.200	284.
35	278	LISCLTVLVF	1.200	285.
36	21	LTPAGGEEAK	1.000	286.
37	164	HLFSTGTVHW	1.000	287.
38	358	STHTMPHWVR	0.900	288.
39	235	NATGTYNSKK	0.900	289.
40	265	PLFYTNLI	0.900	290.
41	394	RLKLSPSYHW	0.900	291.
42	138	EMIWIPDIVL	0.810	292.
43	396	KLSPSYHWLE	0.810	293.

10

20

30

40

表 X				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A3, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
44	498	MVIDRIFLWL	0.810	294.
45	331	YLLFTMIFVT	0.675	295.
46	336	MIFVTLISVI	0.600	296.
47	502	RIFLWLFIIIV	0.600	297.
48	288	YLPSDCGEKI	0.600	298.
49	92	IAQLIDVDEK	0.600	299.
50	170	TVHWVPPAIY	0.600	300.

10

【 0 5 5 6 】

【 表 1 1 】

表 XI				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A11, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	460	LLLSPHMQK	1.200	301.
2	200	KFGSWTYDK	1.200	302.
3	236	ATGTYNKK	1.000	303.
4	5	CPVFLSFTK	0.900	304.
5	93	AQLIDVDEK	0.900	305.
6	255	VTYAFVIRR	0.800	306.
7	104	MMTTNVWLK	0.800	307.
8	494	KYVAMVIDR	0.720	308.
9	190	PPFDQQNCK	0.400	309.
10	288	YLPSDCGEK	0.400	310.
11	215	QMEQTVDLK	0.400	311.
12	79	NTSDVVIVR	0.400	312.
13	22	TPAGGEEAK	0.200	313.
14	235	NATGTYNKK	0.200	314.
15	368	GALLGCVPR	0.180	315.
16	414	EVVVEEDR	0.180	316.
17	154	EFAVTHMTK	0.120	317.
18	254	DVTYAFVIR	0.120	318.
19	56	TETEDRLF	0.120	319.
20	134	RVPSEMIWI	0.120	320.
21	498	MVIDRIFLW	0.090	321.
22	374	VPRWLLMNR	0.080	322.
23	518	GLFLPPFLA	0.072	323.
24	502	RIFLWLFII	0.072	324.

20

30

40

表 XI				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A11, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
25	202	GSWTYDKAK	0.060	325.
26	172	HWVPPAIYK	0.060	326.
27	472	GVHYIADHL	0.060	327.
28	482	SEDADSSVK	0.060	328.
29	347	VFVLNVHHR	0.060	329.
30	434	GTLCSHGHL	0.045	330.
31	169	GTVHWVPPA	0.045	331.
32	346	TVFVLNVHH	0.040	332.
33	386	PVELCHPLR	0.040	333.
34	64	KHLFRGYNR	0.036	334.
35	112	KQEWSDYKL	0.036	335.
36	415	VVVEEDRW	0.030	336.
37	323	LVIPLIGEY	0.030	337.
38	339	VTLSIVITV	0.030	338.
39	259	FVIRRLPLF	0.030	339.
40	302	SVLLSLTVF	0.030	340.
41	82	DVVIVRFGL	0.027	341.
42	198	KMKFGSWTY	0.024	342.
43	13	KLSLWWLLL	0.024	343.
44	11	FTKLSLWWL	0.020	344.
45	495	YVAMVIDRI	0.020	345.
46	442	LHSGASGPK	0.020	346.
47	170	TVHWVPPAI	0.020	347.
48	111	LKQEWSDYK	0.020	348.
49	428	HVAPSVGTL	0.020	349.
50	85	IVRFGLSIA	0.020	350.

10

20

30

【 0 5 5 7 】

【 表 1 2 】

表 XII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A11, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	55	HTETEDRLF	2.000	351.
2	103	QMMTTNVWLK	1.600	352.
3	472	GVHYIADHLR	1.200	353.
4	21	LTPAGGEEAK	1.000	354.
5	346	TVFVLNVHHR	0.800	355.

40

表 XII HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A11, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
6	373	CVPRWLLMNR	0.800	356.
7	153	GEFAVTHMTK	0.720	357.
8	287	FYLPSCDCEK	0.600	358.
9	4	SCPVFLSFTK	0.600	359.
10	110	WLKQEWSDYK	0.400	360.
11	358	STHTMPHWVR	0.400	361.
12	441	HLHSGASGPK	0.400	362.
13	214	EQMEQTVDLK	0.360	363.
14	459	ELLLSPHMQK	0.360	364.
15	254	DVTYAFVIRR	0.240	365.
16	189	FFPFDQQNCK	0.200	366.
17	235	NATGTYNCKK	0.200	367.
18	92	IAQLIDVDEK	0.200	368.
19	112	KQEWSDYKLR	0.180	369.
20	199	MKFGSWTYDK	0.080	370.
21	171	VHWVPPAIYK	0.080	371.
22	66	LFRGYNRWAR	0.080	372.
23	481	RSEDADSSVK	0.060	373.
24	343	IVITVFVLNV	0.060	374.
25	259	FVIRRLPLFY	0.060	375.
26	498	MVIDRIFLWL	0.060	376.
27	83	VVIVRFGLSI	0.060	377.
28	413	REVVVEEDR	0.054	378.
29	502	RIFLWLFIV	0.048	379.
30	515	GTIGLFLPPF	0.045	380.
31	169	GTVHWVPPAI	0.045	381.
32	434	GTLCSHGLH	0.045	382.
33	204	WTYDKAKIDL	0.040	383.
34	510	IVCFLGTIGL	0.040	384.
35	308	TVFLLITEI	0.040	385.
36	234	VNATGTYNCK	0.040	386.
37	338	FVTLIVITV	0.040	387.
38	22	TPAGGEEAKR	0.040	388.
39	488	SVKEDWKYVA	0.040	389.
40	334	FTMIFVTLIS	0.040	390.

10

20

30

40

表 XII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A11, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
41	26	GEEAKRPPPR	0.036	391.
42	323	LVIPLIGEYL	0.030	392.
43	302	SVLLSLTVFL	0.030	393.
44	89	GLSIAQLIDV	0.024	394.
45	263	RLPLFYTNL	0.024	395.
46	394	RLKLSPSYHW	0.024	396.
47	351	NVHHRSPSTH	0.020	397.
48	11	FTKLSLWWLL	0.020	398.
49	365	WVRGALLGCV	0.020	399.
50	407	NVDAEEREVV	0.020	400.

10

【 0 5 5 8 】

【 表 1 3 】

20

表 XIII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A24, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	256	TYAFVIRRL	280.000	401.
2	251	IYPDVTYAF	252.000	402.
3	205	TYDKAKIDL	200.000	403.
4	147	LYNNADGEF	165.000	404.
5	330	EYLLFTMIF	150.000	405.
6	87	RFGLSIAQL	40.000	406.
7	333	LFTMIFVTL	33.600	407.
8	258	AFVIRRLPL	30.000	408.
9	512	CFLGTIGLF	15.000	409.
10	112	KQEWSDYKL	13.200	410.
11	305	LSLTVFLLL	10.080	411.
12	244	KYDCCAEIY	10.000	412.
13	309	VFLLITEI	9.900	413.
14	396	KLSPSYHWL	9.600	414.
15	337	IFVTLSIVI	9.000	415.
16	82	DVVIVRFGL	8.400	416.
17	270	INLIIPCLL	8.400	417.
18	324	VPLIGEYL	8.400	418.
19	269	TINLIIPCL	8.400	419.
20	297	ITLCISVLL	8.400	420.
21	299	LCISVLLSL	8.400	421.

30

40

表 XIII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A24, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
22	296	KITLCISVL	8.000	422.
23	13	KLSLWWLLL	8.000	423.
24	474	HYIADHLRS	7.500	424.
25	69	GYNRWARPV	7.500	425.
26	239	TYNSKKYDC	7.500	426.
27	303	VLLSLTVFL	7.200	427.
28	214	BQMEQTVDL	7.200	428.
29	517	IGLFLPPFL	7.200	429.
30	454	LLQEGELL	7.200	430.
31	266	LFYTINLI	7.000	431.
32	499	VIDRIFLWL	6.720	432.
33	452	EALLQEGEL	6.600	433.
34	389	LCHPLRLKL	6.336	434.
35	434	GTLCSHGHL	6.000	435.
36	342	SIVITVFVL	6.000	436.
37	1	MGPSCPVFL	6.000	437.
38	447	SGPKAEALL	6.000	438.
39	462	LSPHMQKAL	6.000	439.
40	453	ALLQEGELL	6.000	440.
41	497	AMVIDRIFL	6.000	441.
42	264	LPLFYTINL	6.000	442.
43	400	SYHWLESNV	6.000	443.
44	117	DYKLRWNPT	6.000	444.
45	325	IPLIGEYLL	6.000	445.
46	224	DYWESGEWA	6.000	446.
47	277	LLISCLTVL	6.000	447.
48	103	QMMTTNVWL	6.000	448.
49	472	GVHYIADHL	5.600	449.
50	513	FLGTIGLFL	5.600	450.

10

20

30

40

【 0 5 5 9 】

【 表 1 4 】

表 XIV				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A24, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	494	KYVAMVIDRI	210.000	451.
2	224	DYWESGEWAI	60.000	452.

表 XIV HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A24, 10-マ-				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
3	512	CFLGTIGLFL	42.000	453.
4	7	VFLSFTKLSL	30.000	454.
5	10	SFTKLSLWWL	20.000	455.
6	87	RFGLSIAQLI	16.800	456.
7	258	AFVIRRLPLF	15.000	457.
8	498	MVIDRIFLWL	12.096	458.
9	263	RLPLFYTNL	12.000	459.
10	296	KITLCISVLL	11.200	460.
11	309	VFLLLTEH	10.500	461.
12	57	ETEDRLFKHL	10.368	462.
13	323	LVIPLIGEYL	10.080	463.
14	251	IYPDVTYAFV	9.000	464.
15	369	ALLGCVPRWL	8.400	465.
16	361	TMPHWVRGAL	8.400	466.
17	268	YTINLIIPCL	8.400	467.
18	471	EGVHYIADHL	8.400	468.
19	269	TINLIIPCLL	8.400	469.
20	505	LWLFHVCFL	8.400	470.
21	5	CPVFLSFTKL	7.920	471.
22	239	TYNSKKYDCC	7.500	472.
23	147	LYNNADGEFA	7.500	473.
24	330	EYLLFTMIFV	7.500	474.
25	273	IIPCLLISCL	7.200	475.
26	302	SVLLSLTVFL	7.200	476.
27	280	SCLTVLVFYL	7.200	477.
28	304	LLSLTVFLLL	6.720	478.
29	332	LLFTMIFVTL	6.720	479.
30	267	FYTINLIIPC	6.000	480.
31	324	VIPLIGEYLL	6.000	481.
32	453	ALLQEGELLL	6.000	482.
33	452	EALLQEGELL	6.000	483.
34	138	EMIWIPDIVL	6.000	484.
35	102	NQMMTTNVWL	6.000	485.
36	341	LSIVITVFVL	6.000	486.
37	496	VAMVIDRIFL	6.000	487.

10

20

30

40

表 XIV				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - A24, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
38	276	CLLISCLTVL	6.000	488.
39	314	ITEHPSTSL	6.000	489.
40	303	VLLSLTVFLL	6.000	490.
41	255	VTYAFVIRRL	5.600	491.
42	180	KSSCSIDVTF	5.600	492.
43	298	TLCISVLLSL	5.600	493.
44	388	ELCHPLRLKL	5.280	494.
45	380	MNRPPPVEL	5.280	495.
46	178	IYKSSCSIDV	5.000	496.
47	446	ASGPKAEALL	4.800	497.
48	318	IPSTSLVIPL	4.800	498.
49	11	FTKLSLWVLL	4.800	499.
50	516	TIGLFLPPFL	4.800	500.

10

20

【 0 5 6 0 】

【 表 1 5 】

表 XV				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B7, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	362	MPHWVRGAL	120.000	501.
2	33	PPRAPGDPL	120.000	502.
3	325	IPLIGEYLL	80.000	503.
4	274	IPCLLISCL	80.000	504.
5	264	LPLFYTNL	80.000	505.
6	82	DVVIVRFGL	30.000	506.
7	472	GVHYIADHL	20.000	507.
8	428	HVAPSVGTL	20.000	508.
9	497	AMVIDRIFL	18.000	509.
10	453	ALLQEGELL	12.000	510.
11	103	QMMTTNVWL	12.000	511.
12	446	ASGPKAEAL	12.000	512.
13	214	EQMEQTVDL	12.000	513.
14	452	EALLQEGEL	12.000	514.
15	371	LGCVPRWLL	9.000	515.
16	385	PPVELCHPL	8.000	516.
17	289	LPSDCGEKI	8.000	517.
18	521	LPPFLAGMI	8.000	518.

30

40

表 XV				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B7, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
19	77	VPNTSDVVI	8.000	519.
20	139	MIWIPDIVL	6.000	520.
21	389	LCHPLRLKL	6.000	521.
22	132	SLRVPSEMI	6.000	522.
23	365	WVRGALLGC	5.000	523.
24	85	IVRFGLSIA	5.000	524.
25	396	KLSPSYHWL	4.000	525.
26	297	ITLCISVLL	4.000	526.
27	511	VCFLGTIGL	4.000	527.
28	13	KLSLWWLL	4.000	528.
29	281	CLTVLVFYL	4.000	529.
30	277	LLISCLTVL	4.000	530.
31	157	VTHMTKAHL	4.000	531.
32	324	VIPLIGEYL	4.000	532.
33	370	LLGCVPRWL	4.000	533.
34	11	FTKLSLWWL	4.000	534.
35	296	KITLCISVL	4.000	535.
36	1	MGPSCPVFL	4.000	536.
37	299	LCISVLLSL	4.000	537.
38	517	IGLFLPPFL	4.000	538.
39	506	WLFIIVCFL	4.000	539.
40	270	INLIIPCLL	4.000	540.
41	8	FLSFTKLSL	4.000	541.
42	304	LLSLTVFLL	4.000	542.
43	434	GTLCSHGHL	4.000	543.
44	342	SIVITVFVL	4.000	544.
45	305	LSLTVFLLL	4.000	545.
46	447	SGPKAEALL	4.000	546.
47	75	RPVPNTSDV	4.000	547.
48	41	LSSPSPTAL	4.000	548.
49	454	LLQEGELL	4.000	549.
50	462	LSPHMQKAL	4.000	550.

10

20

30

40

【 0 5 6 1 】

【 表 1 6 】

表 XVI				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B7, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	362	MPHWVRGALL	80.000	551.
2	318	IPSTSLVIPL	80.000	552.
3	5	CPVFLSFTKL	80.000	553.
4	380	MNRPPPPVEL	60.000	554.
5	156	AVTHMTKAHL	60.000	555.
6	496	VAMVIDRIFL	54.000	556.
7	190	FPFDQQNCKM	20.000	557.
8	498	MVIDRIFLWL	20.000	558.
9	302	SVLLSLTVFL	20.000	559.
10	510	IVCFLGTIGL	20.000	560.
11	323	LVPLIGEYL	20.000	561.
12	257	YAFVIRRLPL	18.000	562.
13	453	ALLQEGELLL	12.000	563.
14	445	GASGPKAEAL	12.000	564.
15	32	PPRAPGDPL	12.000	565.
16	369	ALLGCVPRWL	12.000	566.
17	452	EALLQEGELL	12.000	567.
18	446	ASGPKAEALL	12.000	568.
19	102	NQMMITNVWL	12.000	569.
20	365	WVRGALLGCV	10.000	570.
21	370	LLGCVPRWLL	9.000	571.
22	384	PPPVELCHPL	8.000	572.
23	264	LPLFYTNLI	8.000	573.
24	138	EMIWIPDIVL	6.000	574.
25	388	ELCHPLRLKL	6.000	575.
26	361	TMPHWVRGAL	6.000	576.
27	280	SCLTVLVFYL	4.000	577.
28	273	IIPCLLISCL	4.000	578.
29	324	VIPLIGEYLL	4.000	579.
30	276	CLLISCLTVL	4.000	580.
31	77	VPNTSDVVIV	4.000	581.
32	471	EGVHYIADHL	4.000	582.
33	298	TLCISVLLSL	4.000	583.
34	461	LLSPHMQKAL	4.000	584.
35	204	WTYDKAKIDL	4.000	585.
36	516	TIGLFLPPFL	4.000	586.
37	296	KITLCISVLL	4.000	587.
38	304	LLSLTVFLLL	4.000	588.

10

20

30

40

表 XVI				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B7, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
39	332	LLFTMIFVTL	4.000	589.
40	303	VLLSLTVFLL	4.000	590.
41	269	TINLIIPCLL	4.000	591.
42	268	YTINLIIPCL	4.000	592.
43	263	RLPLFYTINL	4.000	593.
44	433	VGTLCSHGHL	4.000	594.
45	75	RPVPNTSDVV	4.000	595.
46	11	FTKLSLWVLL	4.000	596.
47	255	VTYAFVIRRL	4.000	597.
48	53	GSHTETEDRL	4.000	598.
49	341	LSIVITVFVL	4.000	599.
50	39	DPLSSPSPTA	3.000	600.

10

20

【 0 5 6 2 】

【 表 1 7 】

表 XVII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B35, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	208	KAKIDLEQM	54.000	601.
2	362	MPHWVRGAL	20.000	602.
3	325	IPLIGEYLL	20.000	603.
4	274	IPCLLISCL	20.000	604.
5	264	LPLFYTINL	20.000	605.
6	289	LPSDCGEKI	16.000	606.
7	487	SSVKEDWKY	15.000	607.
8	198	KMKFGSWTY	12.000	608.
9	131	TSLRVPSEM	10.000	609.
10	110	WLKQEWSDY	9.000	610.
11	75	RPVPNTSDV	8.000	611.
12	77	VPNTSDVVI	8.000	612.
13	521	LPPFLAGMI	8.000	613.
14	33	PPRAPGDPL	6.000	614.
15	260	VIRRLPLFY	6.000	615.
16	119	KLRWNPTDF	6.000	616.
17	305	LSLTVFLLL	5.000	617.
18	181	SSCSIDVTF	5.000	618.
19	41	LSSPSPTAL	5.000	619.

30

40

表 XVII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B35, 9-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
20	279	ISCLTVLVF	5.000	620.
21	462	LSPHMQKAL	5.000	621.
22	446	ASGPKAEAL	5.000	622.
23	468	KALEGVHYI	4.800	623.
24	385	PPVELCHPL	4.000	624.
25	123	NPTDFGNIT	4.000	625.
26	382	RPPPPVELC	4.000	626.
27	452	EALLQEGEL	3.000	627.
28	11	FTKLSLWWL	3.000	628.
29	217	EQTVDLKDY	3.000	629.
30	496	VAMVIDRIF	3.000	630.
31	9	LSFTKLSLW	2.500	631.
32	396	KLSPSYHWL	2.000	632.
33	430	APSVGTLCS	2.000	633.
34	372	GCVPRWLLM	2.000	634.
35	520	FLPPFLAGM	2.000	635.
36	280	SCLTVLVFY	2.000	636.
37	323	LVIPLIGEY	2.000	637.
38	398	SPSYHWLES	2.000	638.
39	214	EQMEQTVDL	2.000	639.
40	237	TGTYNKKY	2.000	640.
41	296	KITLCISVL	2.000	641.
42	2	GPSCPVFLS	2.000	642.
43	174	VPPAIYKSS	2.000	643.
44	454	LLQEGELL	2.000	644.
45	13	KLSLWWLL	2.000	645.
46	39	DPLSSPSPT	2.000	646.
47	232	AIVNATGTY	2.000	647.
48	488	SVKEDWKYV	1.800	648.
49	415	VVVEEEDRW	1.500	649.
50	80	TSDVVIVRF	1.500	650.

10

20

30

40

【 0 5 6 3 】

【 表 1 8 】

表 XVIII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B35, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号

表 XVIII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B35, 10-マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
1	190	FPPDQQNCKM	80.000	651.
2	325	IPLIGEYLLF	30.000	652.
3	362	MPHWVRGALL	20.000	653.
4	318	IPSTSLVIPL	20.000	654.
5	2	GPSCPVFLSF	20.000	655.
6	5	CPVFLSFTKL	20.000	656.
7	486	DSSVKEDWKY	15.000	657.
8	180	KSSCSIDVTF	10.000	658.
9	356	SPSTHTMPHW	10.000	659.
10	183	CSIDVTFFPF	10.000	660.
11	279	ISCLTVLVFY	10.000	661.
12	466	MQKALEGVHY	9.000	662.
13	75	RPVPNTSDVV	8.000	663.
14	264	LPLFYTNLI	8.000	664.
15	181	SSCSIDVTFF	7.500	665.
16	77	VPNTSDVVIV	6.000	666.
17	231	WAIVNATGTY	6.000	667.
18	341	LSIVITVFVL	5.000	668.
19	301	ISVLLSLTVF	5.000	669.
20	53	GSHTETEDRL	5.000	670.
21	446	ASGPKEALL	5.000	671.
22	452	EALLQEGELL	4.500	672.
23	496	VAMVIDRIFL	4.500	673.
24	61	RLFKHLFRGY	4.000	674.
25	327	LIGEYLLFTM	4.000	675.
26	36	APGDPLSSPS	4.000	676.
27	123	NPTDFGNITS	4.000	677.
28	289	LPSDCGEKIT	4.000	678.
29	445	GASGPKEAL	3.000	679.
30	394	RLKLSPSYHW	3.000	680.
31	380	MNRPPPVEL	3.000	681.
32	202	GSWTYDKAKI	3.000	682.
33	257	YAFVIRRLPL	3.000	683.
34	139	MIWIPDIVLY	3.000	684.
35	11	FTKLSLWWLL	3.000	685.

10

20

30

40

表 XVIII				
HLA ペプチドスコア付けの結果 - 205P1B5 - B35, 10- マー				
順位	開始位置	部分配列残基の一覧	スコア (この部分配列を含む分子の解離のハーフタイムの推定値)	配列番号
36	9	LSFTKLSLWW	2.500	686.
37	252	YPDVTYAFVI	2.400	687.
38	391	HPLRLKLSPS	2.000	688.
39	263	RLPLFYTNL	2.000	689.
40	498	MVIDRIFLWL	2.000	690.
41	79	NTSDVVIVRF	2.000	691.
42	174	VPPAIYKSSC	2.000	692.
43	398	SPSYHWLESN	2.000	693.
44	204	WTYDKAKIDL	2.000	694.
45	236	ATGTYNKKY	2.000	695.
46	130	ITSLRVPSEM	2.000	696.
47	371	LGCVPRWLLM	2.000	697.
48	32	PPPRAPGDPL	2.000	698.
49	45	SPTALPQGGG	2.000	699.
50	259	FVIRRLPLFY	2.000	700.

10

20

【 0 5 6 4 】

【 表 1 9 】

表 XIX: 205P1B5 のモチーフおよび翻訳後修飾

N-グリコシル化部位

マッチ数 : 3

- 1 79-82 NTSD
- 2 129-132 NITS
- 3 235-238 NATG

プロテインキナーゼCリン酸化部位

マッチ数 : 3

- 1 132-134 SLR
- 2 242-244 SKK
- 3 488-490 SVK

10

カゼインキナーゼIIリン酸化部位

マッチ数 : 4

- 1 54-57 SHTE
- 2 56-59 TETE
- 3 406-409 SNVD
- 4 488-491 SVKE

チロシンキナーゼリン酸化部位

468-475 KALEGVHY

N-ミリスチル化部位

マッチ数 : 7

- 1 25-30 GGEEAK
- 2 52-57 GGSHTTE
- 3 89-94 GLSIAQ
- 4 128-133 GNITSL
- 5 238-243 GTYNSK
- 6 368-373 GALLGC
- 7 434-439 GTLCSH

20

神経伝達物質依存型イオンチャネルシグネチャー

183-197 CSIDVTFFPFDQQNC

BLOCKS

aa 168-206 の間の 神経伝達物質依存型イオンチャネル

aa 252-296 の間の 神経伝達物質依存型イオンチャネル

30

PRINTS

aa 163-181- の間のニコチン性アセチルコリンレセプターシグネチャー

aa 93-109 の間のニコチン性アセチルコリンレセプターシグネチャー

Pfam

aa 59-265 の間の神経伝達物質依存型イオンチャネルリガンド結合ドメイン

aa 272-520 の間の神経伝達物質依存型イオンチャネル膜貫通領域

【 0 5 6 5 】

【 表 2 0 】

表 1: XX: モチーフ出現頻度			
名前	平均 % 同一性	説明	潜在的な機能
<u>zf-C2H2</u>	34%	ジンクフィンガー, C2H2 型	転写因子として機能する核酸結合タンパク質、可能な核での位置
<u>シトクロム b₆ N</u>	68%	シトクロム b(N-末端)/b6/petB	膜結合オキシダーゼ、過酸化物を生成する
<u>lg</u>	19%	免疫グロブリンドメイン	ドメインは、100アミノ酸の長さであり、そして保存されたドメイン内ジスルフィド結合を含む
<u>WD40</u>	18%	WDドメイン, G-β リピート	約40残基のタンデムリピートであり、各々が、Trp-Aspモチーフを含む。シグナル伝達およびタンパク質相互作用における機能
<u>PDZ</u>	23%	PDZドメイン	膜の下での部位へのシグナル分子の標的化において機能し得る
<u>LRR</u>	28%	ロイシンリッチリピート	タンパク質-タンパク質相互作用に関与する短い配列モチーフ
<u>pキナーゼ</u>	23%	プロテインキナーゼドメイン	ATP結合部位および触媒部位を含む、セリン/スレオニンプロテインキナーゼおよびチロシンプロテインキナーゼの両方に共通する保存された触媒コア
<u>PH</u>	16%	PHドメイン	細胞内シグナル伝達に関与するかまたは細胞骨格の構成要素としてのプレクストリン (pleckstrin) ホモロジー
<u>EGF</u>	34%	EGF-様ドメイン	膜結合タンパク質の細胞外ドメインまたは分泌されたタンパク質において見出される30~40アミノ酸の長さ
<u>rvf</u>	49%	逆転写酵素 (RNA-依存性 DNA ポリメラーゼ)	
<u>ank</u>	25%	Ank リピート	細胞質タンパク質であり、細胞骨格に対して膜内在性タンパク質を結合させる
<u>酸化還元 q1</u>	32%	NADH- ユビキノ/プラストキノン (複合体 I), 種々の鎖	膜結合性。膜を横切るプロトン輸送に関与する

10

20

30

40

efhand	24%	EF ハンド	カルシウム結合ドメインであって、両端で12残基の α ヘリックスドメインに隣接する12残基のループからなる
rvp	79%	レトロウイルスアスパルチルプロテアーゼ	アスパルチルプロテアーゼまたは酸プロテアーゼであって、触媒性アスパルチル残基上、中央にある
コラーゲン	42%	コラーゲン三重螺旋リピート (20コピー)	結合組織の形成に関与する細胞外構造タンパク質。この配列は、G-X-Yからなり、そしてポリペプチド鎖は、三重螺旋を形成する。
fn3	20%	フィブロネクチンIII型ドメイン	レセプターの細胞外リガンド結合ドメイン中に位置し、そして約200アミノ酸残基の長さであり、2対のシステインがジスルフィド結合に関与する
7tm_1	19%	7 回膜貫通レセプター (ロドプシンファミリー)	7回疎水性膜貫通領域であり、N末端は細胞外に存在し、一方で、C末端は細胞質に存在する。Gプロテインを介するシグナル伝達

10

20

【 0 5 6 6 】

【 表 2 1 】

表 XXI: 205P1B5 の特性

特徴	バイオインフォマテ ィックプログラム	World wide web URL	結果
ORF (終結コドンを含む アミノ酸の番号 膜貫通領域)	ORF finder	ncbi.nlm.nih.gov/	図 2; 555-2144 を参照のこと 529 アミノ酸
	TM Pred	ch.embnet.org/	5 回膜貫通ドメイン
	HMMTop	enzim.hu/hmmtop/	4 回膜貫通ドメイン
	Sosui	genome.ad.jp/SOSui/	5 回膜貫通ドメイン
	TMHMM	cbs.dtu.dk/services/TMHMM	5 回膜貫通ドメイン
シグナルペプチド	Signal P	cbs.dtu.dk/services/SignalP/	シグナル配列 aa 1-26
pI	pI/MW tool	expasy.ch/tools/	pI 5.69
分子量	pI/MW tool	expasy.ch/tools/	59.76 kDa
局在化	PSORT	psort.nibb.ac.jp/	形質膜 0.600 ミトコンドリア膜 0.400
	PSORT II	psort.nibb.ac.jp/	形質膜 22.2% 小胞体 33.3%
モチーフ	Pfam	sanger.ac.uk/Pfam/	神経伝達物質依存性イオンチャネル
	Prints	biochem.ucl.ac.uk/	ニコチン性アセチルコリン レセプターシグネチャ
	Blocks	blocks.fhcrc.org/	神経伝達物質依存性イオンチャネル
	Prosite	genome.ad.jp/	神経伝達物質依存性イオンチャ ネル

30

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 5 6 7 】

【 図 1 】 図 1 は、205P1B5 SSH 配列である。

【 図 2 A - 1 】 図 2 は、205P1B5 v. 1 の cDNA 配列 (配列番号 __) およびアミ 50

ノ酸配列（配列番号__）ならびに205P1B5v. 2のcDNA配列（配列番号__）およびアミノ酸配列（配列番号__）である。開始メチオニンは、下線が引かれる。オープンリーディングフレームは、終止コドンを含む核酸555から2144まで延びる。

【図2A-2】図2は、205P1B5v. 1のcDNA配列（配列番号__）およびアミノ酸配列（配列番号__）ならびに205P1B5v. 2のcDNA配列（配列番号__）およびアミノ酸配列（配列番号__）である。開始メチオニンは、下線が引かれる。オープンリーディングフレームは、終止コドンを含む核酸555から2144まで延びる。

【図2B-1】図2は、205P1B5v. 1のcDNA配列（配列番号__）およびアミノ酸配列（配列番号__）ならびに205P1B5v. 2のcDNA配列（配列番号__）およびアミノ酸配列（配列番号__）である。開始メチオニンは、下線が引かれる。オープンリーディングフレームは、終止コドンを含む核酸555から2144まで延びる。

10

【図2B-2】図2は、205P1B5v. 1のcDNA配列（配列番号__）およびアミノ酸配列（配列番号__）ならびに205P1B5v. 2のcDNA配列（配列番号__）およびアミノ酸配列（配列番号__）である。開始メチオニンは、下線が引かれる。オープンリーディングフレームは、終止コドンを含む核酸555から2144まで延びる。

【図3】図3は、205P1B5v. 1のアミノ酸配列（配列番号__）および205P1B5v. 2のアミノ酸配列（配列番号__）である。各205P1B5タンパク質は、529アミノ酸を有する。

【図4】図4は、GenBank登録番号（配列番号__）との、205P1B5の配列アライメントである。

20

【図5】図5は、Expasy分子生物学サーバーを介してProtScaleウェブサイト（world wide web URL ch/cgi-bin/protscale.pl）上でアクセスしたHoppおよびWoodsの方法（Hopp T. P., Woods K. R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:3824-3828）を使用してコンピューターアルゴリズム配列分析によって決定した、205P1B5の親水性アミノ酸プロファイルである。

【図6】図6は、Expasy分子生物学サーバーを介してProtScaleウェブサイト（world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl）上でアクセスしたKyteおよびDoolittleの方法（Kyte J., Doolittle R. F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132）を使用してコンピューターアルゴリズム配列分析によって決定した、205P1B5のヒドロパシーアミノ酸プロファイルである。

30

【図7】図7は、Expasy分子生物学サーバーを介してProtScaleウェブサイト（world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl）上でアクセスしたJaninの方法（Janin J., 1979 Nature 277:491-492）を使用してコンピューターアルゴリズム配列分析によって決定した、205P1B5の接触可能残基の%のアミノ酸プロファイルである。

【図8】図8は、Expasy分子生物学サーバーを介してProtScaleウェブサイト（world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl）上でアクセスしたBhaskaranおよびPonnuswamyの方法（Bhaskaran R., およびPonnuswamy P. K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255）を使用してコンピューターアルゴリズム配列分析によって決定した、205P1B5の平均可撓性アミノ酸プロファイルである。

40

【図9】図9は、Expasy分子生物学サーバーを介してProtScaleウェブサイト（world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl）上でアクセスしたDeleasgeおよびRouxの方法（Deleasge, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1:289-294）を使用してコンピューターアルゴリズム配列分析によって

50

決定した、205P1B5のβ-ターンのアミノ酸プロファイルである。

【図10】205P1B5発現のRT-PCR分析。第1鎖cDNAを、バイタルプール1（VP：肝臓、肺および腎臓）、バイタルプール2（VP2：脾臓、結腸および胃）、前立腺異種移植片プール（LAPC-4AD、LAPC-4AI、LAPC-9AD、LAPC-9AI）、前立腺癌プール、ならびに癌転移プールから調製した。正規化を、アクチンおよびGAPDHに対するプライマーを用いてPCRにより実施した。205P1B5に対するプライマーを用いる半定量的PCRを、26サイクルおよび30サイクルの増幅で実施した。結果は、前立腺癌プール、前立腺異種移植片プール、癌転移プールにおける205P1B5の発現を示すが、VP1およびVP2については示さない。

【図11】正常ヒト組織における205P1B5発現。2mgのmRNA／レーンでの2つの多組織ノーザンブロット（Clontech）を、205P1B5配列を用いてプローブした。キロベース（kb）単位でのサイズ標準は、片側に示される。結果は、前立腺における約5kbの205P1B5転写産物の制限された発現（矢印で示す）を示し、そして脳組織におけるより低いレベルを示す。サイズが約7.5kbのより大きい転写産物は、肝臓において検出される。

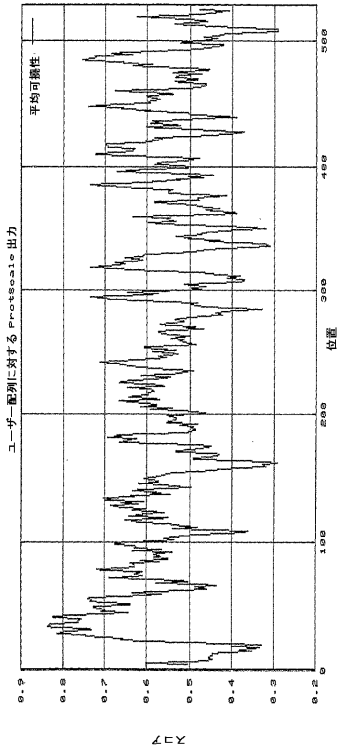
【図12】ヒト患者癌試料における205P1B5発現。RNAを、3つの前立腺癌腫瘍のプールならびに正常前立腺（NP）、正常膀胱（NB）、正常腎臓（NK）および正常結腸（NC）から抽出した。10mgの全RNA／レーンでのノーザンブロットを、205P1B5配列を用いてプローブした。キロベース（kb）単位でのサイズ標準は、片側に示される。結果は、前立腺癌プールおよび正常前立腺における205P1B5発現を示すが、他の正常組織については示さない。

【図13】前立腺癌異種移植片および前立腺癌患者試料における205P1B5発現。RNAを、前立腺癌患者由来の前立腺癌異種移植片（LAPC-4AD、LAPC-4AI、LAPC-9AD、LAPC-9AI）、前立腺癌細胞株PC3、正常前立腺（N）、前立腺腫瘍（T）および正常隣接組織（Nat）から抽出した。10mgの全RNA／レーンでのノーザンブロットを、205P1B5 SSH配列を用いてプローブした。キロベース（kb）単位でのサイズ標準は、片側に示される。結果は、試験した全ての前立腺腫瘍試料における205P1B5発現を示す。発現はまた、4つの異種移植片のうち3つにおいて見られるが、PC3細胞株においては見られない。

【図14】205P1B5についての二次構造および膜貫通予測。パネルA。205P1B5タンパク質の二次構造を、HNN-Hierarchical Neural Network法（Guermeur, 1997, world wide web URL pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html）を使用して示した。この方法は、ExPasy分子生物学的サーバー（world wide web URL expasy.ch/tools/）からアクセスされる。この方法は、タンパク質一次配列からαヘリックス、伸長したストランド、およびランダムコイルの存在および位置を示す。所定の二次構造のタンパク質のパーセントもまた示す。パネルB。TMBASE（K. Hofmann, W. Stoffel. TMBASE-A database of membrane spanning protein segments Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374:166, 1993）を使用するHofmannおよびStoffelのTMpredアルゴリズムに基づく、205P1B5の膜貫通領域および方向の概略図。パネルC。Sonnhhammer, von Heijne, およびKroghのアルゴリズム（Erik L. L.ら、A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, 175-182頁 J. Glasgowら編、Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998）に基づく205P1B5の膜貫通領域ならびに細胞外方向および細胞内方向の概略図。パネルBおよびパネルCに示される膜貫通プログラ

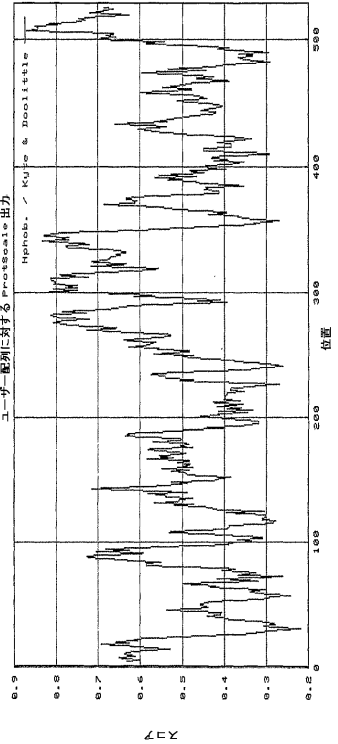
【図 8】

Figure 8: 205P1B5 平均可撓性プロファイル
(Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988.
Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255)



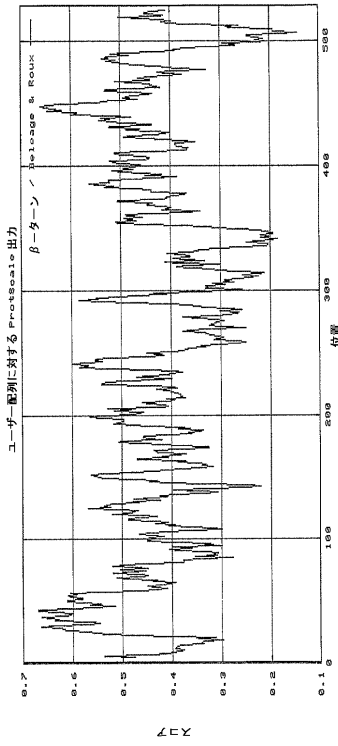
【図 6】

Figure 6: 205P1B5 ヒドロパシープロファイル
(Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132)



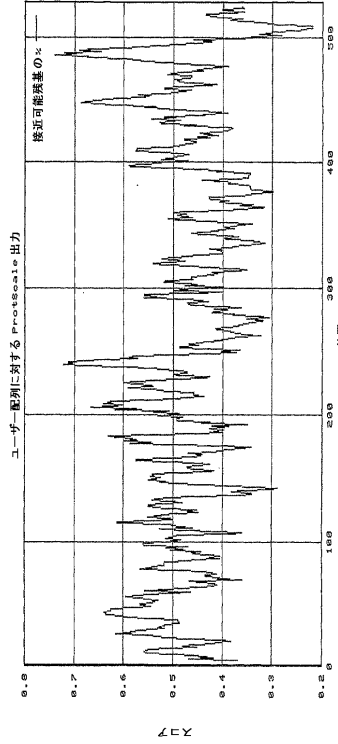
【図 9】

Figure 9: 205P1B5 β ターンプロファイル
(Deleage, G., Roux B. 1987. Protein Engineering 1:289-294)



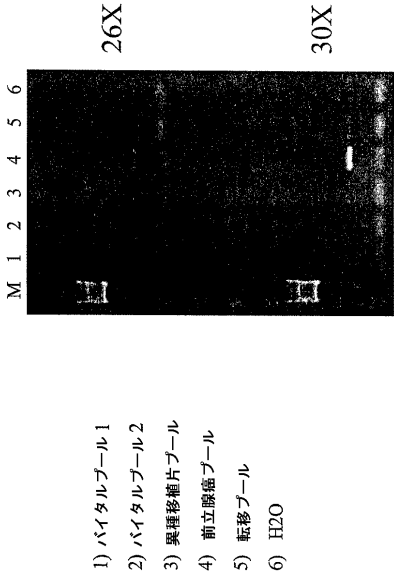
【図 7】

Figure 7: 205P1B5 接近可能残基の%のプロファイル
(Janin J., 1979. Nature 277:491-492)



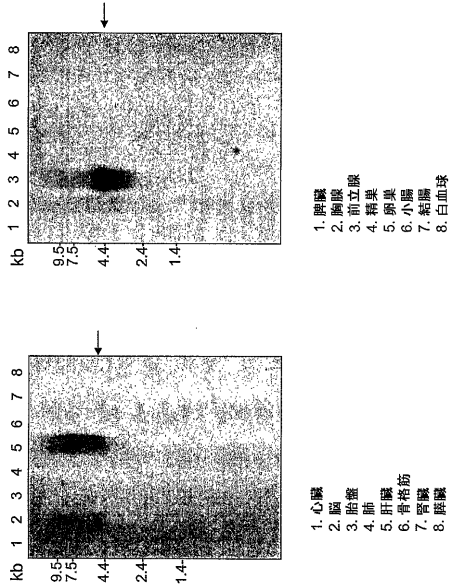
【図 1 0】

Figure 10 20SP1B5 発現の RT-PCR 分析



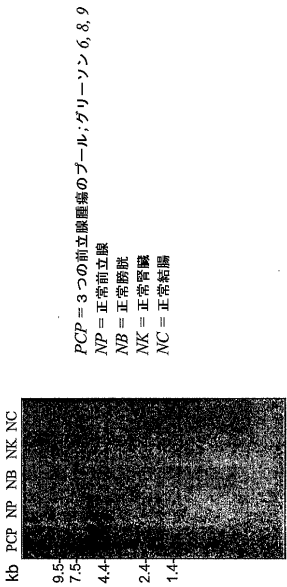
【図 1 1】

Figure 11 正常組織における20SP1B5の発現



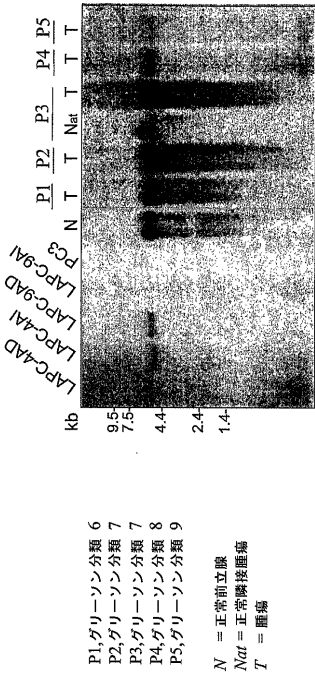
【図 1 2】

Figure 12 ヒト患者癌標本における20SP1B5の発現



【図 1 3】

Figure 13 前立腺癌異種移植細胞および前立腺癌患者標本における20SP1B5の発現



【図 1 6】

Figure 16:
205P1B5の発現は3T3細胞の増殖を増強する

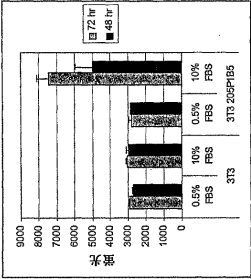


Figure 14

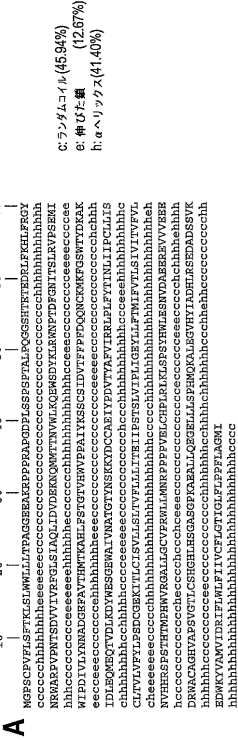
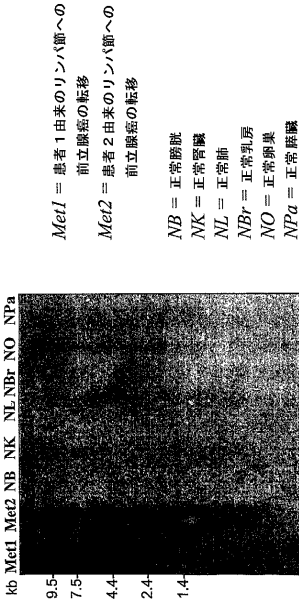


Figure 15:

前立腺癌転移標本における205P1B5の発現



【図 1 4】

【図 1 5】

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

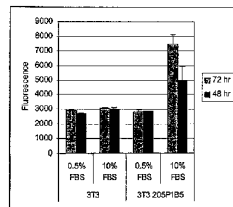
(10) International Publication Number
WO 03/020954 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12Q (74) Agents: MURASHIGE, Kate, H. et al.; Morrison & Foerster LLP, 3811 Valley Centre Drive, Suite 500, San Diego, CA 92130-2332 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/27760
- (22) International Filing Date: 30 August 2002 (30.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/316,664 31 August 2001 (31.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AGEN-SYS, INC. [US/US]; 1545 17th Street, Santa Monica, CA 90404 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): CHALLITA-ED, Pia, M. [LB/US]; 15745 Morrison Street, Encino, CA 91436 (US). RAITANO, Arthur, B. [US/US]; 10807 Cushman Avenue, Los Angeles, CA 90064 (US). FARIS, Mary [US/US]; 2538 Almaden Court, Los Angeles, CA 90077 (US). HUBERT, Rene, S. [CA/US]; 1644 North Occidental Boulevard, Los Angeles, CA 90026 (US). JAKOBOWITS, Aya [US/US]; 3135 Hutton Drive, Beverly Hills, CA 90210 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GR, GM, GU, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: NUCLEIC ACID AND CORRESPONDING PROTEIN ENCODED BY 205P1B5 USEFUL IN TREATMENT AND DETECTION OF CANCER

Expression of 205P1B5 Enhances Proliferation of 3T3 Cells



(57) Abstract: A novel gene (designated 205P1B5) and its encoded protein are described. While 205P1B5 exhibits tissue specific expression in normal adult tissue, it is aberrantly expressed in prostate cancer. Consequently, 205P1B5 provides a diagnostic, prognostic, prophylactic and/or therapeutic target for cancer. The 205P1B5 gene or fragment thereof, or its encoded protein or a fragment thereof, can be used to elicit an immune response.

WO 03/020954 A2

WO 03/020954 A2

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

WO 03/020954

PCT/US02/27760

**NUCLEIC ACID AND CORRESPONDING PROTEIN ENTITLED 205P1B5
USEFUL IN TREATMENT AND DETECTION OF CANCER**

5 FIELD OF THE INVENTION

The invention described herein relates to a novel gene and its encoded protein, termed 205P1B5, and to diagnostic and therapeutic methods and compositions useful in the management of various cancers that express 205P1B5.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

Cancer is the second leading cause of human death next to coronary disease. Worldwide, millions of people die from cancer every year. In the United States alone, as reported by the American Cancer Society, cancer causes the death of well over a half-million people annually, with over 1.2 million new cases diagnosed per year. While deaths from heart disease have been declining significantly, those resulting from cancer generally are on the rise. In the early part of the next century, cancer is predicted to become the leading cause of death.

Worldwide, several cancers stand out as the leading killers. In particular, carcinomas of the lung, prostate, breast, colon, pancreas, and ovary represent the primary causes of cancer death. These and virtually all other carcinomas share a common lethal feature. With very few exceptions, metastatic disease from a carcinoma is fatal. Moreover, even for those cancer patients who initially survive their primary cancers, common experience has shown that their lives are dramatically altered. Many cancer patients experience strong anxieties driven by the awareness of the potential for recurrence or treatment failure. Many cancer patients experience physical debilitations following treatment. Furthermore, many cancer patients experience a recurrence.

Worldwide, prostate cancer is the fourth most prevalent cancer in men. In North America and Northern Europe, it is by far the most common cancer in males and is the second leading cause of cancer death in men. In the United States alone, well over 30,000 men die annually of this disease - second only to lung cancer. Despite the magnitude of these figures, there is still no effective treatment for metastatic prostate cancer. Surgical prostatectomy, radiation therapy, hormone ablation therapy, surgical castration and chemotherapy continue to be the main treatment modalities. Unfortunately, these treatments are ineffective for many and are often associated with undesirable consequences.

On the diagnostic front, the lack of a prostate tumor marker that can accurately detect early-stage, localized tumors remains a significant limitation in the diagnosis and management of this disease. Although the serum prostate specific antigen (PSA) assay has been a very useful tool, however its specificity and general utility is widely regarded as lacking in several important respects.

Progress in identifying additional specific markers for prostate cancer has been improved by the generation of prostate cancer xenografts that can recapitulate different stages of the disease in mice. The LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) xenografts are prostate cancer xenografts that have survived passage in severe combined immune deficient (SCID) mice and have exhibited the capacity to mimic the transition from androgen dependence to androgen independence (Klein et al., 1997, Nat. Med. 3:402). More recently identified prostate cancer markers include PCTA-1 (Su et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), prostate-specific membrane (PSM) antigen (Pinto et al., Clin Cancer Res 1996 Sep 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert, et al., Proc

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7; 96(25): 14523-8) and prostate stem cell antigen (PSCA) (Reiter et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

While previously identified markers such as PSA, PSM, PCTA and PSCA have facilitated efforts to diagnose and treat prostate cancer, there is need for the identification of additional markers and therapeutic targets for prostate and related cancers in order to further improve diagnosis and therapy.

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for approximately 3 percent of adult malignancies. Once adenomas reach a diameter of 2 to 3 cm, malignant potential exists. In the adult, the two principal malignant renal tumors are renal cell adenocarcinoma and transitional cell carcinoma of the renal pelvis or ureter. The incidence of renal cell adenocarcinoma is estimated at more than 29,000 cases in the United States, and more than 11,600 patients died of this disease in 1998. Transitional cell carcinoma is less frequent, with an incidence of approximately 500 cases per year in the United States.

Surgery has been the primary therapy for renal cell adenocarcinoma for many decades. Until recently, metastatic disease has been refractory to any systemic therapy. With recent developments in systemic therapies, particularly immunotherapies, metastatic renal cell carcinoma may be approached aggressively in appropriate patients with a possibility of durable responses. Nevertheless, there is a remaining need for effective therapies for these patients.

Of all new cases of cancer in the United States, bladder cancer represents approximately 5 percent in men (fifth most common neoplasm) and 3 percent in women (eighth most common neoplasm). The incidence is increasing slowly, concurrent with an increasing older population. In 1998, there was an estimated 54,500 cases, including 39,500 in men and 15,000 in women. The age-adjusted incidence in the United States is 32 per 100,000 for men and 8 per 100,000 in women. The historic male/female ratio of 3:1 may be decreasing related to smoking patterns in women. There were an estimated 11,000 deaths from bladder cancer in 1998 (7,800 in men and 3,900 in women). Bladder cancer incidence and mortality strongly increase with age and will be an increasing problem as the population becomes more elderly.

Most bladder cancers recur in the bladder. Bladder cancer is managed with a combination of transurethral resection of the bladder (TUR) and intravesical chemotherapy or immunotherapy. The multifocal and recurrent nature of bladder cancer points out the limitations of TUR. Most muscle-invasive cancers are not cured by TUR alone. Radical cystectomy and urinary diversion is the most effective means to eliminate the cancer but carry an undeniable impact on urinary and sexual function. There continues to be a significant need for treatment modalities that are beneficial for bladder cancer patients.

An estimated 130,200 cases of colorectal cancer occurred in 2000 in the United States, including 93,800 cases of colon cancer and 36,400 of rectal cancer. Colorectal cancers are the third most common cancers in men and women. Incidence rates declined significantly during 1992-1996 (-2.1% per year). Research suggests that these declines have been due to increased screening and polyp removal, preventing progression of polyps to invasive cancers. There were an estimated 56,300 deaths (47,700 from colon cancer, 8,600 from rectal cancer) in 2000, accounting for about 11% of all U.S. cancer deaths.

At present, surgery is the most common form of therapy for colorectal cancer, and for cancers that have not spread, it is frequently curative. Chemotherapy, or chemotherapy plus radiation is given before or after surgery to most patients whose cancer has deeply perforated the bowel wall or has spread to the lymph nodes. A permanent colostomy (creation of an abdominal opening for elimination of body wastes) is occasionally needed

WO 03/020954

PCT/US02/27760

for colon cancer and is infrequently required for rectal cancer. There continues to be a need for effective diagnostic and treatment modalities for colorectal cancer.

There were an estimated 164,100 new cases of lung and bronchial cancer in 2000, accounting for 14% of all U.S. cancer diagnoses. The incidence rate of lung and bronchial cancer is declining significantly in men, from a high of 86.5 per 100,000 in 1984 to 70.0 in 1996. In the 1990s, the rate of increase among women began to slow. In 1996, the incidence rate in women was 42.3 per 100,000.

Lung and bronchial cancer caused an estimated 156,900 deaths in 2000, accounting for 28% of all cancer deaths. During 1992-1996, mortality from lung cancer declined significantly among men (-1.7% per year) while rates for women were still significantly increasing (0.9% per year). Since 1987, more women have died each year of lung cancer than breast cancer, which, for over 40 years, was the major cause of cancer death in women. Decreasing lung cancer incidence and mortality rates most likely resulted from decreased smoking rates over the previous 30 years; however, decreasing smoking patterns among women lag behind those of men. Of concern, although the declines in adult tobacco use have slowed, tobacco use in youth is increasing again.

Treatment options for lung and bronchial cancer are determined by the type and stage of the cancer and include surgery, radiation therapy, and chemotherapy. For many localized cancers, surgery is usually the treatment of choice. Because the disease has usually spread by the time it is discovered, radiation therapy and chemotherapy are often needed in combination with surgery. Chemotherapy alone or combined with radiation is the treatment of choice for small cell lung cancer; on this regimen, a large percentage of patients experience remission, which in some cases is long lasting. There is however, an ongoing need for effective treatment and diagnostic approaches for lung and bronchial cancers.

An estimated 182,800 new invasive cases of breast cancer were expected to occur among women in the United States during 2000. Additionally, about 1,400 new cases of breast cancer were expected to be diagnosed in men in 2000. After increasing about 4% per year in the 1980s, breast cancer incidence rates in women have leveled off in the 1990s to about 110.6 cases per 100,000.

In the U.S. alone, there were an estimated 41,200 deaths (40,800 women, 400 men) in 2000 due to breast cancer. Breast cancer ranks second among cancer deaths in women. According to the most recent data, mortality rates declined significantly during 1992-1996 with the largest decreases in younger women, both white and black. These decreases were probably the result of earlier detection and improved treatment.

Taking into account the medical circumstances and the patient's preferences, treatment of breast cancer may involve lumpectomy (local removal of the tumor) and removal of the lymph nodes under the arm; mastectomy (surgical removal of the breast) and removal of the lymph nodes under the arm; radiation therapy; chemotherapy; or hormone therapy. Often, two or more methods are used in combination. Numerous studies have shown that, for early stage disease, long-term survival rates after lumpectomy plus radiotherapy are similar to survival rates after modified radical mastectomy. Significant advances in reconstruction techniques provide several options for breast reconstruction after mastectomy. Recently, such reconstruction has been done at the same time as the mastectomy.

Local excision of ductal carcinoma in situ (DCIS) with adequate amounts of surrounding normal breast tissue may prevent the local recurrence of the DCIS. Radiation to the breast and/or tamoxifen may reduce the chance of DCIS occurring in the remaining breast tissue. This is important because DCIS, if left untreated, may develop into invasive breast cancer. Nevertheless, there are serious side effects or sequelae to these treatments. There is, therefore, a need for efficacious breast cancer treatments.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

There were an estimated 23,100 new cases of ovarian cancer in the United States in 2000. It accounts for 4% of all cancers among women and ranks second among gynecologic cancers. During 1992–1996, ovarian cancer incidence rates were significantly declining. Consequent to ovarian cancer, there were an estimated 14,000 deaths in 2000. Ovarian cancer causes more deaths than any other cancer of the female reproductive

5 system. Surgery, radiation therapy, and chemotherapy are treatment options for ovarian cancer. Surgery usually includes the removal of one or both ovaries, the fallopian tubes (salpingo-oophorectomy), and the uterus (hysterectomy). In some very early tumors, only the involved ovary will be removed, especially in young women who wish to have children. In advanced disease, an attempt is made to remove all intra-abdominal

10 disease to enhance the effect of chemotherapy. There continues to be an important need for effective treatment options for ovarian cancer.

There were an estimated 28,300 new cases of pancreatic cancer in the United States in 2000. Over the past 20 years, rates of pancreatic cancer have declined in men. Rates among women have remained approximately constant but may be beginning to decline. Pancreatic cancer caused an estimated 28,200 deaths in

15 2000 in the United States. Over the past 20 years, there has been a slight but significant decrease in mortality rates among men (about –0.9% per year) while rates have increased slightly among women.

Surgery, radiation therapy, and chemotherapy are treatment options for pancreatic cancer. These treatment options can extend survival and/or relieve symptoms in many patients but are not likely to produce a cure for most. There is a significant need for additional therapeutic and diagnostic options for pancreatic cancer.

20

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a gene, designated 205P1B5, that is over-expressed in the cancer(s) listed in Table I. There are two variants of 205P1B5 (see, e.g. Figure 2); unless the context clearly indicates otherwise, Reference herein to 205P1B5 refers to either of these variants. Northern blot expression analysis of

25 205P1B5 gene expression in normal tissues shows a restricted expression pattern in adult tissues. The nucleotide (Figure 2) and amino acid (Figure 2, and Figure 3) sequences of 205P1B5 are provided. The tissue-related profile of 205P1B5 in normal adult tissues, combined with the over-expression observed in prostate tumors, shows that 205P1B5 is aberrantly over-expressed in at least some cancers, and thus serves as a useful diagnostic, prophylactic, prognostic, and/or therapeutic target for cancers of the tissue(s) such as those listed in Table I.

30 The invention provides polynucleotides corresponding or complementary to all or part of the 205P1B5 genes, mRNAs, and/or coding sequences, preferably in isolated form, including polynucleotides encoding 205P1B5-related proteins and fragments of 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or more than 25 contiguous amino acids; at least 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100 or more than 100 contiguous amino acids of a 205P1B5-related protein, as well as the peptides/proteins themselves;

35 DNA, RNA, DNA/RNA hybrids, and related molecules, polynucleotides or oligonucleotides complementary or having at least a 90% homology to the 205P1B5 genes or mRNA sequences or parts thereof, and polynucleotides or oligonucleotides that hybridize to the 205P1B5 genes, mRNAs, or to 205P1B5-encoding polynucleotides. Also provided are means for isolating cDNAs and the genes encoding 205P1B5. Recombinant DNA molecules containing 205P1B5 polynucleotides, cells transformed or transduced with such molecules, and host-vector systems

40 for the expression of 205P1B5 gene products are also provided. The invention further provides antibodies that bind to 205P1B5 proteins and polypeptide fragments thereof, including polyclonal and monoclonal antibodies,

WO 03/020954

PCT/US02/27760

murine and other mammalian antibodies, chimeric antibodies, humanized and fully human antibodies, and antibodies labeled with a detectable marker. In certain embodiments there is a proviso that the entire nucleic acid sequence of Figure 2 is not encoded and/or the entire amino acid sequence of Figure 2 is not prepared. In certain embodiments, the entire nucleic acid sequence of Figure 2 is encoded and/or the entire amino acid

sequence of Figure 2 is prepared, either of which are in respective human unit dose forms.

The invention further provides methods for detecting the presence and status of 205P1B5 polynucleotides and proteins in various biological samples, as well as methods for identifying cells that express 205P1B5. A typical embodiment of this invention provides methods for monitoring 205P1B5 gene products in a tissue or hematology sample having or suspected of having some form of growth dysregulation such as cancer.

The invention further provides various immunogenic or therapeutic compositions and strategies for treating cancers that express 205P1B5 such as prostate cancers, including therapies aimed at inhibiting the transcription, translation, processing or function of 205P1B5 as well as cancer vaccines.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. 205P1B5 SSH sequence. The 205P1B5 SSH sequence.

Figure 2. The cDNA (SEQ ID. NO. :____) and amino acid sequence (SEQ ID. NO. :____) of 205P1B5 v.1 and the cDNA (SEQ ID. NO. :____) and amino acid sequence (SEQ ID. NO. :____) of 205P1B5 v.2. The start methionine is underlined. The open reading frame extends from nucleic acid 555 to 2144 including the stop codon.

Figure 3. Amino acid sequence of 205P1B5 v.1 (SEQ ID. NO. :____) and amino acid sequence of 205P1B5 v.2 (SEQ ID. NO. :____). Each 205P1B5 protein has 529 amino acids.

Figure 4. Sequence alignment of 205P1B5 with GenBank accession number (SEQ ID. NO. :____).

Figure 5. Hydrophilicity amino acid profile of 205P1B5 determined by computer algorithm sequence analysis using the method of Hopp and Woods (Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828) accessed on the ProtScale website (world wide web URL cgi-bin/protscale.pl) through the ExPasy molecular biology server.

Figure 6. Hydropathicity amino acid profile of 205P1B5 determined by computer algorithm sequence analysis using the method of Kyte and Doolittle (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132) accessed on the ProtScale website (world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) through the ExPasy molecular biology server.

Figure 7. Percent accessible residues amino acid profile of 205P1B5 determined by computer algorithm sequence analysis using the method of Janin (Janin J., 1979 Nature 277:491-492) accessed on the ProtScale website (world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) through the ExPasy molecular biology server.

Figure 8. Average flexibility amino acid profile of 205P1B5 determined by computer algorithm sequence analysis using the method of Bhaskaran and Ponnuswamy (Bhaskaran R., and Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255) accessed on the ProtScale website (world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) through the ExPasy molecular biology server.

Figure 9. Beta-turn amino acid profile of 205P1B5 determined by computer algorithm sequence analysis using the method of Deleage and Roux (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1:289-294)

WO 03/020954

PCT/US02/27760

accessed on the ProtScale website (world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) through the ExPasy molecular biology server.

Figure 10. RT-PCR analysis of 205P1B5 expression. First strand cDNA was prepared from vital pool 1 (VP: liver, lung and kidney), vital pool 2 (VP2: pancreas, colon and stomach), prostate xenograft pool (LAPC-4AD, LAPC-4AI, LAPC-9AD, LAPC-9AI), prostate cancer pool, and cancer metastasis pool. Normalization was performed by PCR using primers to actin and GAPDH. Semi-quantitative PCR, using primers to 205P1B5, was performed at 26 and 30 cycles of amplification. Results show expression of 205P1B5 in prostate cancer pool, prostate xenograft pool, cancer metastasis pool, but not in VP1 and VP2.

Figure 11. Expression of 205P1B5 in normal human tissues. Two multiple tissue northern blots (Clontech) with 2 mg of mRNA/lane, were probed with 205P1B5 sequences. Size standards in kilobases (kb) are indicated on the side. The results show restricted expression of an approximately 5 kb 205P1B5 transcript (indicated with an arrow) in prostate and to lower level in brain tissues. A larger transcript of approximately 7.5 kb in size is detected in liver.

Figure 12. Expression of 205P1B5 in human patient cancer specimens. RNA was extracted from a pool of 3 prostate cancer tumors, as well as from normal prostate (NP), normal bladder (NB), normal kidney (NK) and normal colon (NC). Northern blots with 10 mg of total RNA/lane were probed with 205P1B5 sequences. Size standards in kilobases (kb) are indicated on the side. The results show expression of 205P1B5 in prostate cancer pool and normal prostate, but not in the other normal tissues.

Figure 13. Expression of 205P1B5 in Prostate Cancer Xenografts and Prostate Cancer Patient Specimens. RNA was extracted from prostate cancer xenografts (LAPC-4AD, LAPC-4AI, LAPC-9AD, LAPC-9AI), prostate cancer cell line PC3, normal prostate (N), prostate tumors (T) and normal adjacent tissue (Nat) derived from prostate cancer patients. Northern blot with 10 mg of total RNA/lane was probed with the 205P1B5 SSH sequence. Size standards in kilobases (kb) are indicated on the side. Results show expression of 205P1B5 in all prostate tumor specimens tested. Expression is also seen in 3 of the 4 xenografts, but not in the PC3 cell line.

Figure 14. Secondary structure and transmembrane prediction for 205P1B5. Panel A. The secondary structure of 205P1B5 protein was depicted using the HNN - Hierarchical Neural Network method (Guermur, 1997, world wide web URL pbil.ibcp.fr/cgi-bin/mpsa_automat.pl?page=mpsa_nn.html), accessed from the ExPasy molecular biology server (world wide web URL expasy.ch/tools/). This method indicates the presence and location of alpha helices, extended strands, and random coils from the primary protein sequence. The percent of the protein in a given secondary structure is also given. Panel B. Schematic representation of transmembrane regions and orientation of 205P1B5 based on the TMpred algorithm of Hofmann and Stoffel which utilizes TMBASE (K. Hofmann, W. Stoffel. TMBASE - A database of membrane spanning protein segments Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374:166, 1993). Panel C. Schematic representation of transmembrane regions and the extracellular and intracellular orientation of 205P1B5 based on the algorithm of Sonnhammer, von Heijne, and Krogh (Erik L.L., et al., A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182 Ed J. Glasgow, et al., Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998). Both transmembrane programs presented in Panel B and Panel C indicate that 205P1B5 contains 5 transmembrane domains consistent with it being a G-protein coupled receptor.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Figure 15. Expression of 205P1B5 in cancer metastasis patient specimens. RNA was extracted from prostate cancer metastasis to lymph node obtained from two different patients, as well as from normal bladder (NB), normal kidney (NK), normal lung (NL), normal breast (NB), normal ovary (NO), and normal pancreas (NPa). Northern blots with 10 µg of total RNA/lane were probed with 205P1B5 sequence. Size standards in kilobases (kb) are indicated on the side. The results show expression of 205P1B5 in both cancer metastasis samples but not in the normal tissues tested.

Figure 16. Enhanced Proliferation of Recombinant 3T3-205P1B5 Cells. For this data, control 3T3 and 3T3-205P1B5 cells were grown in 96 well plate in 0.5 or 10% FBS. Proliferation was measured by Alamar blue after 48 and 72 hours. Enhanced proliferation of 3T3-205P1B5 relative to control cells is observed as early as 48 hours.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Outline of Sections

- I.) Definitions
- 15 II.) 205P1B5 Polynucleotides
 - II.A.) Uses of 205P1B5 Polynucleotides
 - II.A.1.) Monitoring of Genetic Abnormalities
 - II.A.2.) Antisense Embodiments
 - II.A.3.) Primers and Primer Pairs
 - 20 II.A.4.) Isolation of 205P1B5-Encoding Nucleic Acid Molecules
 - II.A.5.) Recombinant Nucleic Acid Molecules and Host-Vector Systems
- III.) 205P1B5-related Proteins
 - III.A.) Motif-bearing Protein Embodiments
 - III.B.) Expression of 205P1B5-related Proteins
 - 25 III.C.) Modifications of 205P1B5-related Proteins
 - III.D.) Uses of 205P1B5-related Proteins
- IV.) 205P1B5 Antibodies
- V.) 205P1B5 Cellular Immune Responses
- VI.) 205P1B5 Transgenic Animals
- 30 VII.) Methods for the Detection of 205P1B5
- VIII.) Methods for Monitoring the Status of 205P1B5-related Genes and Their Products
- IX.) Identification of Molecules That Interact With 205P1B5
- X.) Therapeutic Methods and Compositions
 - X.A.) Anti-Cancer Vaccines
 - 35 X.B.) 205P1B5 as a Target for Antibody-Based Therapy
 - X.C.) 205P1B5 as a Target for Cellular Immune Responses
 - X.C.1. Minigene Vaccines
 - X.C.2. Combinations of CTL Peptides with Helper Peptides
 - X.C.3. Combinations of CTL Peptides with T Cell Priming Agents
 - 40 X.C.4. Vaccine Compositions Comprising DC Pulsed with CTL and/or HTL Peptides

WO 03/020954

PCT/US02/27760

X.D.) Adoptive Immunotherapy

X.E.) Administration of Vaccines for Therapeutic or Prophylactic Purposes

XI.) Diagnostic and Prognostic Embodiments of 205P1B5.

XII.) Inhibition of 205P1B5 Protein Function

XII.A.) Inhibition of 205P1B5 With Intracellular Antibodies

XII.B.) Inhibition of 205P1B5 with Recombinant Proteins

XII.C.) Inhibition of 205P1B5 Transcription or Translation

XII.D.) General Considerations for Therapeutic Strategies

XIII.) KITS

I.) Definitions:

Unless otherwise defined, all terms of art, notations and other scientific terms or terminology used herein are intended to have the meanings commonly understood by those of skill in the art to which this invention pertains. In some cases, terms with commonly understood meanings are defined herein for clarity and/or for ready reference, and the inclusion of such definitions herein should not necessarily be construed to represent a substantial difference over what is generally understood in the art. Many of the techniques and procedures described or referenced herein are well understood and commonly employed using conventional methodology by those skilled in the art, such as, for example, the widely utilized molecular cloning methodologies described in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. As appropriate, procedures involving the use of commercially available kits and reagents are generally carried out in accordance with manufacturer defined protocols and/or parameters unless otherwise noted.

The terms "advanced prostate cancer", "locally advanced prostate cancer", "advanced disease" and "locally advanced disease" mean prostate cancers that have extended through the prostate capsule, and are meant to include stage C disease under the American Urological Association (AUA) system, stage C1 - C2 disease under the Whitmore-Jewett system, and stage T3 - T4 and N+ disease under the TNM (tumor, node, metastasis) system. In general, surgery is not recommended for patients with locally advanced disease, and these patients have substantially less favorable outcomes compared to patients having clinically localized (organ-confined) prostate cancer. Locally advanced disease is clinically identified by palpable evidence of induration beyond the lateral border of the prostate, or asymmetry or induration above the prostate base. Locally advanced prostate cancer is presently diagnosed pathologically following radical prostatectomy if the tumor invades or penetrates the prostatic capsule, extends into the surgical margin, or invades the seminal vesicles.

"Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence 205P1B5 (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence 205P1B5. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

The term "analog" refers to a molecule which is structurally similar or shares similar or corresponding attributes with another molecule (e.g. a 205P1B5-related protein). For example an analog of the 205P1B5 protein can be specifically bound by an antibody or T cell that specifically binds to 205P1B5.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

The term "antibody" is used in the broadest sense. Therefore an "antibody" can be naturally occurring or man-made such as monoclonal antibodies produced by conventional hybridoma technology. Anti-205P1B5 antibodies comprise monoclonal and polyclonal antibodies as well as fragments containing the antigen-binding domain and/or one or more complementarity determining regions of these antibodies.

5 An "antibody fragment" is defined as at least a portion of the variable region of the immunoglobulin molecule that binds to its target, i.e., the antigen-binding region. In one embodiment it specifically covers single anti-205P1B5 antibodies and clones thereof (including agonist, antagonist and neutralizing antibodies) and anti-205P1B5 antibody compositions with polypeptidic specificity.

10 The term "codon optimized sequences" refers to nucleotide sequences that have been optimized for a particular host species by replacing any codons having a usage frequency of less than about 20%. Nucleotide sequences that have been optimized for expression in a given host species by elimination of spurious polyadenylation sequences, elimination of exon/intron splicing signals, elimination of transposon-like repeats and/or optimization of GC content in addition to codon optimization are referred to herein as an "expression enhanced sequences."

15 The term "cytotoxic agent" refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes chemotherapeutic agents, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof. Examples of cytotoxic agents include, but are not limited to maytansinoids, yttrium, bismuth, ricin, ricin A-chain, doxorubicin, daunorubicin, taxol, etidim bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin, 20 diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, gelonin, mitogellin, retictrictocin, phenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, sapaonaria officinalis inhibitor, and glucocorticoid and other chemotherapeutic agents, as well as radioisotopes such as At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} and radioactive isotopes of Lu. Antibodies may also be conjugated to an anti-cancer pro-drug activating enzyme capable of converting the pro-drug to its active form.

The term "homolog" refers to a molecule which exhibits homology to another molecule, by for example, having sequences of chemical residues that are the same or similar at corresponding positions.

"Human Leukocyte Antigen" or "HLA" is a human class I or class II Major Histocompatibility Complex (MHC) protein (*see, e.g., Stites, et al., IMMUNOLOGY*, 8th Ed., Lange Publishing, Los Altos, CA 30 (1994).

The terms "hybridize", "hybridizing", "hybridizes" and the like, used in the context of polynucleotides, are meant to refer to conventional hybridization conditions, preferably such as hybridization in 50% formamide/6XSSC/0.1% SDS/100 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA, in which temperatures for hybridization are above 37 degrees C and temperatures for washing in 0.1XSSC/0.1% SDS are above 55 degrees C.

35 The phrases "isolated" or "biologically pure" refer to material which is substantially or essentially free from components which normally accompany the material as it is found in its native state. Thus, isolated peptides in accordance with the invention preferably do not contain materials normally associated with the peptides in their *in situ* environment. For example, a polynucleotide is said to be "isolated" when it is substantially separated from contaminant polynucleotides that correspond or are complementary to genes other than the 205P1B5 40 gene or that encode polypeptides other than 205P1B5 gene product or fragments thereof. A skilled artisan can readily employ nucleic acid isolation procedures to obtain an isolated 205P1B5 polynucleotide. A protein is said to

WO 03/020954

PCT/US02/27760

be "isolated," for example, when physical, mechanical or chemical methods are employed to remove the 205P1B5 protein from cellular constituents that are normally associated with the protein. A skilled artisan can readily employ standard purification methods to obtain an isolated 205P1B5 protein. Alternatively, an isolated protein can be prepared by chemical means.

5 The term "mammal" refers to any organism classified as a mammal, including mice, rats, rabbits, dogs, cats, cows, horses and humans. In one embodiment of the invention, the mammal is a mouse. In another embodiment of the invention, the mammal is a human.

The terms "metastatic prostate cancer" and "metastatic disease" mean prostate cancers that have spread to regional lymph nodes or to distant sites, and are meant to include stage D disease under the AUA system and stage TxNxM+ under the TNM system. As is the case with locally advanced prostate cancer, surgery is
10 generally not indicated for patients with metastatic disease, and hormonal (androgen ablation) therapy is a preferred treatment modality. Patients with metastatic prostate cancer eventually develop an androgen-refractory state within 12 to 18 months of treatment initiation. Approximately half of these androgen-refractory patients die within 6 months after developing that status. The most common site for prostate cancer metastasis is bone.
15 Prostate cancer bone metastases are often osteoblastic rather than osteolytic (i.e., resulting in net bone formation). Bone metastases are found most frequently in the spine, followed by the femur, pelvis, rib cage, skull and humerus. Other common sites for metastasis include lymph nodes, lung, liver and brain. Metastatic prostate cancer is typically diagnosed by open or laparoscopic pelvic lymphadenectomy, whole body radionuclide scans, skeletal radiography, and/or bone lesion biopsy.

20 The term "monoclonal antibody" refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that are present in minor amounts.

A "motif", as in biological motif of an 205P1B5-related protein, refers to any pattern of amino acids forming part of the primary sequence of a protein, that is associated with a particular function (e.g. protein-protein interaction, protein-DNA interaction, etc) or modification (e.g. that is phosphorylated, glycosylated or
25 amidated), or localization (e.g. secretory sequence, nuclear localization sequence, etc.) or a sequence that is correlated with being immunogenic, either humorally or cellularly. A motif can be either contiguous or capable of being aligned to certain positions that are generally correlated with a certain function or property. In the context of HLA motifs, "motif" refers to the pattern of residues in a peptide of defined length, usually a peptide
30 of from about 8 to about 13 amino acids for a class I HLA motif and from about 6 to about 25 amino acids for a class II HLA motif, which is recognized by a particular HLA molecule. Peptide motifs for HLA binding are typically different for each protein encoded by each human HLA allele and differ in the pattern of the primary and secondary anchor residues.

A "pharmaceutical excipient" comprises a material such as an adjuvant, a carrier, pH-adjusting and
35 buffering agents, tonicity adjusting agents, wetting agents, preservative, and the like.

"Pharmaceutically acceptable" refers to a non-toxic, inert, and/or composition that is physiologically compatible with humans or other mammals.

The term "polynucleotide" means a polymeric form of nucleotides of at least 10 bases or base pairs in length, either ribonucleotides or deoxynucleotides or a modified form of either type of nucleotide, and is meant
40 to include single and double stranded forms of DNA and/or RNA. In the art, this term is often used interchangeably with "oligonucleotide". A polynucleotide can comprise a nucleotide sequence disclosed herein

WO 03/020954

PCT/US02/27760

wherein thymidine (T) (as shown for example in SEQ ID NO: 702) can also be uracil (U); this definition pertains to the differences between the chemical structures of DNA and RNA, in particular the observation that one of the four major bases in RNA is uracil (U) instead of thymidine (T).

The term "polypeptide" means a polymer of at least about 4, 5, 6, 7, or 8 amino acids. Throughout the specification, standard three letter or single letter designations for amino acids are used. In the art, this term is often used interchangeably with "peptide" or "protein".

An HLA "primary anchor residue" is an amino acid at a specific position along a peptide sequence which is understood to provide a contact point between the immunogenic peptide and the HLA molecule. One to three, usually two, primary anchor residues within a peptide of defined length generally defines a "motif" for an immunogenic peptide. These residues are understood to fit in close contact with peptide binding groove of an HLA molecule, with their side chains buried in specific pockets of the binding groove. In one embodiment, for example, the primary anchor residues for an HLA class I molecule are located at position 2 (from the amino terminal position) and at the carboxyl terminal position of a 8, 9, 10, 11, or 12 residue peptide epitope in accordance with the invention. In another embodiment, for example, the primary anchor residues of a peptide that will bind an HLA class II molecule are spaced relative to each other, rather than to the termini of a peptide, where the peptide is generally of at least 9 amino acids in length. The primary anchor positions for each motif and supermotif are set forth in Table IV. For example, analog peptides can be created by altering the presence or absence of particular residues in the primary and/or secondary anchor positions shown in Table IV. Such analogs are used to modulate the binding affinity and/or population coverage of a peptide comprising a particular HLA motif or supermotif.

A "recombinant" DNA or RNA molecule is a DNA or RNA molecule that has been subjected to molecular manipulation *in vitro*.

"Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured nucleic acid sequences to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature that can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Stringent conditions" or "high stringency conditions", as defined herein, are identified by, but not limited to, those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42 °C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42 °C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55 °C, followed by a high-stringency wash.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55 °C. "Moderately stringent conditions" are described by, but not limited to, those in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and %SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/mL denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

10 An HLA "supernotif" is a peptide binding specificity shared by HLA molecules encoded by two or more HLA alleles.

As used herein "to treat" or "therapeutic" and grammatically related terms, refer to any improvement of any consequence of disease, such as prolonged survival, less morbidity, and/or a lessening of side effects which are the byproducts of an alternative therapeutic modality; full eradication of disease is not required.

15 A "transgenic animal" (e.g., a mouse or rat) is an animal having cells that contain a transgene, which transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, e.g., an embryonic stage. A "transgene" is a DNA that is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops.

As used herein, an HLA or cellular immune response "vaccine" is a composition that contains or encodes one or more peptides of the invention. There are numerous embodiments of such vaccines, such as a cocktail of one or more individual peptides; one or more peptides of the invention comprised by a polypeptidic peptide; or nucleic acids that encode such individual peptides or polypeptides, e.g., a minigene that encodes a polypeptidic peptide. The "one or more peptides" can include any whole unit integer from 1-150 or more, e.g., at least 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, or 150 or more peptides of the invention. The peptides or polypeptides can optionally be modified, such as by lipidation, addition of targeting or other sequences. HLA class I peptides of the invention can be admixed with, or linked to, HLA class II peptides, to facilitate activation of both cytotoxic T lymphocytes and helper T lymphocytes. HLA vaccines can also comprise peptide-pulsed antigen presenting cells, e.g., dendritic cells.

30 The term "variant" refers to a molecule that exhibits a variation from a described type or norm, such as a protein that has one or more different amino acid residues in the corresponding position(s) of a specifically described protein (e.g. the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3). An analog is an example of a variant protein. Splice isoforms and single nucleotide polymorphisms (SNPs) are further examples of variants.

The 205P1B5-related proteins of the invention include those specifically identified herein, as well as allelic variants, conservative substitution variants, analogs and homologs that can be isolated/generated and characterized without undue experimentation following the methods outlined herein or readily available in the art. Fusion proteins that combine parts of different 205P1B5 proteins or fragments thereof, as well as fusion proteins of a 205P1B5 protein and a heterologous polypeptide are also included. Such 205P1B5 proteins are collectively referred to as the 205P1B5-related proteins, the proteins of the invention, or 205P1B5. The term "205P1B5-related protein" refers to a polypeptide fragment or an 205P1B5 protein sequence of 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or more than 25 amino acids; or, at least 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105,

WO 03/020954

PCT/US02/27760

110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, or 529 or more amino acids.

II.) 205P1B5 Polynucleotides

5 One aspect of the invention provides polynucleotides corresponding or complementary to all or part of an 205P1B5 gene, mRNA, and/or coding sequence, preferably in isolated form, including polynucleotides encoding an 205P1B5-related protein and fragments thereof, DNA, RNA, DNA/RNA hybrid, and related molecules, polynucleotides or oligonucleotides complementary to an 205P1B5 gene or mRNA sequence or a part thereof, and polynucleotides or oligonucleotides that hybridize to an 205P1B5 gene, mRNA, or to an 205P1B5 encoding polynucleotide (collectively, "205P1B5 polynucleotides"). In all instances when referred to in this section, T can also be U in Figure 2.

Embodiments of a 205P1B5 polynucleotide include: a 205P1B5 polynucleotide having the sequence shown in Figure 2, the nucleotide sequence of 205P1B5 as shown in Figure 2, wherein T is U; at least 10 contiguous nucleotides of a polynucleotide having the sequence as shown in Figure 2; or, at least 10 contiguous nucleotides of a polynucleotide having the sequence as shown in Figure 2 where T is U. For example, 15 embodiments of 205P1B5 nucleotides comprise, without limitation:

- (a) a polynucleotide comprising or consisting of the sequence as shown in Figure 2 (SEQ ID NO.: _____), wherein T can also be U;
- 20 (b) a polynucleotide comprising or consisting of the sequence as shown in Figure 2 (SEQ ID NO.: _____), from nucleotide residue number 555 through nucleotide residue number 2144, wherein T can also be U;
- (c) a polynucleotide that encodes a 205P1B5-related protein whose sequence is encoded by the cDNAs contained in the plasmid designated _____ deposited with American Type Culture Collection as Accession No. _____;
- 25 (d) a polynucleotide that encodes an 205P1B5-related protein that is at least 90% homologous to the entire amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO.: _____);
- (e) a polynucleotide that encodes an 205P1B5-related protein that is at least 90% identical to the entire amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO.: _____);
- 30 (f) a polynucleotide that encodes at least one peptide set forth in Tables V-XVIII;
- (g) a polynucleotide that encodes a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 3 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Hydrophilicity profile of Figure 5;
- 35 (h) a polynucleotide that encodes a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 3 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value less than 0.5 in the Hydrophobicity profile of Figure 6;

WO 03/020954

PCT/US02/27760

- (i) a polynucleotide that encodes a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 3 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Percent Accessible Residues profile of Figure 7;
- (j) a polynucleotide that encodes a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 3 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Average Flexibility profile of Figure 8;
- (k) a polynucleotide that encodes a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 3 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Beta-turn profile of Figure 9;
- (l) a polynucleotide that is fully complementary to a polynucleotide of any one of (a)-(k);
- (m) a polynucleotide that selectively hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide of (a)-(l);
- (n) a peptide that is encoded by any of (a)-(k); and,
- (o) a polynucleotide of any of (a)-(m) or peptide of (n) together with a pharmaceutical excipient and/or in a human unit dose form.

As used herein, a range is understood to specifically disclose all whole unit positions thereof.

Typical embodiments of the invention disclosed herein include 205P1B5 polynucleotides that encode specific portions of the 205P1B5 mRNA sequence (and those which are complementary to such sequences) such as those that encode the protein and fragments thereof, for example of 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525 or 529 contiguous amino acids.

For example, representative embodiments of the invention disclosed herein include: polynucleotides and their encoded peptides themselves encoding about amino acid 1 to about amino acid 10 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 10 to about amino acid 20 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2, or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 20 to about amino acid 30 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 30 to about amino acid 40 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 40 to about amino acid 50 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 50 to about amino acid 60 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 60 to about amino acid 70 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 70 to about amino acid 80 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 80 to about amino acid 90 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polynucleotides encoding about amino acid 90 to about amino acid 100 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, in increments of about 10 amino acids, ending at the carboxyl terminal amino acid set forth in Figure 2 or Figure 3. Accordingly polynucleotides

WO 03/020954

PCT/US02/27760

encoding portions of the amino acid sequence (of about 10 amino acids), of amino acids 100 through the carboxyl terminal amino acid of the 205P1B5 protein are embodiments of the invention. Wherein it is understood that each particular amino acid position discloses that position plus or minus five amino acid residues.

5 Polynucleotides encoding relatively long portions of the 205P1B5 protein are also within the scope of the invention. For example, polynucleotides encoding from about amino acid 1 (or 20 or 30 or 40 etc.) to about amino acid 20, (or 30, or 40 or 50 etc.) of the 205P1B500 protein shown in Figure 2 or Figure 3 can be generated by a variety of techniques well known in the art. These polynucleotide fragments can include any portion of the 205P1B5 sequence as shown in Figure 2 or Figure 3.

10 Additional illustrative embodiments of the invention disclosed herein include 205P1B5 polynucleotide fragments encoding one or more of the biological motifs contained within the 205P1B5 protein sequence, including one or more of the motif-bearing subsequences of the 205P1B5 protein set forth in Tables V-XVIII. In another embodiment, typical polynucleotide fragments of the invention encode one or more of the regions of 205P1B5 that exhibit homology to a known molecule. In another embodiment of the invention, typical
15 polynucleotide fragments can encode one or more of the 205P1B5 N-glycosylation sites, cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites, casein kinase II phosphorylation sites or N-myristoylation site and amidation sites.

II.A.) Uses of 205P1B5 Polynucleotides

II.A.1.) Monitoring of Genetic Abnormalities

The polynucleotides of the preceding paragraphs have a number of different specific uses. The human 205P1B5 gene maps to the chromosomal location set forth in Example 3. For example, because the 205P1B5 gene maps to this chromosome, polynucleotides that encode different regions of the 205P1B5 protein are used to characterize cytogenetic abnormalities of this chromosomal locale, such as abnormalities that are identified as
25 being associated with various cancers. In certain genes, a variety of chromosomal abnormalities including rearrangements have been identified as frequent cytogenetic abnormalities in a number of different cancers (see e.g. Krajcinovic et al., *Mutat. Res.* 382(3-4): 81-83 (1998); Johansson et al., *Blood* 86(10): 3905-3914 (1995) and Finger et al., *P.N.A.S.* 85(23): 9158-9162 (1988)). Thus, polynucleotides encoding specific regions of the 205P1B5 protein provide new tools that can be used to delineate, with greater precision than previously possible,
30 cytogenetic abnormalities in the chromosomal region that encodes 205P1B5 that may contribute to the malignant phenotype. In this context, these polynucleotides satisfy a need in the art for expanding the sensitivity of chromosomal screening in order to identify more subtle and less common chromosomal abnormalities (see e.g. Evans et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171(4): 1055-1057 (1994)).

Furthermore, as 205P1B5 was shown to be highly expressed in prostate and other cancers, 205P1B5
35 polynucleotides are used in methods assessing the status of 205P1B5 gene products in normal versus cancerous tissues. Typically, polynucleotides that encode specific regions of the 205P1B5 protein are used to assess the presence of perturbations (such as deletions, insertions, point mutations, or alterations resulting in a loss of an antigen etc.) in specific regions of the 205P1B5 gene, such as such regions containing one or more motifs. Exemplary assays include both RT-PCR assays as well as single-strand conformation polymorphism (SSCP)
40 analysis (see, e.g., Marrogi et al., *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369-378 (1999)), both of which utilize polynucleotides encoding specific regions of a protein to examine these regions within the protein.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

II.A.2.) Antisense Embodiments

Other specifically contemplated nucleic acid related embodiments of the invention disclosed herein are genomic DNA, cDNAs, ribozymes, and antisense molecules, as well as nucleic acid molecules based on an alternative backbone, or including alternative bases, whether derived from natural sources or synthesized, and include molecules capable of inhibiting the RNA or protein expression of 205P1B5. For example, antisense molecules can be RNAs or other molecules, including peptide nucleic acids (PNAs) or non-nucleic acid molecules such as phosphorothioate derivatives, that specifically bind DNA or RNA in a base pair-dependent manner. A skilled artisan can readily obtain these classes of nucleic acid molecules using the 205P1B5 polynucleotides and polynucleotide sequences disclosed herein.

Antisense technology entails the administration of exogenous oligonucleotides that bind to a target polynucleotide located within the cells. The term "antisense" refers to the fact that such oligonucleotides are complementary to their intracellular targets, e.g., 205P1B5. See for example, Jack Cohen, *Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, 1989; and *Synthesis 1:1-5* (1988). The 205P1B5 antisense oligonucleotides of the present invention include derivatives such as S-oligonucleotides (phosphorothioate derivatives or S-oligos, see, Jack Cohen, *supra*), which exhibit enhanced cancer cell growth inhibitory action. S-oligos (nucleoside phosphorothioates) are isoelectronic analogs of an oligonucleotide (O-oligo) in which a nonbridging oxygen atom of the phosphate group is replaced by a sulfur atom. The S-oligos of the present invention can be prepared by treatment of the corresponding O-oligos with 3H-1,2-benzodithiol-3-one-1,1-dioxide, which is a sulfur transfer reagent. See Iyer, R. P. et al, *J. Org. Chem.* 55:4693-4698 (1990); and Iyer, R. P. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112:1253-1254 (1990). Additional 205P1B5 antisense oligonucleotides of the present invention include morpholino antisense oligonucleotides known in the art (see, e.g., Partridge et al., 1996, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 6: 169-175).

The 205P1B5 antisense oligonucleotides of the present invention typically can be RNA or DNA that is complementary to and stably hybridizes with the first 100 5' codons or last 100 3' codons of the 205P1B5 genomic sequence or the corresponding mRNA. Absolute complementarity is not required, although high degrees of complementarity are preferred. Use of an oligonucleotide complementary to this region allows for the selective hybridization to 205P1B5 mRNA and not to mRNA specifying other regulatory subunits of protein kinase. In one embodiment, 205P1B5 antisense oligonucleotides of the present invention are 15 to 30-mer fragments of the antisense DNA molecule that have a sequence that hybridizes to 205P1B5 mRNA. Optionally, 205P1B5 antisense oligonucleotide is a 30-mer oligonucleotide that is complementary to a region in the first 10 5' codons or last 10 3' codons of 205P1B5. Alternatively, the antisense molecules are modified to employ ribozymes in the inhibition of 205P1B5 expression, see, e.g., L. A. Couture & D. T. Stinchcomb; *Trends Genet* 12: 510-515 (1996).

II.A.3.) Primers and Primer Pairs

Further specific embodiments of this nucleotides of the invention include primers and primer pairs, which allow the specific amplification of polynucleotides of the invention or of any specific parts thereof, and probes that selectively or specifically hybridize to nucleic acid molecules of the invention or to any part thereof. Probes can be labeled with a detectable marker, such as, for example, a radioisotope, fluorescent compound, bioluminescent compound, a chemiluminescent compound, metal chelator or enzyme. Such probes and primers are used to detect the presence of a 205P1B5 polynucleotide in a sample and as a means for detecting a cell expressing a 205P1B5 protein.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Examples of such probes include polypeptides comprising all or part of the human 205P1B5 cDNA sequence shown in Figure 2. Examples of primer pairs capable of specifically amplifying 205P1B5 mRNAs are also described in the Examples. As will be understood by the skilled artisan, a great many different primers and probes can be prepared based on the sequences provided herein and used effectively to amplify and/or detect a 205P1B5 mRNA.

The 205P1B5 polynucleotides of the invention are useful for a variety of purposes, including but not limited to their use as probes and primers for the amplification and/or detection of the 205P1B5 gene(s), mRNA(s), or fragments thereof; as reagents for the diagnosis and/or prognosis of prostate cancer and other cancers; as coding sequences capable of directing the expression of 205P1B5 polypeptides; as tools for modulating or inhibiting the expression of the 205P1B5 gene(s) and/or translation of the 205P1B5 transcript(s); and as therapeutic agents.

The present invention includes the use of any probe as described herein to identify and isolate a 205P1B5 or 205P1B5 related nucleic acid sequence from a naturally occurring source, such as humans or other mammals, as well as the isolated nucleic acid sequence *per se*, which would comprise all or most of the sequences found in the probe used.

II.A.4.) Isolation of 205P1B5-Encoding Nucleic Acid Molecules

The 205P1B5 cDNA sequences described herein enable the isolation of other polynucleotides encoding 205P1B5 gene product(s), as well as the isolation of polynucleotides encoding 205P1B5 gene product homologs, alternatively spliced isoforms, allelic variants, and mutant forms of the 205P1B5 gene product as well as polynucleotides that encode analogs of 205P1B5-related proteins. Various molecular cloning methods that can be employed to isolate full length cDNAs encoding an 205P1B5 gene are well known (see, for example, Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel et al., Eds., Wiley and Sons, 1995). For example, lambda phage cloning methodologies can be conveniently employed, using commercially available cloning systems (e.g., Lambda ZAP Express, Stratagene). Phage clones containing 205P1B5 gene cDNAs can be identified by probing with a labeled 205P1B5 cDNA or a fragment thereof. For example, in one embodiment, the 205P1B5 cDNA (Figure 2) or a portion thereof can be synthesized and used as a probe to retrieve overlapping and full-length cDNAs corresponding to a 205P1B5 gene. The 205P1B5 gene itself can be isolated by screening genomic DNA libraries, bacterial artificial chromosome libraries (BACs), yeast artificial chromosome libraries (YACs), and the like, with 205P1B5 DNA probes or primers.

II.A.5.) Recombinant Nucleic Acid Molecules and Host-Vector Systems

The invention also provides recombinant DNA or RNA molecules containing an 205P1B5 polynucleotide, a fragment, analog or homologue thereof, including but not limited to phages, plasmids, phagemids, cosmids, YACs, BACs, as well as various viral and non-viral vectors well known in the art, and cells transformed or transfected with such recombinant DNA or RNA molecules. Methods for generating such molecules are well known (see, for example, Sambrook et al, 1989, *supra*).

The invention further provides a host-vector system comprising a recombinant DNA molecule containing a 205P1B5 polynucleotide, fragment, analog or homologue thereof within a suitable prokaryotic or eukaryotic host cell. Examples of suitable eukaryotic host cells include a yeast cell, a plant cell, or an animal cell, such as a mammalian cell or an insect cell (e.g., a baculovirus-infectible cell such as an SF9 or HighFive cell). Examples

WO 03/020954

PCT/US02/27760

of suitable mammalian cells include various prostate cancer cell lines such as DU145 and TsuPr1, other transfectable or transducible prostate cancer cell lines, primary cells (Pr#C), as well as a number of mammalian cells routinely used for the expression of recombinant proteins (e.g., COS, CHO, 293, 293T cells). More particularly, a polynucleotide comprising the coding sequence of 205P1B5 or a fragment, analog or homolog thereof can be used to generate 205P1B5 proteins or fragments thereof using any number of host-vector systems routinely used and widely known in the art.

A wide range of host-vector systems suitable for the expression of 205P1B5 proteins or fragments thereof are available, see for example, Sambrook et al., 1989, supra; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, supra). Preferred vectors for mammalian expression include but are not limited to pcDNA 3.1 myc-His-tag (Invitrogen) and the retroviral vector pSRotkneo (Muller et al., 1991, MCB 11:1785). Using these expression vectors, 205P1B5 can be expressed in several prostate cancer and non-prostate cell lines, including for example 293, 293T, rat-1, NIH 3T3 and TsuPr1. The host-vector systems of the invention are useful for the production of a 205P1B5 protein or fragment thereof. Such host-vector systems can be employed to study the functional properties of 205P1B5 and 205P1B5 mutations or analogs.

Recombinant human 205P1B5 protein or an analog or homolog or fragment thereof can be produced by mammalian cells transfected with a construct encoding a 205P1B5-related nucleotide. For example, 293T cells can be transfected with an expression plasmid encoding 205P1B5 or fragment, analog or homolog thereof, the 205P1B5 or related protein is expressed in the 293T cells, and the recombinant 205P1B5 protein is isolated using standard purification methods (e.g., affinity purification using anti-205P1B5 antibodies). In another embodiment, a 205P1B5 coding sequence is subcloned into the retroviral vector pSRoMSVtkneo and used to infect various mammalian cell lines, such as NIH 3T3, TsuPr1, 293 and rat-1 in order to establish 205P1B5 expressing cell lines. Various other expression systems well known in the art can also be employed. Expression constructs encoding a leader peptide joined in frame to the 205P1B5 coding sequence can be used for the generation of a secreted form of recombinant 205P1B5 protein.

As discussed herein, redundancy in the genetic code permits variation in 205P1B5 gene sequences. In particular, it is known in the art that specific host species often have specific codon preferences, and thus one can adapt the disclosed sequence as preferred for a desired host. For example, preferred analog codon sequences typically have rare codons (i.e., codons having a usage frequency of less than about 20% in known sequences of the desired host) replaced with higher frequency codons. Codon preferences for a specific species are calculated, for example, by utilizing codon usage tables available on the INTERNET such as at world wide web URL dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html.

Additional sequence modifications are known to enhance protein expression in a cellular host. These include elimination of sequences encoding spurious polyadenylation signals, exon/intron splice site signals, transposon-like repeats, and/or other such well-characterized sequences that are deleterious to gene expression. The GC content of the sequence is adjusted to levels average for a given cellular host, as calculated by reference to known genes expressed in the host cell. Where possible, the sequence is modified to avoid predicted hairpin secondary mRNA structures. Other useful modifications include the addition of a translational initiation consensus sequence at the start of the open reading frame, as described in Kozak, *Mol. Cell Biol.*, 9:5073-5080 (1989). Skilled artisans understand that the general rule that eukaryotic ribosomes initiate translation exclusively at the 5' proximal AUG codon is abrogated only under rare conditions (see, e.g., Kozak PNAS 92(7): 2662-2666, (1995) and Kozak NAR 15(20): 8125-8148 (1987)).

WO 03/020954

PCT/US02/27760

III) 205P1B5-related Proteins

Another aspect of the present invention provides 205P1B5-related proteins. Specific embodiments of 205P1B5 proteins comprise a polypeptide having all or part of the amino acid sequence of human 205P1B5 as shown in Figure 2 or Figure 3. Alternatively, embodiments of 205P1B5 proteins comprise variant, homolog or analog polypeptides that have alterations in the amino acid sequence of 205P1B5 shown in Figure 2 or Figure 3.

In general, naturally occurring allelic variants of human 205P1B5 share a high degree of structural identity and homology (e.g., 90% or more homology). Typically, allelic variants of the 205P1B5 protein contain conservative amino acid substitutions within the 205P1B5 sequences described herein or contain a substitution of an amino acid from a corresponding position in a homologue of 205P1B5. One class of 205P1B5 allelic variants are proteins that share a high degree of homology with at least a small region of a particular 205P1B5 amino acid sequence, but further contain a radical departure from the sequence, such as a non-conservative substitution, truncation, insertion or frame shift. In comparisons of protein sequences, the terms, similarity, identity, and homology each have a distinct meaning as appreciated in the field of genetics. Moreover, orthology and paralogy can be important concepts describing the relationship of members of a given protein family in one organism to the members of the same family in other organisms.

Amino acid abbreviations are provided in Table II. Conservative amino acid substitutions can frequently be made in a protein without altering either the conformation or the function of the protein. Proteins of the invention can comprise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 conservative substitutions. Such changes include substituting any of isoleucine (I), valine (V), and leucine (L) for any other of these hydrophobic amino acids; aspartic acid (D) for glutamic acid (E) and vice versa; glutamine (Q) for asparagine (N) and vice versa; and serine (S) for threonine (T) and vice versa. Other substitutions can also be considered conservative, depending on the environment of the particular amino acid and its role in the three-dimensional structure of the protein. For example, glycine (G) and alanine (A) can frequently be interchangeable, as can alanine (A) and valine (V). Methionine (M), which is relatively hydrophobic, can frequently be interchanged with leucine and isoleucine, and sometimes with valine. Lysine (K) and arginine (R) are frequently interchangeable in locations in which the significant feature of the amino acid residue is its charge and the differing pK's of these two amino acid residues are not significant. Still other changes can be considered "conservative" in particular environments (see, e.g. Table III herein; pages 13-15 "Biochemistry" 2nd ED. Lubert Stryer ed (Stanford University); Henikoff et al., PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei et al., J Biol Chem 1995 May 19; 270(20):11882-6).

Embodiments of the invention disclosed herein include a wide variety of art-accepted variants or analogs of 205P1B5 proteins such as polypeptides having amino acid insertions, deletions and substitutions. 205P1B5 variants can be made using methods known in the art such as site-directed mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis (Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)), cassette mutagenesis (Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985)), restriction selection mutagenesis (Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)) or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the 205P1B5 variant DNA.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence that is involved in a specific biological activity such as a protein-protein interaction. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group

WO 03/020954

PCT/US02/27760

because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions (Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)). If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isosteric amino acid can be used.

As defined herein, 205P1B5 variants, analogs or homologs, have the distinguishing attribute of having at least one epitope that is "cross reactive" with a 205P1B5 protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 703. As used in this sentence, "cross reactive" means that an antibody or T cell that specifically binds to an 205P1B5 variant also specifically binds to the 205P1B5 protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 703. A polypeptide ceases to be a variant of the protein shown in SEQ ID NO: 703 when it no longer contains any epitope capable of being recognized by an antibody or T cell that specifically binds to the 205P1B5 protein. Those skilled in the art understand that antibodies that recognize proteins bind to epitopes of varying size, and a grouping of the order of about four or five amino acids, contiguous or not, is regarded as a typical number of amino acids in a minimal epitope. See, e.g., Nair et al., *J. Immunol* 2000 165(12): 6949-6955; Hebbes et al., *Mol Immunol* (1989) 26(9):865-73; Schwartz et al., *J Immunol* (1985) 135(4):2598-608.

Another class of 205P1B5-related protein variants share 70%, 75%, 80%, 85% or 90% or more similarity with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 703 or a fragment thereof. Another specific class of 205P1B5 protein variants or analogs comprise one or more of the 205P1B5 biological motifs described herein or presently known in the art. Thus, encompassed by the present invention are analogs of 205P1B5 fragments (nucleic or amino acid) that have altered functional (e.g. immunogenic) properties relative to the starting fragment. It is to be appreciated that motifs now or which become part of the art are to be applied to the nucleic or amino acid sequences of Figure 2 or Figure 3.

As discussed herein, embodiments of the claimed invention include polypeptides containing less than the full amino acid sequence of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3. For example, representative embodiments of the invention comprise peptides/proteins having any 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 or more contiguous amino acids of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3.

Moreover, representative embodiments of the invention disclosed herein include polypeptides consisting of about amino acid 1 to about amino acid 10 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 10 to about amino acid 20 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 20 to about amino acid 30 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 30 to about amino acid 40 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 40 to about amino acid 50 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 50 to about amino acid 60 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 60 to about amino acid 70 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 70 to about amino acid 80 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 80 to about amino acid 90 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, polypeptides consisting of about amino acid 90 to about amino acid 100 of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3, etc. throughout the entirety of the 205P1B5 amino acid sequence. Moreover, polypeptides consisting of about amino acid 1 (or 20 or 30 or 40 etc.) to about amino acid 20, (or 130, or 140 or 150 etc.) of the 205P1B5 protein shown in Figure 2 or Figure 3 are embodiments of the invention. It is to be

WO 03/020954

PCT/US02/27760

appreciated that the starting and stopping positions in this paragraph refer to the specified position as well as that position plus or minus 5 residues.

205P1B5-related proteins are generated using standard peptide synthesis technology or using chemical cleavage methods well known in the art. Alternatively, recombinant methods can be used to generate nucleic acid molecules that encode a 205P1B5-related protein. In one embodiment, nucleic acid molecules provide a means to generate defined fragments of the 205P1B5 protein (or variants, homologs or analogs thereof).

III.A.) Motif-bearing Protein Embodiments

Additional illustrative embodiments of the invention disclosed herein include 205P1B5 polypeptides comprising the amino acid residues of one or more of the biological motifs contained within the 205P1B5 polypeptide sequence set forth in Figure 2 or Figure 3. Various motifs are known in the art, and a protein can be evaluated for the presence of such motifs by a number of publicly available Internet sites (see, e.g., URL addresses: pfam.wustl.edu/; searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html psort.jms.u-tokyo.ac.jp/; world wide web URL cbs.dtu.dk/; world wide web URL ebi.ac.uk/interpro/scan.html; world wide web URL expasy.ch/tools/scnpsit1.html; Epimatrix™ and Epimer™, Brown University, world wide web URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; and BIMAS, bimas.dcrtnih.gov/).

Motif bearing subsequences of the 205P1B5 protein are set forth and identified in Table XIX.

Table XX sets forth several frequently occurring motifs based on pfam searches (see URL address pfam.wustl.edu/). The columns of Table XX list (1) motif name abbreviation, (2) percent identity found amongst the different member of the motif family, (3) motif name or description and (4) most common function; location information is included if the motif is relevant for location.

Polypeptides comprising one or more of the 205P1B5 motifs discussed above are useful in elucidating the specific characteristics of a malignant phenotype in view of the observation that the 205P1B5 motifs discussed above are associated with growth dysregulation and because 205P1B5 is overexpressed in certain cancers (See, e.g., Table I). Casein kinase II, cAMP and camp-dependent protein kinase, and Protein Kinase C, for example, are enzymes known to be associated with the development of the malignant phenotype (see e.g. Chen et al., Lab Invest., 78(2): 165-174 (1998); Gaiddon et al., Endocrinology 136(10): 4331-4338 (1995); Hall et al., Nucleic Acids Research 24(6): 1119-1126 (1996); Peterziel et al., Oncogene 18(46): 6322-6329 (1999) and O'Brian, Oncol. Rep. 5(2): 305-309 (1998)). Moreover, both glycosylation and myristoylation are protein modifications also associated with cancer and cancer progression (see e.g. Dennis et al., Biochem. Biophys. Acta 1473(1):21-34 (1999); Raju et al., Exp. Cell Res. 235(1): 145-154 (1997)). Amidation is another protein modification also associated with cancer and cancer progression (see e.g. Treston et al., J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (13): 169-175 (1992)).

In another embodiment, proteins of the invention comprise one or more of the immunoreactive epitopes identified in accordance with art-accepted methods, such as the peptides set forth in Tables V-XVIII. CTL epitopes can be determined using specific algorithms to identify peptides within an 205P1B5 protein that are capable of optimally binding to specified HLA alleles (e.g., Table IV; Epimatrix™ and Epimer™, Brown University, URL world wide web URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; and BIMAS, URL bimas.dcrtnih.gov/) Moreover, processes for identifying peptides that have sufficient binding affinity for HLA molecules and which are correlated with being immunogenic epitopes, are well known in the art, and are carried out without undue experimentation. In addition, processes for identifying peptides that are immunogenic epitopes, are well known in the art, and are carried out without undue experimentation either *in vitro* or *in vivo*.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Also known in the art are principles for creating analogs of such epitopes in order to modulate immunogenicity. For example, one begins with an epitope that bears a CTL or HTL motif (see, e.g., the HLA Class I and HLA Class II motifs/supermotifs of Table IV). The epitope is analogized by substituting out an amino acid at one of the specified positions, and replacing it with another amino acid specified for that position. For example, one can substitute out a deleterious residue in favor of any other residue, such as a preferred residue as defined in Table IV; substitute a less-preferred residue with a preferred residue as defined in Table IV; or substitute an originally-occurring preferred residue with another preferred residue as defined in Table IV. Substitutions can occur at primary anchor positions or at other positions in a peptide; see, e.g., Table IV.

A variety of references reflect the art regarding the identification and generation of epitopes in a protein of interest as well as analogs thereof. See, for example, WO 9733602 to Chesnut et al.; Sette, Immunogenetics 1999 50(3-4): 201-212; Sette et al., J. Immunol. 2001 166(2): 1389-1397; Sidney et al., Hum. Immunol. 1997 58(1): 12-20; Kondo et al., Immunogenetics 1997 45(4): 249-258; Sidney et al., J. Immunol. 1996 157(8): 3480-90; and Falk et al., Nature 351: 290-6 (1991); Hunt et al., Science 255:1261-3 (1992); Parker et al., J. Immunol. 149:3580-7 (1992); Parker et al., J. Immunol. 152:163-75 (1994); Kast et al., 1994 152(8): 3904-12; Borras-Cuesta et al., Hum. Immunol. 2000 61(3): 266-278; Alexander et al., J. Immunol. 2000 164(3): 164(3): 1625-1633; Alexander et al., PMID: 7895164, UI: 95202582; O'Sullivan et al., J. Immunol. 1991 147(8): 2663-2669; Alexander et al., Immunity 1994 1(9): 751-761 and Alexander et al., Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92.

Related embodiments of the inventions include polypeptides comprising combinations of the different motifs set forth in Table XIX, and/or, one or more of the predicted CTL epitopes of Table V through Table XVIII, and/or, one or more of the T cell binding motifs known in the art. Preferred embodiments contain no insertions, deletions or substitutions either within the motifs or the intervening sequences of the polypeptides. In addition, embodiments which include a number of either N-terminal and/or C-terminal amino acid residues on either side of these motifs may be desirable (to, for example, include a greater portion of the polypeptide architecture in which the motif is located). Typically the number of N-terminal and/or C-terminal amino acid residues on either side of a motif is between about 1 to about 100 amino acid residues, preferably 5 to about 50 amino acid residues.

20SP1B5-related proteins are embodied in many forms, preferably in isolated form. A purified 20SP1B5 protein molecule will be substantially free of other proteins or molecules that impair the binding of 20SP1B5 to antibody, T cell or other ligand. The nature and degree of isolation and purification will depend on the intended use. Embodiments of a 20SP1B5-related proteins include purified 20SP1B5-related proteins and functional, soluble 20SP1B5-related proteins. In one embodiment, a functional, soluble 20SP1B5 protein or fragment thereof retains the ability to be bound by antibody, T cell or other ligand.

The invention also provides 20SP1B5 proteins comprising biologically active fragments of the 20SP1B5 amino acid sequence shown in Figure 2 or Figure 3. Such proteins exhibit properties of the 20SP1B5 protein, such as the ability to elicit the generation of antibodies that specifically bind an epitope associated with the 20SP1B5 protein; to be bound by such antibodies; to elicit the activation of HTL or CTL; and/or, to be recognized by HTL or CTL.

20SP1B5-related polypeptides that contain particularly interesting structures can be predicted and/or identified using various analytical techniques well known in the art, including, for example, the methods of Chou-Pasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz or Jameson-Wolf analysis, or on the basis of

WO 03/020954

PCT/US02/27760

immunogenicity. Fragments that contain such structures are particularly useful in generating subunit-specific anti-205P1B5 antibodies, or T cells or in identifying cellular factors that bind to 205P1B5.

CTL epitopes can be determined using specific algorithms to identify peptides within an 205P1B5 protein that are capable of optimally binding to specified HLA alleles (e.g., by using the SYFPEITHI site at World Wide Web URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/; the listings in Table IV(A)-(E); Epimatrix™ and Epimer™, Brown University, URL (world wide web URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); and BIMAS, URL bimas.dcrtnih.gov/). Illustrating this, peptide epitopes from 205P1B5 that are presented in the context of human MHC class I molecules HLA-A1, A2, A3, A11, A24, B7 and B35 were predicted (Tables V-XVIII). Specifically, the complete amino acid sequence of the 205P1B5 protein was entered into the HLA Peptide Motif Search algorithm found in the Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) web site listed above. The HLA peptide motif search algorithm was developed by Dr. Ken Parker based on binding of specific peptide sequences in the groove of HLA Class I molecules, in particular HLA-A2 (see, e.g., Falk et al., Nature 351: 290-6 (1991); Hunt et al., Science 255:1261-3 (1992); Parker et al., J. Immunol. 149:3580-7 (1992); Parker et al., J. Immunol. 152:163-75 (1994)). This algorithm allows location and ranking of 8-mer, 9-mer, and 10-mer peptides from a complete protein sequence for predicted binding to HLA-A2 as well as numerous other HLA Class I molecules. Many HLA class I binding peptides are 8-, 9-, 10 or 11-mers. For example, for class I HLA-A2, the epitopes preferably contain a leucine (L) or methionine (M) at position 2 and a valine (V) or leucine (L) at the C-terminus (see, e.g., Parker et al., J. Immunol. 149:3580-7 (1992)). Selected results of 205P1B5 predicted binding peptides are shown in Tables V-XVIII herein. In Tables V-XVIII, the top 50 ranking candidates, 9-mers and 10-mers, for each family member are shown along with their location, the amino acid sequence of each specific peptide, and an estimated binding score. The binding score corresponds to the estimated half time of dissociation of complexes containing the peptide at 37°C at pH 6.5. Peptides with the highest binding score are predicted to be the most tightly bound to HLA Class I on the cell surface for the greatest period of time and thus represent the best immunogenic targets for T-cell recognition.

Actual binding of peptides to an HLA allele can be evaluated by stabilization of HLA expression on the antigen-processing defective cell line T2 (see, e.g., Xue et al., Prostate 30:73-8 (1997) and Peshwa et al., Prostate 36:129-38 (1998)). Immunogenicity of specific peptides can be evaluated *in vitro* by stimulation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTL) in the presence of antigen presenting cells such as dendritic cells.

It is to be appreciated that every epitope predicted by the BIMAS site, Epimer™ and Epimatrix™ sites, or specified by the HLA class I or class II motifs available in the art or which become part of the art such as set forth in Table IV (or determined using World Wide Web site URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/) are to be "applied" to the 205P1B5 protein. As used in this context "applied" means that the 205P1B5 protein is evaluated, e.g., visually or by computer-based patterns finding methods, as appreciated by those of skill in the relevant art. Every subsequence of the 205P1B5 of 8, 9, 10, or 11 amino acid residues that bears an HLA Class I motif, or a subsequence of 9 or more amino acid residues that bear an HLA Class II motif are within the scope of the invention.

III.B.) Expression of 205P1B5-related Proteins

In an embodiment described in the examples that follow, 205P1B5 can be conveniently expressed in cells (such as 293T cells) transfected with a commercially available expression vector such as a CMV-driven expression vector encoding 205P1B5 with a C-terminal 6XHis and MYC tag (pcDNA3.1/mycHis, Invitrogen or Tag5, GenHunter Corporation, Nashville TN). The Tag5 vector provides an IgGK secretion signal that can be

WO 03/020954

PCT/US02/27760

used to facilitate the production of a secreted 205P1B5 protein in transfected cells. The secreted HIS-tagged 205P1B5 in the culture media can be purified, e.g., using a nickel column using standard techniques.

III.C.) Modifications of 205P1B5-related Proteins

Modifications of 205P1B5-related proteins such as covalent modifications are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of a 205P1B5 polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C- terminal residues of the 205P1B5. Another type of covalent modification of the 205P1B5 polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of a protein of the invention. Another type of covalent modification of 205P1B5 comprises linking the 205P1B5 polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

The 205P1B5-related proteins of the present invention can also be modified to form a chimeric molecule comprising 205P1B5 fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence. Such a chimeric molecule can be synthesized chemically or recombinantly. A chimeric molecule can have a protein of the invention fused to another tumor-associated antigen or fragment thereof. Alternatively, a protein in accordance with the invention can comprise a fusion of fragments of the 205P1B5 sequence (amino or nucleic acid) such that a molecule is created that is not, through its length, directly homologous to the amino or nucleic acid sequences shown in Figure 2 or Figure 3. Such a chimeric molecule can comprise multiples of the same subsequence of 205P1B5. A chimeric molecule can comprise a fusion of a 205P1B5-related protein with a polyhistidine epitope tag, which provides an epitope to which immobilized nickel can selectively bind, with cytokines or with growth factors. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl- terminus of the 205P1B5. In an alternative embodiment, the chimeric molecule can comprise a fusion of a 205P1B5-related protein with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also referred to as an "immunoadhesin"), such a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule. The Ig fusions preferably include the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of a 205P1B5 polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3 regions of an IgG molecule. For the production of immunoglobulin fusions see, e.g., U.S. Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

III.D.) Uses of 205P1B5-related Proteins

The proteins of the invention have a number of different specific uses. As 205P1B5 is highly expressed in prostate and other cancers, 205P1B5-related proteins are used in methods that assess the status of 205P1B5 gene products in normal versus cancerous tissues, thereby elucidating the malignant phenotype. Typically, polypeptides from specific regions of the 205P1B5 protein are used to assess the presence of perturbations (such as deletions, insertions, point mutations etc.) in those regions (such as regions containing one or more motifs). Exemplary assays utilize antibodies or T cells targeting 205P1B5-related proteins comprising the amino acid residues of one or more of the biological motifs contained within the 205P1B5 polypeptide sequence in order to evaluate the characteristics of this region in normal versus cancerous tissues or to elicit an immune response to the epitope. Alternatively, 205P1B5-related proteins that contain the amino acid residues of one or more of the biological motifs in the 205P1B5 protein are used to screen for factors that interact with that region of 205P1B5.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

205P1B5 protein fragments/subsequences are particularly useful in generating and characterizing domain-specific antibodies (e.g., antibodies recognizing an extracellular or intracellular epitope of an 205P1B5 protein), for identifying agents or cellular factors that bind to 205P1B5 or a particular structural domain thereof, and in various therapeutic and diagnostic contexts, including but not limited to diagnostic assays, cancer vaccines and methods of preparing such vaccines.

Proteins encoded by the 205P1B5 genes, or by analogs, homologs or fragments thereof, have a variety of uses, including but not limited to generating antibodies and in methods for identifying ligands and other agents and cellular constituents that bind to an 205P1B5 gene product. Antibodies raised against an 205P1B5 protein or fragment thereof are useful in diagnostic and prognostic assays, and imaging methodologies in the management of human cancers characterized by expression of 205P1B5 protein, such as those listed in Table I. Such antibodies can be expressed intracellularly and used in methods of treating patients with such cancers. 205P1B5-related nucleic acids or proteins are also used in generating HTL or CTL responses.

Various immunological assays useful for the detection of 205P1B5 proteins are used, including but not limited to various types of radioimmunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), enzyme-linked immunofluorescent assays (ELIFA), immunocytochemical methods, and the like. Antibodies can be labeled and used as immunological imaging reagents capable of detecting 205P1B5-expressing cells (e.g., in radioscinigraphic imaging methods). 205P1B5 proteins are also particularly useful in generating cancer vaccines, as further described herein.

IV.) 205P1B5 Antibodies

Another aspect of the invention provides antibodies that bind to 205P1B5-related proteins. Preferred antibodies specifically bind to a 205P1B5-related protein and do not bind (or bind weakly) to peptides or proteins that are not 205P1B5-related proteins. For example, antibodies bind 205P1B5 can bind 205P1B5-related proteins such as the homologs or analogs thereof.

205P1B5 antibodies of the invention are particularly useful in prostate cancer diagnostic and prognostic assays, and imaging methodologies. Similarly, such antibodies are useful in the treatment, diagnosis, and/or prognosis of other cancers, to the extent 205P1B5 is also expressed or overexpressed in these other cancers. Moreover, intracellularly expressed antibodies (e.g., single chain antibodies) are therapeutically useful in treating cancers in which the expression of 205P1B5 is involved, such as advanced or metastatic prostate cancers.

The invention also provides various immunological assays useful for the detection and quantification of 205P1B5 and mutant 205P1B5-related proteins. Such assays can comprise one or more 205P1B5 antibodies capable of recognizing and binding a 205P1B5-related protein, as appropriate. These assays are performed within various immunological assay formats well known in the art, including but not limited to various types of radioimmunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), enzyme-linked immunofluorescent assays (ELIFA), and the like.

Immunological non-antibody assays of the invention also comprise T cell immunogenicity assays (inhibitory or stimulatory) as well as major histocompatibility complex (MHC) binding assays.

In addition, immunological imaging methods capable of detecting prostate cancer and other cancers expressing 205P1B5 are also provided by the invention, including but not limited to radioscinigraphic imaging methods using labeled 205P1B5 antibodies. Such assays are clinically useful in the detection, monitoring, and prognosis of 205P1B5 expressing cancers such as prostate cancer.

205P1B5 antibodies are also used in methods for purifying a 205P1B5-related protein and for isolating 205P1B5 homologues and related molecules. For example, a method of purifying a 205P1B5-related protein

WO 03/020954

PCT/US02/27760

comprises incubating an 205P1B5 antibody, which has been coupled to a solid matrix, with a lysate or other solution containing a 205P1B5-related protein under conditions that permit the 205P1B5 antibody to bind to the 205P1B5-related protein; washing the solid matrix to eliminate impurities; and eluting the 205P1B5-related protein from the coupled antibody. Other uses of the 205P1B5 antibodies of the invention include generating anti-idiotypic

5 antibodies that mimic the 205P1B5 protein.

Various methods for the preparation of antibodies are well known in the art. For example, antibodies can be prepared by immunizing a suitable mammalian host using a 205P1B5-related protein, peptide, or fragment, in isolated or immunoconjugated form (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). In addition, fusion proteins of 205P1B5 can also be used, such as a 205P1B5 GST-fusion protein. In a particular embodiment, a GST fusion protein comprising all or

10 most of the amino acid sequence of Figure 2 or Figure 3 is produced, then used as an immunogen to generate appropriate antibodies. In another embodiment, a 205P1B5-related protein is synthesized and used as an immunogen.

In addition, naked DNA immunization techniques known in the art are used (with or without purified

15 205P1B5-related protein or 205P1B5 expressing cells) to generate an immune response to the encoded immunogen (for review, see Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

The amino acid sequence of 205P1B5 as shown in Figure 2 or Figure 3 can be analyzed to select specific regions of the 205P1B5 protein for generating antibodies. For example, hydrophobicity and hydrophilicity analyses of the 205P1B5 amino acid sequence are used to identify hydrophilic regions in the 205P1B5 structure. Regions of

20 the 205P1B5 protein that show immunogenic structure, as well as other regions and domains, can readily be identified using various other methods known in the art, such as Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz or Jameson-Wolf analysis. Thus, each region identified by any of these programs or methods is within the scope of the present invention. Methods for the generation of 205P1B5 antibodies are further illustrated by way of the examples provided herein. Methods for preparing a protein or polypeptide for use as an

25 immunogen are well known in the art. Also well known in the art are methods for preparing immunogenic conjugates of a protein with a carrier, such as BSA, KLH or other carrier protein. In some circumstances, direct conjugation using, for example, carbodiimide reagents are used; in other instances linking reagents such as those supplied by Pierce Chemical Co., Rockford, IL, are effective. Administration of a 205P1B5 immunogen is often conducted by injection over a suitable time period and with use of a suitable adjuvant, as is understood in the art.

30 During the immunization schedule, titers of antibodies can be taken to determine adequacy of antibody formation.

205P1B5 monoclonal antibodies can be produced by various means well known in the art. For example, immortalized cell lines that secrete a desired monoclonal antibody are prepared using the standard hybridoma technology of Kohler and Milstein or modifications that immortalize antibody-producing B cells, as is generally known. Immortalized cell lines that secrete the desired antibodies are screened by immunoassay in which the antigen

35 is a 205P1B5-related protein. When the appropriate immortalized cell culture is identified, the cells can be expanded and antibodies produced either from *in vitro* cultures or from ascites fluid.

The antibodies or fragments of the invention can also be produced, by recombinant means. Regions that bind specifically to the desired regions of the 205P1B5 protein can also be produced in the context of chimeric or complementarity determining region (CDR) grafted antibodies of multiple species origin. Humanized or human

40 205P1B5 antibodies can also be produced, and are preferred for use in therapeutic contexts. Methods for humanizing murine and other non-human antibodies, by substituting one or more of the non-human antibody CDRs for

WO 03/020954

PCT/US02/27760

corresponding human antibody sequences, are well known (see for example, Jones et al., 1986, *Nature* 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332: 323-327; Verhoeven et al., 1988, *Science* 239: 1534-1536). See also, Carter et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285 and Sims et al., 1993, *J. Immunol.* 151: 2296.

Methods for producing fully human monoclonal antibodies include phage display and transgenic methods (for review, see Vaughan et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16: 535-539). Fully human 205P1B5 monoclonal antibodies can be generated using cloning technologies employing large human Ig gene combinatorial libraries (i.e., phage display) (Griffiths and Hoogenboom, *Building an *in vitro* immune system: human antibodies from phage display libraries*. In: *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications* in Man, Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, pp 45-64 (1993); Burton and Barbas, *Human Antibodies from combinatorial libraries*. *Id.*, pp 65-82). Fully human 205P1B5 monoclonal antibodies can also be produced using transgenic mice engineered to contain human immunoglobulin gene loci as described in PCT Patent Application WO98/24893, Kuchelapati and Jakobovits et al., published December 3, 1997 (see also, Jakobovits, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4): 607-614; U.S. patents 6,162,963 issued 19 December 2000; 6,150,584 issued 12 November 2000; and, 6,114,598 issued 5 September 2000). This method avoids the *in vitro* manipulation required with phage display technology and efficiently produces high affinity authentic human antibodies.

Reactivity of 205P1B5 antibodies with an 205P1B5-related protein can be established by a number of well known means, including Western blot, immunoprecipitation, ELISA, and FACS analyses using, as appropriate, 205P1B5-related proteins, 205P1B5-expressing cells or extracts thereof. A 205P1B5 antibody or fragment thereof can be labeled with a detectable marker or conjugated to a second molecule. Suitable detectable markers include, but are not limited to, a radioisotope, a fluorescent compound, a bioluminescent compound, chemiluminescent compound, a metal chelator or an enzyme. Further, bi-specific antibodies specific for two or more 205P1B5 epitopes are generated using methods generally known in the art. Homodimeric antibodies can also be generated by cross-linking techniques known in the art (e.g., Wolff et al., *Cancer Res.* 53: 2560-2565).

V.) 205P1B5 Cellular Immune Responses

The mechanism by which T cells recognize antigens has been delineated. Efficacious peptide epitope vaccine compositions of the invention induce a therapeutic or prophylactic immune responses in very broad segments of the world-wide population. For an understanding of the value and efficacy of compositions of the invention that induce cellular immune responses, a brief review of immunology-related technology is provided.

A complex of an HLA molecule and a peptidic antigen acts as the ligand recognized by HLA-restricted T cells (Buus, S. et al., *Cell* 47:1071, 1986; Babbitt, B. P. et al., *Nature* 317:359, 1985; Townsend, A. and Bodmer, H., *Annu. Rev. Immunol.* 7:601, 1989; Germain, R. N., *Annu. Rev. Immunol.* 11:403, 1993). Through the study of single amino acid substituted antigen analogs and the sequencing of endogenously bound, naturally processed peptides, critical residues that correspond to motifs required for specific binding to HLA antigen molecules have been identified and are set forth in Table IV (see also, e.g., Southwood, et al., *J. Immunol.* 160:3363, 1998; Rammensee, et al., *Immunogenetics* 41:178, 1995; Rammensee et al., SYFPEITHI, access via World Wide Web at URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/; Sette, A. and Sidney, J. *Curr. Opin. Immunol.* 10:478, 1998; Engelhard, V. H., *Curr. Opin. Immunol.* 6:13, 1994; Sette, A. and Grey, H. M., *Curr. Opin. Immunol.* 4:79, 1992; Sinigaglia, F. and Hammer, J. *Curr. Biol.* 6:52, 1994; Ruppert et al., *Cell* 74:929-937, 1993; Kondo

WO 03/020954

PCT/US02/27760

et al., *J. Immunol.* 155:4307-4312, 1995; Sidney *et al.*, *J. Immunol.* 157:3480-3490, 1996; Sidney *et al.*, *Human Immunol.* 45:79-93, 1996; Sette, A. and Sidney, J. *Immunogenetics* 1999 Nov; 50(3-4):201-12, Review).

Furthermore, x-ray crystallographic analyses of HLA-peptide complexes have revealed pockets within the peptide binding cleft/groove of HLA molecules which accommodate, in an allele-specific mode, residues borne by peptide ligands; these residues in turn determine the HLA binding capacity of the peptides in which they are present. (See, e.g., Madden, D.R. *Annu. Rev. Immunol.* 13:587, 1995; Smith, *et al.*, *Immunity* 4:203, 1996; Fremont *et al.*, *Immunity* 8:305, 1998; Stern *et al.*, *Structure* 2:245, 1994; Jones, E.Y. *Curr. Opin. Immunol.* 9:75, 1997; Brown, J. H. *et al.*, *Nature* 364:33, 1993; Guo, H. C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8053, 1993; Guo, H. C. *et al.*, *Nature* 360:364, 1992; Silver, M. L. *et al.*, *Nature* 360:367, 1992; Matsumura, M. *et al.*, *Science* 257:927, 1992; Madden *et al.*, *Cell* 70:1035, 1992; Fremont, D. H. *et al.*, *Science* 257:919, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. and Wiley, D. C., *J. Mol. Biol.* 219:277, 1991.)

Accordingly, the definition of class I and class II allele-specific HLA binding motifs, or class I or class II supermotifs allows identification of regions within a protein that are correlated with binding to particular HLA antigen(s).

Thus, by a process of HLA motif identification, candidates for epitope-based vaccines have been identified; such candidates can be further evaluated by HLA-peptide binding assays to determine binding affinity and/or the time period of association of the epitope and its corresponding HLA molecule. Additional confirmatory work can be performed to select, amongst these vaccine candidates, epitopes with preferred characteristics in terms of population coverage, and/or immunogenicity.

Various strategies can be utilized to evaluate cellular immunogenicity, including:

1) Evaluation of primary T cell cultures from normal individuals (see, e.g., Wentworth, P. A. *et al.*, *Mol. Immunol.* 32:603, 1995; Celis, E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2105, 1994; Tsai, V. *et al.*, *J. Immunol.* 158:1796, 1997; Kawashima, I. *et al.*, *Human Immunol.* 59:1, 1998). This procedure involves the stimulation of peripheral blood lymphocytes (PBL) from normal subjects with a test peptide in the presence of antigen presenting cells *in vitro* over a period of several weeks. T cells specific for the peptide become activated during this time and are detected using, e.g., a lymphokine- or ⁵¹Cr-release assay involving peptide sensitized target cells.

2) Immunization of HLA transgenic mice (see, e.g., Wentworth, P. A. *et al.*, *J. Immunol.* 26:97, 1996; Wentworth, P. A. *et al.*, *Int. Immunol.* 8:651, 1996; Alexander, I. *et al.*, *J. Immunol.* 159:4753, 1997). For example, in such methods peptides in incomplete Freund's adjuvant are administered subcutaneously to HLA transgenic mice. Several weeks following immunization, splenocytes are removed and cultured *in vitro* in the presence of test peptide for approximately one week. Peptide-specific T cells are detected using, e.g., a ⁵¹Cr-release assay involving peptide sensitized target cells and target cells expressing endogenously generated antigen.

3) Demonstration of recall T cell responses from immune individuals who have been either effectively vaccinated and/or from chronically ill patients (see, e.g., Rehmann, B. *et al.*, *J. Exp. Med.* 181:1047, 1995; Doolan, D. L. *et al.*, *Immunity* 7:97, 1997; Bertoni, R. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100:503, 1997; Threlkeld, S. C. *et al.*, *J. Immunol.* 159:1648, 1997; Diepolder, H. M. *et al.*, *J. Virol.* 71:6011, 1997). Accordingly, recall responses are detected by culturing PBL from subjects that have been exposed to the antigen due to disease and thus have generated an immune response "naturally", or from patients who were vaccinated against the antigen. PBL from subjects are cultured *in vitro* for 1-2 weeks in the presence of test peptide plus antigen presenting cells (APC) to

WO 03/020954

PCT/US02/27760

allow activation of "memory" T cells, as compared to "naive" T cells. At the end of the culture period, T cell activity is detected using assays including ^5Cr release involving peptide-sensitized targets, T cell proliferation, or lymphokine release.

5 **VI.) 205P1B5 Transgenic Animals**

Nucleic acids that encode a 205P1B5-related protein can also be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which, in turn, are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents. In accordance with established techniques, cDNA encoding 205P1B5 can be used to clone genomic DNA that encodes 205P1B5. The cloned genomic sequences can then be used to generate transgenic animals containing cells that express DNA that encode 205P1B5. Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice or rats, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 issued 12 April 1988, and 4,870,009 issued 26 September 1989. Typically, particular cells would be targeted for 205P1B5 transgene incorporation with tissue-specific enhancers.

Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding 205P1B5 can be used to examine the effect of increased expression of DNA that encodes 205P1B5. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from, for example, pathological conditions associated with its overexpression. In accordance with this aspect of the invention, an animal is treated with a reagent and a reduced incidence of a pathological condition, compared to untreated animals that bear the transgene, would indicate a potential therapeutic intervention for the pathological condition.

Alternatively, non-human homologues of 205P1B5 can be used to construct a 205P1B5 "knock out" animal that has a defective or altered gene encoding 205P1B5 as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding 205P1B5 and altered genomic DNA encoding 205P1B5 introduced into an embryonic cell of the animal. For example, cDNA that encodes 205P1B5 can be used to clone genomic DNA encoding 205P1B5 in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding 205P1B5 can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker that can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector (see, e.g., Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors). The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected (see, e.g., Li et al., *Cell*, 69:915 (1992)). The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras (see, e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152). A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal, and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knock out animals can be characterized, for example, for their ability to defend against certain pathological conditions or for their development of pathological conditions due to absence of the 205P1B5 polypeptide.

40 **VII.) Methods for the Detection of 205P1B5**

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Another aspect of the present invention relates to methods for detecting 205P1B5 polynucleotides and 205P1B5-related proteins, as well as methods for identifying a cell that expresses 205P1B5. The expression profile of 205P1B5 makes it a diagnostic marker for metastasized disease. Accordingly, the status of 205P1B5 gene products provides information useful for predicting a variety of factors including susceptibility to advanced stage disease, rate of progression, and/or tumor aggressiveness. As discussed in detail herein, the status of 205P1B5 gene products in patient samples can be analyzed by a variety of protocols that are well known in the art including immunohistochemical analysis, the variety of Northern blotting techniques including *in situ* hybridization, RT-PCR analysis (for example on laser capture micro-dissected samples), Western blot analysis and tissue array analysis.

More particularly, the invention provides assays for the detection of 205P1B5 polynucleotides in a biological sample, such as serum, bone, prostate, and other tissues, urine, semen, cell preparations, and the like. Detectable 205P1B5 polynucleotides include, for example, a 205P1B5 gene or fragment thereof, 205P1B5 mRNA, alternative splice variant 205P1B5 mRNAs, and recombinant DNA or RNA molecules that contain a 205P1B5 polynucleotide. A number of methods for amplifying and/or detecting the presence of 205P1B5 polynucleotides are well known in the art and can be employed in the practice of this aspect of the invention.

In one embodiment, a method for detecting an 205P1B5 mRNA in a biological sample comprises producing cDNA from the sample by reverse transcription using at least one primer; amplifying the cDNA so produced using an 205P1B5 polynucleotides as sense and antisense primers to amplify 205P1B5 cDNAs therein; and detecting the presence of the amplified 205P1B5 cDNA. Optionally, the sequence of the amplified 205P1B5 cDNA can be determined.

In another embodiment, a method of detecting a 205P1B5 gene in a biological sample comprises first isolating genomic DNA from the sample; amplifying the isolated genomic DNA using 205P1B5 polynucleotides as sense and antisense primers; and detecting the presence of the amplified 205P1B5 gene. Any number of appropriate sense and antisense probe combinations can be designed from the nucleotide sequence provided for the 205P1B5 (Figure 2) and used for this purpose.

The invention also provides assays for detecting the presence of an 205P1B5 protein in a tissue or other biological sample such as serum, semen, bone, prostate, urine, cell preparations, and the like. Methods for detecting a 205P1B5-related protein are also well known and include, for example, immunoprecipitation, immunohistochemical analysis, Western blot analysis, molecular binding assays, ELISA, ELIFA and the like. For example, a method of detecting the presence of a 205P1B5-related protein in a biological sample comprises first contacting the sample with a 205P1B5 antibody, a 205P1B5-reactive fragment thereof, or a recombinant protein containing an antigen binding region of a 205P1B5 antibody; and then detecting the binding of 205P1B5-related protein in the sample.

Methods for identifying a cell that expresses 205P1B5 are also within the scope of the invention. In one embodiment, an assay for identifying a cell that expresses a 205P1B5 gene comprises detecting the presence of 205P1B5 mRNA in the cell. Methods for the detection of particular mRNAs in cells are well known and include, for example, hybridization assays using complementary DNA probes (such as *in situ* hybridization using labeled 205P1B5 riboprobes, Northern blot and related techniques) and various nucleic acid amplification assays (such as RT-PCR using complementary primers specific for 205P1B5, and other amplification type detection methods, such as, for example, branched DNA, SISBA, TMA and the like). Alternatively, an assay for identifying a cell that expresses a 205P1B5 gene comprises detecting the presence of 205P1B5-related protein in the cell or secreted by the

WO 03/020954

PCT/US02/27760

cell. Various methods for the detection of proteins are well known in the art and are employed for the detection of 205P1B5-related proteins and cells that express 205P1B5-related proteins.

205P1B5 expression analysis is also useful as a tool for identifying and evaluating agents that modulate 205P1B5 gene expression. For example, 205P1B5 expression is significantly upregulated in prostate cancer, and is expressed in cancers of the tissues listed in Table I. Identification of a molecule or biological agent that inhibits 205P1B5 expression or over-expression in cancer cells is of therapeutic value. For example, such an agent can be identified by using a screen that quantifies 205P1B5 expression by RT-PCR, nucleic acid hybridization or antibody binding.

10 VIII.) Methods for Monitoring the Status of 205P1B5-related Genes and Their Products

Oncogenesis is known to be a multistep process where cellular growth becomes progressively dysregulated and cells progress from a normal physiological state to precancerous and then cancerous states (see, e.g., Alers et al., Lab Invest. 77(5): 437-438 (1997) and Isaacs et al., Cancer Surv. 23: 19-32 (1995)). In this context, examining a biological sample for evidence of dysregulated cell growth (such as aberrant 205P1B5 expression in cancers) allows for early detection of such aberrant physiology, before a pathologic state such as cancer has progressed to a stage that therapeutic options are more limited and or the prognosis is worse. In such examinations, the status of 205P1B5 in a biological sample of interest can be compared, for example, to the status of 205P1B5 in a corresponding normal sample (e.g. a sample from that individual or alternatively another individual that is not affected by a pathology). An alteration in the status of 205P1B5 in the biological sample (as compared to the normal sample) provides evidence of dysregulated cellular growth. In addition to using a biological sample that is not affected by a pathology as a normal sample, one can also use a predetermined normative value such as a predetermined normal level of mRNA expression (see, e.g., Grever et al., J. Comp. Neurol. 1996 Dec 9;376(2):306-14 and U.S. Patent No. 5,837,501) to compare 205P1B5 status in a sample.

The term "status" in this context is used according to its art accepted meaning and refers to the condition or state of a gene and its products. Typically, skilled artisans use a number of parameters to evaluate the condition or state of a gene and its products. These include, but are not limited to the location of expressed gene products (including the location of 205P1B5 expressing cells) as well as the level, and biological activity of expressed gene products (such as 205P1B5 mRNA, polynucleotides and polypeptides). Typically, an alteration in the status of 205P1B5 comprises a change in the location of 205P1B5 and/or 205P1B5 expressing cells and/or an increase in 205P1B5 mRNA and/or protein expression.

205P1B5 status in a sample can be analyzed by a number of means well known in the art, including without limitation, immunohistochemical analysis, *in situ* hybridization, RT-PCR analysis on laser capture micro-dissected samples, Western blot analysis, and tissue array analysis. Typical protocols for evaluating the status of the 205P1B5 gene and gene products are found, for example in Ausubel et al. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Units 2 (Northern Blotting), 4 (Southern Blotting), 15 (Immunoblotting) and 18 (PCR Analysis). Thus, the status of 205P1B5 in a biological sample is evaluated by various methods utilized by skilled artisans including, but not limited to genomic Southern analysis (to examine, for example perturbations in the 205P1B5 gene), Northern analysis and/or PCR analysis of 205P1B5 mRNA (to examine, for example alterations in the polynucleotide sequences or expression levels of 205P1B5 mRNAs), and, Western and/or immunohistochemical analysis (to examine, for example alterations in polypeptide sequences, alterations in polypeptide localization within a sample, alterations in expression levels of 205P1B5 proteins and/or associations of 205P1B5 proteins

WO 03/020954

PCT/US02/27760

with polypeptide binding partners). Detectable 205P1B5 polynucleotides include, for example, a 205P1B5 gene or fragment thereof, 205P1B5 mRNA, alternative splice variants, 205P1B5 mRNAs, and recombinant DNA or RNA molecules containing a 205P1B5 polynucleotide.

The expression profile of 205P1B5 makes it a diagnostic marker for local and/or metastasized disease, and provides information on the growth or oncogenic potential of a biological sample. In particular, the status of 205P1B5 provides information useful for predicting susceptibility to particular disease stages, progression, and/or tumor aggressiveness. The invention provides methods and assays for determining 205P1B5 status and diagnosing cancers that express 205P1B5, such as cancers of the tissues listed in Table I. For example, because 205P1B5 mRNA is so highly expressed in prostate and other cancers relative to normal prostate tissue, assays that evaluate the levels of 205P1B5 mRNA transcripts or proteins in a biological sample can be used to diagnose a disease associated with 205P1B5 dysregulation, and can provide prognostic information useful in defining appropriate therapeutic options.

The expression status of 205P1B5 provides information including the presence, stage and location of dysplastic, precancerous and cancerous cells, predicting susceptibility to various stages of disease, and/or for gauging tumor aggressiveness. Moreover, the expression profile makes it useful as an imaging reagent for metastasized disease. Consequently, an aspect of the invention is directed to the various molecular prognostic and diagnostic methods for examining the status of 205P1B5 in biological samples such as those from individuals suffering from, or suspected of suffering from a pathology characterized by dysregulated cellular growth, such as cancer.

As described above, the status of 205P1B5 in a biological sample can be examined by a number of well-known procedures in the art. For example, the status of 205P1B5 in a biological sample taken from a specific location in the body can be examined by evaluating the sample for the presence or absence of 205P1B5 expressing cells (e.g. those that express 205P1B5 mRNAs or proteins). This examination can provide evidence of dysregulated cellular growth, for example, when 205P1B5-expressing cells are found in a biological sample that does not normally contain such cells (such as a lymph node), because such alterations in the status of 205P1B5 in a biological sample are often associated with dysregulated cellular growth. Specifically, one indicator of dysregulated cellular growth is the metastases of cancer cells from an organ of origin (such as the prostate) to a different area of the body (such as a lymph node). In this context, evidence of dysregulated cellular growth is important for example because occult lymph node metastases can be detected in a substantial proportion of patients with prostate cancer, and such metastases are associated with known predictors of disease progression (see, e.g., Murphy et al., Prostate 42(4): 315-317 (2000); Su et al., Semin. Surg. Oncol. 18(1): 17-28 (2000) and Freeman et al., J Urol 1995 Aug 154(2 Pt 1):474-8).

In one aspect, the invention provides methods for monitoring 205P1B5 gene products by determining the status of 205P1B5 gene products expressed by cells from an individual suspected of having a disease associated with dysregulated cell growth (such as hyperplasia or cancer) and then comparing the status so determined to the status of 205P1B5 gene products in a corresponding normal sample. The presence of aberrant 205P1B5 gene products in the test sample relative to the normal sample provides an indication of the presence of dysregulated cell growth within the cells of the individual.

In another aspect, the invention provides assays useful in determining the presence of cancer in an individual, comprising detecting a significant increase in 205P1B5 mRNA or protein expression in a test cell or tissue sample relative to expression levels in the corresponding normal cell or tissue. The presence of 205P1B5 mRNA can, for example, be evaluated in tissue samples including but not limited to those listed in Table I. The

WO 03/020954

PCT/US02/27760

presence of significant 205P1B5 expression in any of these tissues is useful to indicate the emergence, presence and/or severity of a cancer, since the corresponding normal tissues do not express 205P1B5 mRNA or express it at lower levels.

In a related embodiment, 205P1B5 status is determined at the protein level rather than at the nucleic acid level. For example, such a method comprises determining the level of 205P1B5 protein expressed by cells in a test tissue sample and comparing the level so determined to the level of 205P1B5 expressed in a corresponding normal sample. In one embodiment, the presence of 205P1B5 protein is evaluated, for example, using immunohistochemical methods. 205P1B5 antibodies or binding partners capable of detecting 205P1B5 protein expression are used in a variety of assay formats well known in the art for this purpose.

In a further embodiment, one can evaluate the status of 205P1B5 nucleotide and amino acid sequences in a biological sample in order to identify perturbations in the structure of these molecules. These perturbations can include insertions, deletions, substitutions and the like. Such evaluations are useful because perturbations in the nucleotide and amino acid sequences are observed in a large number of proteins associated with a growth dysregulated phenotype (see, e.g., Marrogi et al., 1999, J. Cutan. Pathol. 26(8):369-378). For example, a mutation in the sequence of 205P1B5 may be indicative of the presence or promotion of a tumor. Such assays therefore have diagnostic and predictive value where a mutation in 205P1B5 indicates a potential loss of function or increase in tumor growth.

A wide variety of assays for observing perturbations in nucleotide and amino acid sequences are well known in the art. For example, the size and structure of nucleic acid or amino acid sequences of 205P1B5 gene products are observed by the Northern, Southern, Western, PCR and DNA sequencing protocols discussed herein. In addition, other methods for observing perturbations in nucleotide and amino acid sequences such as single strand conformation polymorphism analysis are well known in the art (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,382,510 issued 7 September 1999, and 5,952,170 issued 17 January 1995).

Additionally, one can examine the methylation status of the 205P1B5 gene in a biological sample. Aberrant demethylation and/or hypermethylation of CpG islands in gene 5' regulatory regions frequently occurs in immortalized and transformed cells, and can result in altered expression of various genes. For example, promoter hypermethylation of the pi-class glutathione S-transferase (a protein expressed in normal prostate but not expressed in >90% of prostate carcinomas) appears to permanently silence transcription of this gene and is the most frequently detected genomic alteration in prostate carcinomas (De Marzo et al., Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)). In addition, this alteration is present in at least 70% of cases of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) (Brooks et al, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536). In another example, expression of the LAGE-I tumor specific gene (which is not expressed in normal prostate but is expressed in 25-50% of prostate cancers) is induced by deoxy-azacytidine in lymphoblastoid cells, suggesting that tumoral expression is due to demethylation (Lethe et al., Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998)). A variety of assays for examining methylation status of a gene are well known in the art. For example, one can utilize, in Southern hybridization approaches, methylation-sensitive restriction enzymes which cannot cleave sequences that contain methylated CpG sites to assess the methylation status of CpG islands. In addition, MSP (methylation specific PCR) can rapidly profile the methylation status of all the CpG sites present in a CpG island of a given gene. This procedure involves initial modification of DNA by sodium bisulfite (which will convert all unmethylated cytosines to uracil) followed by amplification using primers specific for methylated versus unmethylated DNA.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Protocols involving methylation interference can also be found for example in Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995.

Gene amplification is an additional method for assessing the status of 205P1B5. Gene amplification is measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting or Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA (Thomas, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205), dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies are employed that recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn are labeled and the assay carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Biopsied tissue or peripheral blood can be conveniently assayed for the presence of cancer cells using for example, Northern, dot blot or RT-PCR analysis to detect 205P1B5 expression. The presence of RT-PCR amplifiable 205P1B5 mRNA provides an indication of the presence of cancer. RT-PCR assays are well known in the art. RT-PCR detection assays for tumor cells in peripheral blood are currently being evaluated for use in the diagnosis and management of a number of human solid tumors. In the prostate cancer field, these include RT-PCR assays for the detection of cells expressing PSA and PSM (Verkaik et al., 1997, Urol. Res. 25:373-384; Ghossein et al., 1995, J. Clin. Oncol. 13:1195-2000; Heston et al., 1995, Clin. Chem. 41:1687-1688).

A further aspect of the invention is an assessment of the susceptibility that an individual has for developing cancer. In one embodiment, a method for predicting susceptibility to cancer comprises detecting 205P1B5 mRNA or 205P1B5 protein in a tissue sample, its presence indicating susceptibility to cancer, wherein the degree of 205P1B5 mRNA expression correlates to the degree of susceptibility. In a specific embodiment, the presence of 205P1B5 in prostate or other tissue is examined, with the presence of 205P1B5 in the sample providing an indication of prostate cancer susceptibility (or the emergence or existence of a prostate tumor). Similarly, one can evaluate the integrity of 205P1B5 nucleotide and amino acid sequences in a biological sample, in order to identify perturbations in the structure of these molecules such as insertions, deletions, substitutions and the like. The presence of one or more perturbations in 205P1B5 gene products in the sample is an indication of cancer susceptibility (or the emergence or existence of a tumor).

The invention also comprises methods for gauging tumor aggressiveness. In one embodiment, a method for gauging aggressiveness of a tumor comprises determining the level of 205P1B5 mRNA or 205P1B5 protein expressed by tumor cells, comparing the level so determined to the level of 205P1B5 mRNA or 205P1B5 protein expressed in a corresponding normal tissue taken from the same individual or a normal tissue reference sample, wherein the degree of 205P1B5 mRNA or 205P1B5 protein expression in the tumor sample relative to the normal sample indicates the degree of aggressiveness. In a specific embodiment, aggressiveness of a tumor is evaluated by determining the extent to which 205P1B5 is expressed in the tumor cells, with higher expression levels indicating more aggressive tumors. Another embodiment is the evaluation of the integrity of 205P1B5 nucleotide and amino acid sequences in a biological sample, in order to identify perturbations in the structure of these molecules such as insertions, deletions, substitutions and the like. The presence of one or more perturbations indicates more aggressive tumors.

Another embodiment of the invention is directed to methods for observing the progression of a malignancy in an individual over time. In one embodiment, methods for observing the progression of a malignancy in an individual over time comprise determining the level of 205P1B5 mRNA or 205P1B5 protein expressed by cells in a

WO 03/020954

PCT/US02/27760

sample of the tumor, comparing the level so determined to the level of 205P1B5 mRNA or 205P1B5 protein expressed in an equivalent tissue sample taken from the same individual at a different time, wherein the degree of 205P1B5 mRNA or 205P1B5 protein expression in the tumor sample over time provides information on the progression of the cancer. In a specific embodiment, the progression of a cancer is evaluated by determining 205P1B5 expression in the tumor cells over time, where increased expression over time indicates a progression of the cancer. Also, one can evaluate the integrity 205P1B5 nucleotide and amino acid sequences in a biological sample in order to identify perturbations in the structure of these molecules such as insertions, deletions, substitutions and the like, where the presence of one or more perturbations indicates a progression of the cancer.

The above diagnostic approaches can be combined with any one of a wide variety of prognostic and diagnostic protocols known in the art. For example, another embodiment of the invention is directed to methods for observing a coincidence between the expression of 205P1B5 gene and 205P1B5 gene products (or perturbations in 205P1B5 gene and 205P1B5 gene products) and a factor that is associated with malignancy, as a means for diagnosing and prognosticating the status of a tissue sample. A wide variety of factors associated with malignancy can be utilized, such as the expression of genes associated with malignancy (e.g. PSA, PSCA and PSM expression for prostate cancer etc.) as well as gross cytological observations (see, e.g., Bocking et al., 1984, Anal. Quant. Cytol. 6(2):74-88; Epstein, 1995, Hum. Pathol. 26(2):223-9; Thorson et al., 1998, Mod. Pathol. 11(6):543-51; Baisden et al., 1999, Am. J. Surg. Pathol. 23(8):918-24). Methods for observing a coincidence between the expression of 205P1B5 gene and 205P1B5 gene products (or perturbations in 205P1B5 gene and 205P1B5 gene products) and another factor that is associated with malignancy are useful, for example, because the presence of a set of specific factors that coincide with disease provides information crucial for diagnosing and prognosticating the status of a tissue sample.

In one embodiment, methods for observing a coincidence between the expression of 205P1B5 gene and 205P1B5 gene products (or perturbations in 205P1B5 gene and 205P1B5 gene products) and another factor associated with malignancy entails detecting the overexpression of 205P1B5 mRNA or protein in a tissue sample, detecting the overexpression of PSA mRNA or protein in a tissue sample (or PSCA or PSM expression), and observing a coincidence of 205P1B5 mRNA or protein and PSA mRNA or protein overexpression (or PSCA or PSM expression). In a specific embodiment, the expression of 205P1B5 and PSA mRNA in prostate tissue is examined, where the coincidence of 205P1B5 and PSA mRNA overexpression in the sample indicates the existence of prostate cancer, prostate cancer susceptibility or the emergence or status of a prostate tumor.

Methods for detecting and quantifying the expression of 205P1B5 mRNA or protein are described herein, and standard nucleic acid and protein detection and quantification technologies are well known in the art. Standard methods for the detection and quantification of 205P1B5 mRNA include *in situ* hybridization using labeled 205P1B5 riboprobes, Northern blot and related techniques using 205P1B5 polynucleotide probes, RT-PCR analysis using primers specific for 205P1B5, and other amplification type detection methods, such as, for example, branched DNA, SISBA, TMA and the like. In a specific embodiment, semi-quantitative RT-PCR is used to detect and quantify 205P1B5 mRNA expression. Any number of primers capable of amplifying 205P1B5 can be used for this purpose, including but not limited to the various primer sets specifically described herein. In a specific embodiment, polyclonal or monoclonal antibodies specifically reactive with the wild-type 205P1B5 protein can be used in an immunohistochemical assay of biopsied tissue.

IX.) Identification of Molecules That Interact With 205P1B5

WO 03/020954

PCT/US02/27760

The 205P1B5 protein and nucleic acid sequences disclosed herein allow a skilled artisan to identify proteins, small molecules and other agents that interact with 205P1B5, as well as pathways activated by 205P1B5 via any one of a variety of art accepted protocols. For example, one can utilize one of the so-called interaction trap systems (also referred to as the "two-hybrid assay"). In such systems, molecules interact and
 5 reconstitute a transcription factor which directs expression of a reporter gene, whereupon the expression of the reporter gene is assayed. Other systems identify protein-protein interactions *in vivo* through reconstitution of a eukaryotic transcriptional activator, see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,955,280 issued 21 September 1999, 5,925,523 issued 20 July 1999, 5,846,722 issued 8 December 1998 and 6,004,746 issued 21 December 1999. Algorithms are also available in the art for genome-based predictions of protein function (see, e.g., Marcotte, et al., Nature
 10 402: 4 November 1999, 83-86).

Alternatively one can screen peptide libraries to identify molecules that interact with 205P1B5 protein sequences. In such methods, peptides that bind to 205P1B5 are identified by screening libraries that encode a random or controlled collection of amino acids. Peptides encoded by the libraries are expressed as fusion proteins of bacteriophage coat proteins, the bacteriophage particles are then screened against the 205P1B5
 15 protein.

Accordingly, peptides having a wide variety of uses, such as therapeutic, prognostic or diagnostic reagents, are thus identified without any prior information on the structure of the expected ligand or receptor molecule. Typical peptide libraries and screening methods that can be used to identify molecules that interact with 205P1B5 protein sequences are disclosed for example in U.S. Patent Nos. 5,723,286 issued 3 March 1998
 20 and 5,733,731 issued 31 March 1998.

Alternatively, cell lines that express 205P1B5 are used to identify protein-protein interactions mediated by 205P1B5. Such interactions can be examined using immunoprecipitation techniques (see, e.g., Hamilton BJ, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 261:646-51). 205P1B5 protein can be immunoprecipitated from 205P1B5-expressing cell lines using anti-205P1B5 antibodies. Alternatively, antibodies against His-tag can be
 25 used in a cell line engineered to express fusions of 205P1B5 and a His-tag (vectors mentioned above). The immunoprecipitated complex can be examined for protein association by procedures such as Western blotting, ³⁵S-methionine labeling of proteins, protein microsequencing, silver staining and two-dimensional gel electrophoresis.

Small molecules and ligands that interact with 205P1B5 can be identified through related embodiments of such screening assays. For example, small molecules can be identified that interfere with protein function, including molecules that interfere with 205P1B5's ability to mediate phosphorylation and de-phosphorylation, interaction with DNA or RNA molecules as an indication of regulation of cell cycles, second messenger signaling or tumorigenesis. Similarly, small molecules that modulate 205P1B5-related ion channel, protein pump, or cell communication functions are identified and used to treat patients that have a cancer that expresses
 30 205P1B5 (see, e.g., Hille, B., Ionic Channels of Excitable Membranes 2nd Ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992). Moreover, ligands that regulate 205P1B5 function can be identified based on their ability to bind 205P1B5 and activate a reporter construct. Typical methods are discussed for example in U.S. Patent No. 5,928,868 issued 27 July 1999, and include methods for forming hybrid ligands in which at least one ligand is a small molecule. In an illustrative embodiment, cells engineered to express a fusion protein of 205P1B5 and a
 35 DNA-binding protein are used to co-express a fusion protein of a hybrid ligand/small molecule and a cDNA library transcriptional activator protein. The cells further contain a reporter gene, the expression of which is

WO 03/020954

PCT/US02/27760

conditioned on the proximity of the first and second fusion proteins to each other, an event that occurs only if the hybrid ligand binds to target sites on both hybrid proteins. Those cells that express the reporter gene are selected and the unknown small molecule or the unknown ligand is identified. This method provides a means of identifying modulators which activate or inhibit 205P1B5.

5 An embodiment of this invention comprises a method of screening for a molecule that interacts with an 205P1B5 amino acid sequence shown in Figure 2 or Figure 3, comprising the steps of contacting a population of molecules with the 205P1B5 amino acid sequence, allowing the population of molecules and the 205P1B5 amino acid sequence to interact under conditions that facilitate an interaction, determining the presence of a molecule that interacts with the 205P1B5 amino acid sequence, and then separating molecules that do not
10 interact with the 205P1B5 amino acid sequence from molecules that do. In a specific embodiment, the method further comprises purifying, characterizing and identifying a molecule that interacts with the 205P1B5 amino acid sequence. The identified molecule can be used to modulate a function performed by 205P1B5. In a preferred embodiment, the 205P1B5 amino acid sequence is contacted with a library of peptides.

15 X.) Therapeutic Methods and Compositions

The identification of 205P1B5 as a protein that is normally expressed in a restricted set of tissues, but which is also expressed in prostate and other cancers, opens a number of therapeutic approaches to the treatment of such cancers. As contemplated herein, 205P1B5 functions as a transcription factor involved in activating tumor-promoting genes or repressing genes that block tumorigenesis.

20 Accordingly, therapeutic approaches that inhibit the activity of the 205P1B5 protein are useful for patients suffering from a cancer that expresses 205P1B5. These therapeutic approaches generally fall into two classes. One class comprises various methods for inhibiting the binding or association of the 205P1B5 protein with its binding partner or with other proteins. Another class comprises a variety of methods for inhibiting the transcription of the 205P1B5 gene or translation of 205P1B5 mRNA.

25 X.A.) Anti-Cancer Vaccines

The invention provides cancer vaccines comprising a 205P1B5-related protein or 205P1B5-related nucleic acid. In view of the expression of 205P1B5, cancer vaccines prevent and/or treat 205P1B5-expressing cancers with minimal or no effects on non-target tissues. The use of a tumor antigen in a vaccine that generates humoral and/or cell-mediated immune responses as anti-cancer therapy is well known in the art and has been employed in prostate cancer using human PSMA and rodent PAP immunogens (Hodge et al., 1995, Int. J. Cancer 63:231-237; Fong et al.,
30 1997, J. Immunol. 159:3113-3117).

Such methods can be readily practiced by employing a 205P1B5-related protein, or an 205P1B5-encoding nucleic acid molecule and recombinant vectors capable of expressing and presenting the 205P1B5 immunogen (which typically comprises a number of antibody or T cell epitopes). Skilled artisans understand that a wide variety of vaccine systems for delivery of immunoreactive epitopes are known in the art (see, e.g., Herylin et al., Ann Med 1999 Feb 31(1):66-78; Maruyama et al., Cancer Immunol Immunother 2000 Jun
35 49(3):123-32). Briefly, such methods of generating an immune response (e.g. humoral and/or cell-mediated) in a mammal, comprise the steps of: exposing the mammal's immune system to an immunoreactive epitope (e.g. an epitope present in the 205P1B5 protein shown in SEQ ID NO: 703 or analog or homolog thereof) so that the mammal generates an immune response that is specific for that epitope (e.g. generates antibodies that
40 specifically recognize that epitope). In a preferred method, the 205P1B5 immunogen contains a biological

WO 03/020954

PCT/US02/27760

motif, see e.g., Tables V-XVIII, or a peptide of a size range from 205P1B5 indicated in Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8, and Figure 9.

The entire 205P1B5 protein, immunogenic regions or epitopes thereof can be combined and delivered by various means. Such vaccine compositions can include, for example, lipopeptides (e.g., Vitiello, A. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:341, 1995), peptide compositions encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) ("PLG") microspheres (see, e.g., Eldridge, *et al.*, *Molec. Immunol.* 28:287-294, 1991; Alonso *et al.*, *Vaccine* 12:299-306, 1994; Jones *et al.*, *Vaccine* 13:675-681, 1995), peptide compositions contained in immune stimulating complexes (ISCOMS) (see, e.g., Takahashi *et al.*, *Nature* 344:873-875, 1990; Hu *et al.*, *Clin Exp Immunol.* 113:235-243, 1998), multiple antigen peptide systems (MAPs) (see e.g., Tam, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5409-5413, 1988; Tam, J.P., *J. Immunol. Methods* 196:17-32, 1996), peptides formulated as multivalent peptides; peptides for use in ballistic delivery systems, typically crystallized peptides, viral delivery vectors (Perkus, M. E. *et al.*, In: *Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E., ed., p. 379, 1996; Chakrabarti, S. *et al.*, *Nature* 320:535, 1986; Hu, S. L. *et al.*, *Nature* 320:537, 1986; Kieny, M.-P. *et al.*, *AIDS Bio/Technology* 4:790, 1986; Top, F. H. *et al.*, *J. Infect. Dis.* 124:148, 1971; Chanda, P. K. *et al.*, *Virology* 175:535, 1990), particles of viral or synthetic origin (e.g., Kotler, N. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 192:25, 1996; Eldridge, J. H. *et al.*, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993; Falo, L. D., Jr. *et al.*, *Nature Med.* 7:649, 1995), adjuvants (Warren, H. S., Vogel, F. R., and Chedid, L. A. *Annu. Rev. Immunol.* 4:369, 1986; Gupta, R. K. *et al.*, *Vaccine* 11:293, 1993), liposomes (Reddy, R. *et al.*, *J. Immunol.* 148:1585, 1992; Rock, K. L., *Immunol. Today* 17:131, 1996), or, naked or particle absorbed cDNA (Ulmer, J. B. *et al.*, *Science* 259:1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L. A., and Webster, R. G., *Vaccine* 11:937, 1993; Shiver, J. W. *et al.*, In: *Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E., ed., p. 423, 1996; Cease, K. B., and Berzofsky, J. A., *Annu. Rev. Immunol.* 12:923, 1994 and Eldridge, J. H. *et al.*, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993). Toxin-targeted delivery technologies, also known as receptor mediated targeting, such as those of Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts) may also be used.

In patients with 205P1B5-associated cancer, the vaccine compositions of the invention can also be used in conjunction with other treatments used for cancer, e.g., surgery, chemotherapy, drug therapies, radiation therapies, etc. including use in combination with immune adjuvants such as IL-2, IL-12, GM-CSF, and the like.

Cellular Vaccines:

CTL epitopes can be determined using specific algorithms to identify peptides within 205P1B5 protein that bind corresponding HLA alleles (see e.g., Table IV; Epimer™ and Epimatrix™, Brown University (URL world wide web URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); and, BIMAS, (URL bimas.dcrf.nih.gov/; SYFPEITHI at URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/). In a preferred embodiment, the 205P1B5 immunogen contains one or more amino acid sequences identified using techniques well known in the art, such as the sequences shown in Tables V-XVIII or a peptide of 8, 9, 10 or 11 amino acids specified by an HLA Class I motif/supermotif (e.g., Table IV (A), Table IV (D), or Table IV (E)) and/or a peptide of at least 9 amino acids that comprises an HLA Class II motif/supermotif (e.g., Table IV (B) or Table IV (C)). As is appreciated in the art, the HLA Class I binding groove is essentially closed ended so that peptides of only a particular size range can fit into the groove and be bound, generally HLA Class I epitopes are 8, 9, 10, or 11 amino acids long. In contrast, the HLA Class II binding groove is essentially open ended; therefore a peptide of about 9 or more amino acids can be bound by an HLA Class II molecule. Due to the binding groove differences between HLA Class I and II, HLA Class I motifs are length specific, i.e., position two of a Class I motif is the second amino acid in an amino to carboxyl direction of the peptide. The amino acid positions in a Class II motif are relative

WO 03/020954

PCT/US02/27760

only to each other, not the overall peptide, i.e., additional amino acids can be attached to the amino and/or carboxyl termini of a motif-bearing sequence. HLA Class II epitopes are often 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 amino acids long, or longer than 25 amino acids.

Antibody-based Vaccines

5 A wide variety of methods for generating an immune response in a mammal are known in the art (for example as the first step in the generation of hybridomas). Methods of generating an immune response in a mammal comprise exposing the mammal's immune system to an immunogenic epitope on a protein (e.g. the 205P1B5 protein) so that an immune response is generated. A typical embodiment consists of a method for generating an immune response to 205P1B5 in a host, by contacting the host with a sufficient amount of at least one 205P1B5 B cell or cytotoxic T-cell epitope or analog thereof; and at least one periodic interval thereafter re-
10 contacting the host with the 205P1B5 B cell or cytotoxic T-cell epitope or analog thereof. A specific embodiment consists of a method of generating an immune response against a 205P1B5-related protein or a man-made multi-epitopic peptide comprising: administering 205P1B5 immunogen (e.g. the 205P1B5 protein or a peptide fragment thereof, an 205P1B5 fusion protein or analog etc.) in a vaccine preparation to a human or another mammal. Typically, such vaccine preparations further contain a suitable adjuvant (see, e.g., U.S. Patent No. 6,146,635) or a universal helper epitope such as a PADRE™ peptide (Epinimmune Inc., San Diego, CA; see, e.g., Alexander et al., J. Immunol. 2000 164(3): 164(3): 1625-1633; Alexander et al., Immunity 1994 1(9): 751-761 and Alexander et al., Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92). An alternative method comprises generating an immune response in an individual against a 205P1B5 immunogen by: administering *in vivo* to muscle or skin of
20 the individual's body a DNA molecule that comprises a DNA sequence that encodes an 205P1B5 immunogen, the DNA sequence operatively linked to regulatory sequences which control the expression of the DNA sequence; wherein the DNA molecule is taken up by cells, the DNA sequence is expressed in the cells and an immune response is generated against the immunogen (see, e.g., U.S. Patent No. 5,962,428). Optionally a genetic vaccine facilitator such as anionic lipids; saponins; lectins; estrogenic compounds; hydroxylated lower
25 alkyls; dimethyl sulfoxide; and urea is also administered.

Nucleic Acid Vaccines

Vaccine compositions of the invention include nucleic acid-mediated modalities. DNA or RNA that encode protein(s) of the invention can be administered to a patient. Genetic immunization methods can be employed to generate prophylactic or therapeutic humoral and cellular immune responses directed against cancer
30 cells expressing 205P1B5. Constructs comprising DNA encoding a 205P1B5-related protein/immunogen and appropriate regulatory sequences can be injected directly into muscle or skin of an individual, such that the cells of the muscle or skin take-up the construct and express the encoded 205P1B5 protein/immunogen. Alternatively, a vaccine comprises a 205P1B5-related protein. Expression of the 205P1B5-related protein immunogen results in the generation of prophylactic or therapeutic humoral and cellular immunity against cells
35 that bear 205P1B5 protein. Various prophylactic and therapeutic genetic immunization techniques known in the art can be used (for review, see information and references published at Internet address world wide web URL genweb.com). Nucleic acid-based delivery is described, for instance, in Wolff *et. al.*, *Science* 247:1465 (1990) as well as U.S. Patent Nos. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; WO 98/04720. Examples of DNA-based delivery technologies include "naked DNA", facilitated (bupivacaine, polymers,
40 peptide-mediated) delivery, cationic lipid complexes, and particle-mediated ("gene gun") or pressure-mediated delivery (see, e.g., U.S. Patent No. 5,922,687).

WO 03/020954

PCT/US02/27760

For therapeutic or prophylactic immunization purposes, proteins of the invention can be expressed via viral or bacterial vectors. Various viral gene delivery systems that can be used in the practice of the invention include, but are not limited to, vaccinia, fowlpox, canarypox, adenovirus, influenza, poliovirus, adeno-associated virus, lentivirus, and sindbis virus (see, e.g., Restifo, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8:658-663; Tsang et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:982-990 (1995)). Non-viral delivery systems can also be employed by introducing naked DNA encoding a 205P1B5-related protein into the patient (e.g., intramuscularly or intradermally) to induce an anti-tumor response.

Vaccinia virus is used, for example, as a vector to express nucleotide sequences that encode the peptides of the invention. Upon introduction into a host, the recombinant vaccinia virus expresses the protein immunogenic peptide, and thereby elicits a host immune response. Vaccinia vectors and methods useful in immunization protocols are described in, e.g., U.S. Patent No. 4,722,848. Another vector is BCG (Bacille Calmette Guérin). BCG vectors are described in Stover *et al.*, *Nature* 351:456-460 (1991). A wide variety of other vectors useful for therapeutic administration or immunization of the peptides of the invention, e.g. adeno and adeno-associated virus vectors, retroviral vectors, *Salmonella typhi* vectors, detoxified anthrax toxin vectors, and the like, will be apparent to those skilled in the art from the description herein.

Thus, gene delivery systems are used to deliver a 205P1B5-related nucleic acid molecule. In one embodiment, the full-length human 205P1B5 cDNA is employed. In another embodiment, 205P1B5 nucleic acid molecules encoding specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) and/or antibody epitopes are employed.

Ex Vivo Vaccines

Various *ex vivo* strategies can also be employed to generate an immune response. One approach involves the use of antigen presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DC) to present 205P1B5 antigen to a patient's immune system. Dendritic cells express MHC class I and II molecules, B7 co-stimulator, and IL-12, and are thus highly specialized antigen presenting cells. In prostate cancer, autologous dendritic cells pulsed with peptides of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) are being used in a Phase I clinical trial to stimulate prostate cancer patients' immune systems (Tjoo *et al.*, 1996, *Prostate* 28:65-69; Murphy *et al.*, 1996, *Prostate* 29:371-380). Thus, dendritic cells can be used to present 205P1B5 peptides to T cells in the context of MHC class I or II molecules. In one embodiment, autologous dendritic cells are pulsed with 205P1B5 peptides capable of binding to MHC class I and/or class II molecules. In another embodiment, dendritic cells are pulsed with the complete 205P1B5 protein. Yet another embodiment involves engineering the overexpression of the 205P1B5 gene in dendritic cells using various implementing vectors known in the art, such as adenovirus (Arthur *et al.*, 1997, *Cancer Gene Ther.* 4:17-25), retrovirus (Henderson *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:3763-3770), lentivirus, adeno-associated virus, DNA transfection (Ribas *et al.*, 1997, *Cancer Res.* 57:2865-2869), or tumor-derived RNA transfection (Ashley *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.* 186:1177-1182). Cells that express 205P1B5 can also be engineered to express immune modulators, such as GM-CSF, and used as immunizing agents.

X.B.) 205P1B5 as a Target for Antibody-based Therapy

205P1B5 is an attractive target for antibody-based therapeutic strategies. A number of antibody strategies are known in the art for targeting both extracellular and intracellular molecules (see, e.g., complement and ADCC mediated killing as well as the use of intrabodies). Because 205P1B5 is expressed by cancer cells of various lineages relative to corresponding normal cells, systemic administration of 205P1B5-immunoreactive compositions are prepared that exhibit excellent sensitivity without toxic, non-specific and/or non-target effects caused by binding of the immunoreactive composition to non-target organs and tissues. Antibodies specifically

WO 03/020954

PCT/US02/27760

reactive with domains of 205P1B5 are useful to treat 205P1B5-expressing cancers systemically, either as conjugates with a toxin or therapeutic agent, or as naked antibodies capable of inhibiting cell proliferation or function.

205P1B5 antibodies can be introduced into a patient such that the antibody binds to 205P1B5 and modulates a function, such as an interaction with a binding partner, and consequently mediates destruction of the tumor cells and/or inhibits the growth of the tumor cells. Mechanisms by which such antibodies exert a therapeutic effect can include complement-mediated cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, modulation of the physiological function of 205P1B5, inhibition of ligand binding or signal transduction pathways, modulation of tumor cell differentiation, alteration of tumor angiogenesis factor profiles, and/or apoptosis.

Those skilled in the art understand that antibodies can be used to specifically target and bind immunogenic molecules such as an immunogenic region of the 205P1B5 sequence shown in Figure 2 or Figure 3. In addition, skilled artisans understand that it is routine to conjugate antibodies to cytotoxic agents (see, e.g., Slevens et al. *Blood* 93:11 3678-3684 (June 1, 1999)). When cytotoxic and/or therapeutic agents are delivered directly to cells, such as by conjugating them to antibodies specific for a molecule expressed by that cell (e.g. 205P1B5), the cytotoxic agent will exert its known biological effect (i.e. cytotoxicity) on those cells.

A wide variety of compositions and methods for using antibody-cytotoxic agent conjugates to kill cells are known in the art. In the context of cancers, typical methods entail administering to an animal having a tumor a biologically effective amount of a conjugate comprising a selected cytotoxic and/or therapeutic agent linked to a targeting agent (e.g. an anti-205P1B5 antibody) that binds to a marker (e.g. 205P1B5) expressed, accessible to binding or localized on the cell surfaces. A typical embodiment is a method of delivering a cytotoxic and/or therapeutic agent to a cell expressing 205P1B5, comprising conjugating the cytotoxic agent to an antibody that immunospecifically binds to a 205P1B5 epitope, and, exposing the cell to the antibody-agent conjugate. Another illustrative embodiment is a method of treating an individual suspected of suffering from metastasized cancer, comprising a step of administering parenterally to said individual a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an antibody conjugated to a cytotoxic and/or therapeutic agent.

Cancer immunotherapy using anti-205P1B5 antibodies can be done in accordance with various approaches that have been successfully employed in the treatment of other types of cancer, including but not limited to colon cancer (Arlan et al., 1998, *Crit. Rev. Immunol.* 18:133-138), multiple myeloma (Ozaki et al., 1997, *Blood* 90:3179-3186, Tsunenari et al., 1997, *Blood* 90:2437-2444), gastric cancer (Kasprzyk et al., 1992, *Cancer Res.* 52:2771-2776), B-cell lymphoma (Funakoshi et al., 1996, *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 19:93-101), leukemia (Zhong et al., 1996, *Leuk. Res.* 20:581-589), colorectal cancer (Moun et al., 1994, *Cancer Res.* 54:6160-6166; Velders et al., 1995, *Cancer Res.* 55:4398-4403), and breast cancer (Shepard et al., 1991, *J. Clin. Immunol.* 11:117-127). Some therapeutic approaches involve conjugation of naked antibody to a toxin, such as the conjugation of Y⁹⁰ or I¹³¹ to anti-CD20 antibodies (e.g., ZevalinTM, IDEC Pharmaceuticals Corp. or BexxarTM, Coulter Pharmaceuticals), while others involve co-administration of antibodies and other therapeutic agents, such as HerceptinTM (trastuzumab) with paclitaxel (Genentech, Inc.). To treat prostate cancer, for example, 205P1B5 antibodies can be administered in conjunction with radiation, chemotherapy or hormone ablation.

Although 205P1B5 antibody therapy is useful for all stages of cancer, antibody therapy can be particularly appropriate in advanced or metastatic cancers. Treatment with the antibody therapy of the invention

WO 03/020954

PCT/US02/27760

is indicated for patients who have received one or more rounds of chemotherapy. Alternatively, antibody therapy of the invention is combined with a chemotherapeutic or radiation regimen for patients who have not received chemotherapeutic treatment. Additionally, antibody therapy can enable the use of reduced dosages of concomitant chemotherapy, particularly for patients who do not tolerate the toxicity of the chemotherapeutic agent very well.

Cancer patients can be evaluated for the presence and level of 205P1B5 expression, preferably using immunohistochemical assessments of tumor tissue, quantitative 205P1B5 imaging, or other techniques that reliably indicate the presence and degree of 205P1B5 expression. Immunohistochemical analysis of tumor biopsies or surgical specimens is preferred for this purpose. Methods for immunohistochemical analysis of tumor tissues are well known in the art.

Anti-205P1B5 monoclonal antibodies that treat prostate and other cancers include those that initiate a potent immune response against the tumor or those that are directly cytotoxic. In this regard, anti-205P1B5 monoclonal antibodies (mAbs) can elicit tumor cell lysis by either complement-mediated or antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) mechanisms, both of which require an intact Fc portion of the immunoglobulin molecule for interaction with effector cell Fc receptor sites on complement proteins. In addition, anti-205P1B5 mAbs that exert a direct biological effect on tumor growth are useful to treat cancers that express 205P1B5. Mechanisms by which directly cytotoxic mAbs act include: inhibition of cell growth, modulation of cellular differentiation, modulation of tumor angiogenesis factor profiles, and the induction of apoptosis. The mechanism(s) by which a particular anti-205P1B5 mAb exerts an anti-tumor effect is evaluated using any number of *in vitro* assays that evaluate cell death such as ADCC, ADMMC, complement-mediated cell lysis, and so forth, as is generally known in the art.

In some patients, the use of murine or other non-human monoclonal antibodies, or human/mouse chimeric mAbs can induce moderate to strong immune responses against the non-human antibody. This can result in clearance of the antibody from circulation and reduced efficacy. In the most severe cases, such an immune response can lead to the extensive formation of immune complexes which, potentially, can cause renal failure. Accordingly, preferred monoclonal antibodies used in the therapeutic methods of the invention are those that are either fully human or humanized and that bind specifically to the target 205P1B5 antigen with high affinity but exhibit low or no antigenicity in the patient.

Therapeutic methods of the invention contemplate the administration of single anti-205P1B5 mAbs as well as combinations, or cocktails, of different mAbs. Such mAb cocktails can have certain advantages inasmuch as they contain mAbs that target different epitopes, exploit different effector mechanisms or combine directly cytotoxic mAbs with mAbs that rely on immune effector functionality. Such mAbs in combination can exhibit synergistic therapeutic effects. In addition, anti-205P1B5 mAbs can be administered concomitantly with other therapeutic modalities, including but not limited to various chemotherapeutic agents, androgen-blockers, immune modulators (e.g., IL-2, GM-CSF), surgery or radiation. The anti-205P1B5 mAbs are administered in their "naked" or unconjugated form, or can have a therapeutic agent(s) conjugated to them.

Anti-205P1B5 antibody formulations are administered via any route capable of delivering the antibodies to a tumor cell. Routes of administration include, but are not limited to, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, intratumor, intradermal, and the like. Treatment generally involves repeated administration of the anti-205P1B5 antibody preparation, via an acceptable route of administration such as intravenous injection (IV),

WO 03/020954

PCT/US02/27760

typically at a dose in the range of about 0.1 to about 10 mg/kg body weight. In general, doses in the range of 10-500 mg mAb per week are effective and well tolerated.

Based on clinical experience with the Herceptin mAb in the treatment of metastatic breast cancer, an initial loading dose of approximately 4 mg/kg patient body weight IV, followed by weekly doses of about 2 mg/kg IV of the anti-205P1B5 mAb preparation represents an acceptable dosing regimen. Preferably, the initial loading dose is administered as a 90 minute or longer infusion. The periodic maintenance dose is administered as a 30 minute or longer infusion, provided the initial dose was well tolerated. As appreciated by those of skill in the art, various factors can influence the ideal dose regimen in a particular case. Such factors include, for example, the binding affinity and half life of the Ab or mAbs used, the degree of 205P1B5 expression in the patient, the extent of circulating shed 205P1B5 antigen, the desired steady-state antibody concentration level, frequency of treatment, and the influence of chemotherapeutic or other agents used in combination with the treatment method of the invention, as well as the health status of a particular patient.

Optionally, patients should be evaluated for the levels of 205P1B5 in a given sample (e.g. the levels of circulating 205P1B5 antigen and/or 205P1B5 expressing cells) in order to assist in the determination of the most effective dosing regimen, etc. Such evaluations are also used for monitoring purposes throughout therapy, and are useful to gauge therapeutic success in combination with the evaluation of other parameters (for example, urine cytology and/or ImmunoCyt levels in bladder cancer therapy, or by analogy, serum PSA levels in prostate cancer therapy).

Anti-idiotypic anti-205P1B5 antibodies can also be used in anti-cancer therapy as a vaccine for inducing an immune response to cells expressing a 205P1B5-related protein. In particular, the generation of anti-idiotypic antibodies is well known in the art; this methodology can readily be adapted to generate anti-idiotypic anti-205P1B5 antibodies that mimic an epitope on a 205P1B5-related protein (see, for example, Wagner et al., 1997, Hybridoma 16: 33-40; Foon et al., 1995, J. Clin. Invest. 96:334-342; Herlyn et al., 1996, Cancer Immunol. Immunother. 43:65-76). Such an anti-idiotypic antibody can be used in cancer vaccine strategies.

X.C.) 205P1B5 as a Target for Cellular Immune Responses

Vaccines and methods of preparing vaccines that contain an immunogenically effective amount of one or more HLA-binding peptides as described herein are further embodiments of the invention. Furthermore, vaccines in accordance with the invention encompass compositions of one or more of the claimed peptides. A peptide can be present in a vaccine individually. Alternatively, the peptide can exist as a homopolymer comprising multiple copies of the same peptide, or as a heteropolymer of various peptides. Polymers have the advantage of increased immunological reaction and, where different peptide epitopes are used to make up the polymer, the additional ability to induce antibodies and/or CTLs that react with different antigenic determinants of the pathogenic organism or tumor-related peptide targeted for an immune response. The composition can be a naturally occurring region of an antigen or can be prepared, e.g., recombinantly or by chemical synthesis.

Carriers that can be used with vaccines of the invention are well known in the art, and include, e.g., thyroglobulin, albumins such as human serum albumin, tetanus toxoid, polyamino acids such as poly L-lysine, poly L-glutamic acid, influenza, hepatitis B virus core protein, and the like. The vaccines can contain a physiologically tolerable (i.e., acceptable) diluent such as water, or saline, preferably phosphate buffered saline. The vaccines also typically include an adjuvant. Adjuvants such as incomplete Freund's adjuvant, aluminum phosphate, aluminum hydroxide, or alum are examples of materials well known in the art. Additionally, as

WO 03/020954

PCT/US02/27760

disclosed herein, CTL responses can be primed by conjugating peptides of the invention to lipids, such as tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserine (P₃CSS). Moreover, an adjuvant such as a synthetic cytosine-phosphorothiolated-guanine-containing (CpG) oligonucleotides has been found to increase CTL responses 10- to 100-fold. (see, e.g. Davila and Celis *J. Immunol.* 165:539-547 (2000))

5 Upon immunization with a peptide composition in accordance with the invention, via injection, aerosol, oral, transdermal, transmucosal, intrapleural, intrathecal, or other suitable routes, the immune system of the host responds to the vaccine by producing large amounts of CTLs and/or HTLs specific for the desired antigen. Consequently, the host becomes at least partially immune to later development of cells that express or overexpress 205P1B5 antigen, or derives at least some therapeutic benefit when the antigen was tumor-associated.

10 In some embodiments, it may be desirable to combine the class I peptide components with components that induce or facilitate neutralizing antibody and/or helper T cell responses directed to the target antigen. A preferred embodiment of such a composition comprises class I and class II epitopes in accordance with the invention. An alternative embodiment of such a composition comprises a class I and/or class II epitope in accordance with the invention, along with a cross reactive HTL epitope such as PADRE™ (Epinumne, San Diego, CA) molecule (described e.g., in U.S. Patent Number 5,736,142).

A vaccine of the invention can also include antigen-presenting cells (APC), such as dendritic cells (DC), as a vehicle to present peptides of the invention. Vaccine compositions can be created *in vitro*, following dendritic cell mobilization and harvesting, whereby loading of dendritic cells occurs *in vitro*. For example, 20 dendritic cells are transfected, e.g., with a minigene in accordance with the invention, or are pulsed with peptides. The dendritic cell can then be administered to a patient to elicit immune responses *in vivo*. Vaccine compositions, either DNA- or peptide-based, can also be administered *in vivo* in combination with dendritic cell mobilization whereby loading of dendritic cells occurs *in vivo*.

Preferably, the following principles are utilized when selecting an array of epitopes for inclusion in a 25 polypeptidic composition for use in a vaccine, or for selecting discrete epitopes to be included in a vaccine and/or to be encoded by nucleic acids such as a minigene. It is preferred that each of the following principles be balanced in order to make the selection. The multiple epitopes to be incorporated in a given vaccine composition may be, but need not be, contiguous in sequence in the native antigen from which the epitopes are derived.

1.) Epitopes are selected which, upon administration, mimic immune responses that have been 30 observed to be correlated with tumor clearance. For HLA Class I this includes 3-4 epitopes that come from at least one tumor associated antigen (TAA). For HLA Class II a similar rationale is employed; again 3-4 epitopes are selected from at least one TAA (see, e.g., Rosenberg *et al.*, *Science* 278:1447-1450). Epitopes from one TAA may be used in combination with epitopes from one or more additional TAAs to produce a vaccine that targets tumors with varying expression patterns of frequently-expressed TAAs.

2.) Epitopes are selected that have the requisite binding affinity established to be correlated with 35 immunogenicity: for HLA Class I an IC₅₀ of 500 nM or less, often 200 nM or less; and for Class II an IC₅₀ of 1000 nM or less.

3.) Sufficient supermotif bearing-peptides, or a sufficient array of allele-specific motif-bearing 40 peptides, are selected to give broad population coverage. For example, it is preferable to have at least 80% population coverage. A Monte Carlo analysis, a statistical evaluation known in the art, can be employed to assess the breadth, or redundancy of, population coverage.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

4.) When selecting epitopes from cancer-related antigens it is often useful to select analogs because the patient may have developed tolerance to the native epitope.

5.) Of particular relevance are epitopes referred to as "nested epitopes." Nested epitopes occur where at least two epitopes overlap in a given peptide sequence. A nested peptide sequence can comprise B cell, HLA class I and/or HLA class II epitopes. When providing nested epitopes, a general objective is to provide the greatest number of epitopes per sequence. Thus, an aspect is to avoid providing a peptide that is any longer than the amino terminus of the amino terminal epitope and the carboxyl terminus of the carboxyl terminal epitope in the peptide. When providing a multi-epitopic sequence, such as a sequence comprising nested epitopes, it is generally important to screen the sequence in order to insure that it does not have pathological or other deleterious biological properties.

6.) If a polypeptidic protein is created, or when creating a minigene, an objective is to generate the smallest peptide that encompasses the epitopes of interest. This principle is similar, if not the same as that employed when selecting a peptide comprising nested epitopes. However, with an artificial polypeptidic peptide, the size minimization objective is balanced against the need to integrate any spacer sequences between epitopes in the polypeptidic protein. Spacer amino acid residues can, for example, be introduced to avoid junctional epitopes (an epitope recognized by the immune system, not present in the target antigen, and only created by the man-made juxtaposition of epitopes), or to facilitate cleavage between epitopes and thereby enhance epitope presentation. Junctional epitopes are generally to be avoided because the recipient may generate an immune response to that non-native epitope. Of particular concern is a junctional epitope that is a "dominant epitope." A dominant epitope may lead to such a zealous response that immune responses to other epitopes are diminished or suppressed.

7.) Where the sequences of multiple variants of the same target protein are present, potential peptide epitopes can also be selected on the basis of their conservancy. For example, a criterion for conservancy may define that the entire sequence of an HLA class I binding peptide or the entire 9-mer core of a class II binding peptide be conserved in a designated percentage of the sequences evaluated for a specific protein antigen.

X.C.1. Minigene Vaccines

A number of different approaches are available which allow simultaneous delivery of multiple epitopes. Nucleic acids encoding the peptides of the invention are a particularly useful embodiment of the invention. Epitopes for inclusion in a minigene are preferably selected according to the guidelines set forth in the previous section. A preferred means of administering nucleic acids encoding the peptides of the invention uses minigene constructs encoding a peptide comprising one or multiple epitopes of the invention.

The use of multi-epitope minigenes is described below and in, Ishioka *et al.*, *J. Immunol.* 162:3915-3925, 1999; An, L. and Whitton, J. L., *J. Virol.* 71:2292, 1997; Thomson, S. A. *et al.*, *J. Immunol.* 157:822, 1996; Whitton, J. L. *et al.*, *J. Virol.* 67:348, 1993; Hanke, R. *et al.*, *Vaccine* 16:426, 1998. For example, a multi-epitope DNA plasmid encoding supermotif and/or motif-bearing epitopes derived 205P1B5, the PADRE® universal helper T cell epitope (or multiple HTL epitopes from 205P1B5), and an endoplasmic reticulum-translocating signal sequence can be engineered. A vaccine may also comprise epitopes that are derived from other TAAs.

The immunogenicity of a multi-epitopic minigene can be confirmed in transgenic mice to evaluate the magnitude of CTL induction responses against the epitopes tested. Further, the immunogenicity of DNA-

WO 03/020954

PCT/US02/27760

encoded epitopes *in vivo* can be correlated with the *in vitro* responses of specific CTL lines against target cells transfected with the DNA plasmid. Thus, these experiments can show that the minigene serves to both: 1.) generate a CTL response and 2.) that the induced CTLs recognized cells expressing the encoded epitopes.

For example, to create a DNA sequence encoding the selected epitopes (minigene) for expression in
 5 human cells, the amino acid sequences of the epitopes may be reverse translated. A human codon usage table can be used to guide the codon choice for each amino acid. These epitope-encoding DNA sequences may be directly adjoined, so that when translated, a continuous polypeptide sequence is created. To optimize expression and/or immunogenicity, additional elements can be incorporated into the minigene design. Examples of amino acid sequences that can be reverse translated and included in the minigene sequence include: HLA class I
 10 epitopes, HLA class II epitopes, antibody epitopes, a ubiquitination signal sequence, and/or an endoplasmic reticulum targeting signal. In addition, HLA presentation of CTL and HTL epitopes may be improved by including synthetic (e.g. poly-alanine) or naturally-occurring flanking sequences adjacent to the CTL or HTL epitopes; these larger peptides comprising the epitope(s) are within the scope of the invention.

The minigene sequence may be converted to DNA by assembling oligonucleotides that encode the plus
 15 and minus strands of the minigene. Overlapping oligonucleotides (30-100 bases long) may be synthesized, phosphorylated, purified and annealed under appropriate conditions using well known techniques. The ends of the oligonucleotides can be joined, for example, using T4 DNA ligase. This synthetic minigene, encoding the epitope polypeptide, can then be cloned into a desired expression vector.

Standard regulatory sequences well known to those of skill in the art are preferably included in the
 20 vector to ensure expression in the target cells. Several vector elements are desirable: a promoter with a downstream cloning site for minigene insertion; a polyadenylation signal for efficient transcription termination; an *E. coli* origin of replication; and an *E. coli* selectable marker (e.g. ampicillin or kanamycin resistance). Numerous promoters can be used for this purpose, e.g., the human cytomegalovirus (hCMV) promoter. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,580,859 and 5,589,466 for other suitable promoter sequences.

Additional vector modifications may be desired to optimize minigene expression and immunogenicity.
 25 In some cases, introns are required for efficient gene expression, and one or more synthetic or naturally-occurring introns could be incorporated into the transcribed region of the minigene. The inclusion of mRNA stabilization sequences and sequences for replication in mammalian cells may also be considered for increasing minigene expression.

Once an expression vector is selected, the minigene is cloned into the polylinker region downstream of
 30 the promoter. This plasmid is transformed into an appropriate *E. coli* strain, and DNA is prepared using standard techniques. The orientation and DNA sequence of the minigene, as well as all other elements included in the vector, are confirmed using restriction mapping and DNA sequence analysis. Bacterial cells harboring the correct plasmid can be stored as a master cell bank and a working cell bank.

In addition, immunostimulatory sequences (ISSs or CpGs) appear to play a role in the immunogenicity
 35 of DNA vaccines. These sequences may be included in the vector, outside the minigene coding sequence, if desired to enhance immunogenicity.

In some embodiments, a bi-cistronic expression vector which allows production of both the minigene-
 encoded epitopes and a second protein (included to enhance or decrease immunogenicity) can be used.

40 Examples of proteins or polypeptides that could beneficially enhance the immune response if co-expressed include cytokines (e.g., IL-2, IL-12, GM-CSF), cytokine-inducing molecules (e.g., LeIF), costimulatory

WO 03/020954

PCT/US02/27760

molecules, or for HTL responses, pan-DR binding proteins (PADRE™, Epimmune, San Diego, CA). Helper (HTL) epitopes can be joined to intracellular targeting signals and expressed separately from expressed CTL epitopes; this allows direction of the HTL epitopes to a cell compartment different than that of the CTL epitopes. If required, this could facilitate more efficient entry of HTL epitopes into the HLA class II pathway, thereby improving HTL induction. In contrast to HTL or CTL induction, specifically decreasing the immune response by co-expression of immunosuppressive molecules (e.g. TGF- β) may be beneficial in certain diseases.

Therapeutic quantities of plasmid DNA can be produced for example, by fermentation in *E. coli*, followed by purification. Aliquots from the working cell bank are used to inoculate growth medium, and grown to saturation in shaker flasks or a bioreactor according to well-known techniques. Plasmid DNA can be purified using standard bioseparation technologies such as solid phase anion-exchange resins supplied by QIAGEN, Inc. (Valencia, California). If required, supercoiled DNA can be isolated from the open circular and linear forms using gel electrophoresis or other methods.

Purified plasmid DNA can be prepared for injection using a variety of formulations. The simplest of these is reconstitution of lyophilized DNA in sterile phosphate-buffer saline (PBS). This approach, known as "naked DNA," is currently being used for intramuscular (IM) administration in clinical trials. To maximize the immunotherapeutic effects of minigene DNA vaccines, an alternative method for formulating purified plasmid DNA may be desirable. A variety of methods have been described, and new techniques may become available. Cationic lipids, glycolipids, and fusogenic liposomes can also be used in the formulation (see, e.g., as described by WO 93/24640; Mannino & Gould-Fogerite, *BioTechniques* 6(7): 682 (1988); U.S. Pat No. 5,279,833; WO 91/06309; and Felgner, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 84:7413 (1987). In addition, peptides and compounds referred to collectively as protective, interactive, non-condensing compounds (PINC) could also be complexed to purified plasmid DNA to influence variables such as stability, intramuscular dispersion, or trafficking to specific organs or cell types.

Target cell sensitization can be used as a functional assay for expression and HLA class I presentation of minigene-encoded CTL epitopes. For example, the plasmid DNA is introduced into a mammalian cell line that is suitable as a target for standard CTL chromium release assays. The transfection method used will be dependent on the final formulation. Electroporation can be used for "naked" DNA, whereas cationic lipids allow direct *in vitro* transfection. A plasmid expressing green fluorescent protein (GFP) can be co-transfected to allow enrichment of transfected cells using fluorescence activated cell sorting (FACS). These cells are then chromium-51 (^{51}Cr) labeled and used as target cells for epitope-specific CTL lines; cytotoxicity, detected by ^{51}Cr release, indicates both production of, and HLA presentation of, minigene-encoded CTL epitopes. Expression of HTL epitopes may be evaluated in an analogous manner using assays to assess HTL activity.

In vivo immunogenicity is a second approach for functional testing of minigene DNA formulations. Transgenic mice expressing appropriate human HLA proteins are immunized with the DNA product. The dose and route of administration are formulation dependent (e.g., IM for DNA in PBS, intraperitoneal (i.p.) for lipid-complexed DNA). Twenty-one days after immunization, splenocytes are harvested and restimulated for one week in the presence of peptides encoding each epitope being tested. Thereafter, for CTL effector cells, assays are conducted for cytotoxicity of peptide-loaded, ^{51}Cr -labeled target cells using standard techniques. Lysis of target cells that were sensitized by HLA loaded with peptide epitopes, corresponding to minigene-encoded epitopes, demonstrates DNA vaccine function for *in vivo* induction of CTLs. Immunogenicity of HTL epitopes is confirmed in transgenic mice in an analogous manner.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Alternatively, the nucleic acids can be administered using ballistic delivery as described, for instance, in U.S. Patent No. 5,204,253. Using this technique, particles comprised solely of DNA are administered. In a further alternative embodiment, DNA can be adhered to particles, such as gold particles.

Minigenes can also be delivered using other bacterial or viral delivery systems well known in the art, e.g., an expression construct encoding epitopes of the invention can be incorporated into a viral vector such as vaccinia.

X.C.2. Combinations of CTL Peptides with Helper Peptides

Vaccine compositions comprising CTL peptides of the invention can be modified, e.g., analoged, to provide desired attributes, such as improved serum half life, broadened population coverage or enhanced immunogenicity.

For instance, the ability of a peptide to induce CTL activity can be enhanced by linking the peptide to a sequence which contains at least one epitope that is capable of inducing a T helper cell response. Although a CTL peptide can be directly linked to a T helper peptide, often CTL epitope/HTL epitope conjugates are linked by a spacer molecule. The spacer is typically comprised of relatively small, neutral molecules, such as amino acids or amino acid mimetics, which are substantially uncharged under physiological conditions. The spacers are typically selected from, e.g., Ala, Gly, or other neutral spacers of nonpolar amino acids or neutral polar amino acids. It will be understood that the optionally present spacer need not be comprised of the same residues and thus may be a hetero- or homo-oligomer. When present, the spacer will usually be at least one or two residues, more usually three to six residues and sometimes 10 or more residues. The CTL peptide epitope can be linked to the T helper peptide epitope either directly or via a spacer either at the amino or carboxy terminus of the CTL peptide. The amino terminus of either the immunogenic peptide or the T helper peptide may be acylated.

In certain embodiments, the T helper peptide is one that is recognized by T helper cells present in a majority of a genetically diverse population. This can be accomplished by selecting peptides that bind to many, most, or all of the HLA class II molecules. Examples of such amino acid bind many HLA Class II molecules include sequences from antigens such as tetanus toxoid at positions 830-843 (QYIKANSKFIGITE; SEQ ID NO: 710), *Plasmodium falciparum* circumsporozoite (CS) protein at positions 378-398 (DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS; SEQ ID NO: 711), and *Streptococcus* 18kD protein at positions 116-131 (GAVDSILGGVATYGAA; SEQ ID NO: 712). Other examples include peptides bearing a DR 1-4-7 supermotif, or either of the DR3 motifs.

Alternatively, it is possible to prepare synthetic peptides capable of stimulating T helper lymphocytes, in a loosely HLA-restricted fashion, using amino acid sequences not found in nature (see, e.g., PCT publication WO 95/07707). These synthetic compounds called Pan-DR-binding epitopes (e.g., PADRE™, Epimmune, Inc., San Diego, CA) are designed to most preferably bind most HLA-DR (human HLA class II) molecules. For instance, a pan-DR-binding epitope peptide having the formula: aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 713), where "X" is either cyclohexylalanine, phenylalanine, or tyrosine, and a is either D-alanine or L-alanine, has been found to bind to most HLA-DR alleles, and to stimulate the response of T helper lymphocytes from most individuals, regardless of their HLA type. An alternative of a pan-DR binding epitope comprises all "L" natural amino acids and can be provided in the form of nucleic acids that encode the epitope.

HTL peptide epitopes can also be modified to alter their biological properties. For example, they can be modified to include D-amino acids to increase their resistance to proteases and thus extend their serum half life,

WO 03/020954

PCT/US02/27760

or they can be conjugated to other molecules such as lipids, proteins, carbohydrates, and the like to increase their biological activity. For example, a T helper peptide can be conjugated to one or more palmitic acid chains at either the amino or carboxyl termini.

X.C.3. Combinations of CTL Peptides with T Cell Priming Agents

5 In some embodiments it may be desirable to include in the pharmaceutical compositions of the invention at least one component which primes B lymphocytes or T lymphocytes. Lipids have been identified as agents capable of priming CTL *in vivo*. For example, palmitic acid residues can be attached to the ε- and α-amino groups of a lysine residue and then linked, *e.g.*, via one or more linking residues such as Gly, Gly-Gly-, Ser, Ser-Ser, or the like, to an immunogenic peptide. The lipidated peptide can then be administered either
10 directly in a micelle or particle, incorporated into a liposome, or emulsified in an adjuvant, *e.g.*, incomplete Freund's adjuvant. In a preferred embodiment, a particularly effective immunogenic composition comprises palmitic acid attached to ε- and α- amino groups of Lys, which is attached via linkage, *e.g.*, Ser-Ser, to the amino terminus of the immunogenic peptide.

As another example of lipid priming of CTL responses, *E. coli* lipoproteins, such as tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserine (P₃CSS) can be used to prime virus specific CTL when covalently attached to an appropriate peptide (*see, e.g.*, Deres, *et al.*, *Nature* 342:561, 1989). Peptides of the invention can be coupled to P₃CSS, for example, and the lipopeptide administered to an individual to specifically prime an immune response to the target antigen. Moreover, because the induction of neutralizing antibodies can also be primed with P₃CSS-conjugated epitopes, two such compositions can be combined to more effectively elicit both humoral and cell-mediated responses.
20

X.C.4. Vaccine Compositions Comprising DC Pulsed with CTL and/or HTL Peptides

An embodiment of a vaccine composition in accordance with the invention comprises *ex vivo* administration of a cocktail of epitope-bearing peptides to PBMC, or isolated DC therefrom, from the patient's blood. A pharmaceutical to facilitate harvesting of DC can be used, such as Progenipoietin™ (Pharmacia-Monsanto, St Louis, MO) or GM-CSF/IL-4. After pulsing the DC with peptides and prior to reinfusion into
25 patients, the DC are washed to remove unbound peptides. In this embodiment, a vaccine comprises peptide-pulsed DCs which present the pulsed peptide epitopes complexed with HLA molecules on their surfaces.

The DC can be pulsed *ex vivo* with a cocktail of peptides, some of which stimulate CTL responses to 205P1B5. Optionally, a helper T cell (HTL) peptide, such as a natural or artificial loosely restricted HLA Class II peptide, can be included to facilitate the CTL response. Thus, a vaccine in accordance with the invention is
30 used to treat a cancer which expresses or overexpresses 205P1B5.

X.D. Adoptive Immunotherapy

Antigenic 205P1B5-related peptides are used to elicit a CTL and/or HTL response *ex vivo*, as well. The resulting CTL or HTL cells, can be used to treat tumors in patients that do not respond to other conventional
35 forms of therapy, or will not respond to a therapeutic vaccine peptide or nucleic acid in accordance with the invention. *Ex vivo* CTL or HTL responses to a particular antigen are induced by incubating in tissue culture the patient's, or genetically compatible, CTL or HTL precursor cells together with a source of antigen-presenting cells (APC), such as dendritic cells, and the appropriate immunogenic peptide. After an appropriate incubation time (typically about 7-28 days), in which the precursor cells are activated and expanded into effector cells, the
40 cells are infused back into the patient, where they will destroy (CTL) or facilitate destruction (HTL) of their specific target cell (*e.g.*, a tumor cell). Transfected dendritic cells may also be used as antigen presenting cells.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

X.E. Administration of Vaccines for Therapeutic or Prophylactic Purposes

Pharmaceutical and vaccine compositions of the invention are typically used to treat and/or prevent a cancer that expresses or overexpresses 205P1B5. In therapeutic applications, peptide and/or nucleic acid compositions are administered to a patient in an amount sufficient to elicit an effective B cell, CTL and/or HTL response to the antigen and to cure or at least partially arrest or slow symptoms and/or complications. An amount adequate to accomplish this is defined as "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend on, e.g., the particular composition administered, the manner of administration, the stage and severity of the disease being treated, the weight and general state of health of the patient, and the judgment of the prescribing physician.

For pharmaceutical compositions, the immunogenic peptides of the invention, or DNA encoding them, are generally administered to an individual already bearing a tumor that expresses 205P1B5. The peptides or DNA encoding them can be administered individually or as fusions of one or more peptide sequences. Patients can be treated with the immunogenic peptides separately or in conjunction with other treatments, such as surgery, as appropriate.

For therapeutic use, administration should generally begin at the first diagnosis of 205P1B5-associated cancer. This is followed by boosting doses until at least symptoms are substantially abated and for a period thereafter. The embodiment of the vaccine composition (*i.e.*, including, but not limited to embodiments such as peptide cocktails, polypeptidic polypeptides, minigenes, or TAA-specific CTLs or pulsed dendritic cells) delivered to the patient may vary according to the stage of the disease or the patient's health status. For example, in a patient with a tumor that expresses 205P1B5, a vaccine comprising 205P1B5-specific CTL may be more efficacious in killing tumor cells in patient with advanced disease than alternative embodiments.

It is generally important to provide an amount of the peptide epitope delivered by a mode of administration sufficient to effectively stimulate a cytotoxic T cell response; compositions which stimulate helper T cell responses can also be given in accordance with this embodiment of the invention.

The dosage for an initial therapeutic immunization generally occurs in a unit dosage range where the lower value is about 1, 5, 50, 500, or 1,000 μ g and the higher value is about 10,000; 20,000; 30,000; or 50,000 μ g. Dosage values for a human typically range from about 500 μ g to about 50,000 μ g per 70 kilogram patient. Boosting dosages of between about 1.0 μ g to about 50,000 μ g of peptide pursuant to a boosting regimen over weeks to months may be administered depending upon the patient's response and condition as determined by measuring the specific activity of CTL and HTL obtained from the patient's blood. Administration should continue until at least clinical symptoms or laboratory tests indicate that the neoplasia, has been eliminated or reduced and for a period thereafter. The dosages, routes of administration, and dose schedules are adjusted in accordance with methodologies known in the art.

In certain embodiments, the peptides and compositions of the present invention are employed in serious disease states, that is, life-threatening or potentially life threatening situations. In such cases, as a result of the minimal amounts of extraneous substances and the relative nontoxic nature of the peptides in preferred compositions of the invention, it is possible and may be felt desirable by the treating physician to administer substantial excesses of these peptide compositions relative to these stated dosage amounts.

The vaccine compositions of the invention can also be used purely as prophylactic agents. Generally the dosage for an initial prophylactic immunization generally occurs in a unit dosage range where the lower value is about 1, 5, 50, 500, or 1000 μ g and the higher value is about 10,000; 20,000; 30,000; or 50,000 μ g.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Dosage values for a human typically range from about 500 µg to about 50,000 µg per 70 kilogram patient. This is followed by boosting dosages of between about 1.0 µg to about 50,000 µg of peptide administered at defined intervals from about four weeks to six months after the initial administration of vaccine. The immunogenicity of the vaccine can be assessed by measuring the specific activity of CTL and HTL obtained from a sample of the patient's blood.

The pharmaceutical compositions for therapeutic treatment are intended for parenteral, topical, oral, nasal, intrathecal, or local (e.g. as a cream or topical ointment) administration. Preferably, the pharmaceutical compositions are administered parentally, e.g., intravenously, subcutaneously, intradermally, or intramuscularly. Thus, the invention provides compositions for parenteral administration which comprise a solution of the immunogenic peptides dissolved or suspended in an acceptable carrier, preferably an aqueous carrier.

A variety of aqueous carriers may be used, e.g., water, buffered water, 0.8% saline, 0.3% glycine, hyaluronic acid and the like. These compositions may be sterilized by conventional, well-known sterilization techniques, or may be sterile filtered. The resulting aqueous solutions may be packaged for use as is, or lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile solution prior to administration.

The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as pH-adjusting and buffering agents, tonicity adjusting agents, wetting agents, preservatives, and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sorbitan monolaurate, triethanolamine oleate, etc.

The concentration of peptides of the invention in the pharmaceutical formulations can vary widely, i.e., from less than about 0.1%, usually at or at least about 2% to as much as 20% to 50% or more by weight, and will be selected primarily by fluid volumes, viscosities, etc., in accordance with the particular mode of administration selected.

A human unit dose form of a composition is typically included in a pharmaceutical composition that comprises a human unit dose of an acceptable carrier, in one embodiment an aqueous carrier, and is administered in a volume/quantity that is known by those of skill in the art to be used for administration of such compositions to humans (see, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th Edition, A. Gennaro, Editor, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985). For example a peptide dose for initial immunization can be from about 1 to about 50,000 µg, generally 100-5,000 µg, for a 70 kg patient. For example, for nucleic acids an initial immunization may be performed using an expression vector in the form of naked nucleic acid administered IM (or SC or ID) in the amounts of 0.5-5 mg at multiple sites. The nucleic acid (0.1 to 1000 µg) can also be administered using a gene gun. Following an incubation period of 3-4 weeks, a booster dose is then administered. The booster can be recombinant fowlpox virus administered at a dose of $5 \cdot 10^7$ to $5 \cdot 10^9$ pfu. For antibodies, a treatment generally involves repeated administration of the anti-205P1B5 antibody preparation, via an acceptable route of administration such as intravenous injection (IV), typically at a dose in the range of about 0.1 to about 10 mg/kg body weight. In general, doses in the range of 10-500 mg mAb per week are effective and well tolerated. Moreover, an initial loading dose of approximately 4 mg/kg patient body weight IV, followed by weekly doses of about 2 mg/kg IV of the anti-205P1B5 mAb preparation represents an acceptable dosing regimen. As appreciated by those of skill in the art, various factors can influence the ideal dose in a particular case. Such factors include, for example, half life of a composition, the binding affinity of an Ab, the immunogenicity of a substance, the degree of 205P1B5 expression in the patient, the extent of circulating shed 205P1B5 antigen, the desired steady-state concentration level, frequency of treatment, and the influence of

WO 03/020954

PCT/US02/27760

chemotherapeutic or other agents used in combination with the treatment method of the invention, as well as the health status of a particular patient.

In one embodiment, human unit dose forms of polynucleotides comprise a suitable dosage range or effective amount that provides any therapeutic effect. As appreciated by one of ordinary skill in the art a therapeutic effect depends on a number of factors, including the sequence of the polynucleotide, molecular weight of the polynucleotide and route of administration. Dosages are generally selected by the physician or other health care professional in accordance with a variety of parameters known in the art, such as severity of symptoms, history of the patient and the like. Generally, for a polynucleotide of about 20 bases, a dosage range may be selected from, for example, an independently selected lower limit such as about 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 300, 400 or 500 mg/kg up to an independently selected upper limit, greater than the lower limit, of about 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 or 10,000 mg/kg. For example, a dose may be about any of the following: 0.1 to 100 mg/kg, 0.1 to 50 mg/kg, 0.1 to 25 mg/kg, 0.1 to 10 mg/kg, 1 to 500 mg/kg, 100 to 400 mg/kg, 200 to 300 mg/kg, 1 to 100 mg/kg, 100 to 200 mg/kg, 300 to 400 mg/kg, 400 to 500 mg/kg, 500 to 1000 mg/kg, 500 to 5000 mg/kg, or 500 to 10,000 mg/kg. Generally, parenteral routes of administration may require higher doses of polynucleotide compared to more direct application to the nucleotide to diseased tissue, as do polynucleotides of increasing length.

In one embodiment, human unit dose forms of T-cells comprise a suitable dosage range or effective amount that provides any therapeutic effect. As appreciated by one of ordinary skill in the art, a therapeutic effect depends on a number of factors. Dosages are generally selected by the physician or other health care professional in accordance with a variety of parameters known in the art, such as severity of symptoms, history of the patient and the like. A dose may be about 10^4 cells to about 10^6 cells, about 10^6 cells to about 10^8 cells, about 10^8 to about 10^{11} cells, or about 10^8 to about 5×10^{10} cells. A dose may also be about 10^6 cells/m² to about 10^{10} cells/m², or about 10^6 cells/m² to about 10^8 cells/m².

Proteins(s) of the invention, and/or nucleic acids encoding the protein(s), can also be administered via liposomes, which may also serve to: 1) target the proteins(s) to a particular tissue, such as lymphoid tissue; 2) target selectively to diseases cells; or, 3) to increase the half-life of the peptide composition. Liposomes include emulsions, foams, micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, phospholipid dispersions, lamellar layers and the like. In these preparations, the peptide to be delivered is incorporated as part of a liposome, alone or in conjunction with a molecule which binds to a receptor prevalent among lymphoid cells, such as monoclonal antibodies which bind to the CD45 antigen, or with other therapeutic or immunogenic compositions. Thus, liposomes either filled or decorated with a desired peptide of the invention can be directed to the site of lymphoid cells, where the liposomes then deliver the peptide compositions. Liposomes for use in accordance with the invention are formed from standard vesicle-forming lipids, which generally include neutral and negatively charged phospholipids and a sterol, such as cholesterol. The selection of lipids is generally guided by consideration of, e.g., liposome size, acid lability and stability of the liposomes in the blood stream. A variety of methods are available for preparing liposomes, as described in, e.g., Szoka, *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980), and U.S. Patent Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, and 5,019,369.

For targeting cells of the immune system, a ligand to be incorporated into the liposome can include, e.g., antibodies or fragments thereof specific for cell surface determinants of the desired immune system cells. A liposome suspension containing a peptide may be administered intravenously, locally, topically, etc. in a dose

WO 03/020954

PCT/US02/27760

which varies according to, *inter alia*, the manner of administration, the peptide being delivered, and the stage of the disease being treated.

For solid compositions, conventional nontoxic solid carriers may be used which include, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talcum, cellulose, glucose, sucrose, magnesium carbonate, and the like. For oral administration, a pharmaceutically acceptable nontoxic composition is formed by incorporating any of the normally employed excipients, such as those carriers previously listed, and generally 10-95% of active ingredient, that is, one or more peptides of the invention, and more preferably at a concentration of 25%-75%.

For aerosol administration, immunogenic peptides are preferably supplied in finely divided form along with a surfactant and propellant. Typical percentages of peptides are about 0.01%-20% by weight, preferably about 1%-10%. The surfactant must, of course, be nontoxic, and preferably soluble in the propellant. Representative of such agents are the esters or partial esters of fatty acids containing from about 6 to 22 carbon atoms, such as caproic, octanoic, lauric, palmitic, stearic, linoleic, linolenic, olesteric and oleic acids with an aliphatic polyhydric alcohol or its cyclic anhydride. Mixed esters, such as mixed or natural glycerides may be employed. The surfactant may constitute about 0.1%-20% by weight of the composition, preferably about 0.25-5%. The balance of the composition is ordinarily propellant. A carrier can also be included, as desired, as with, e.g., lecithin for intranasal delivery.

XI.) Diagnostic and Prognostic Embodiments of 205P1B5.

As disclosed herein, 205P1B5 polynucleotides, polypeptides, reactive cytotoxic T cells (CTL), reactive helper T cells (HTL) and anti-polypeptide antibodies are used in well known diagnostic, prognostic and therapeutic assays that examine conditions associated with dysregulated cell growth such as cancer, in particular the cancers listed in Table I (see, e.g., both its specific pattern of tissue expression as well as its overexpression in certain cancers as described for example in Example 4).

205P1B5 can be analogized to a prostate associated antigen PSA, the archetypal marker that has been used by medical practitioners for years to identify and monitor the presence of prostate cancer (see, e.g., Merrill et al., J. Urol. 163(2): 503-5120 (2000); Polascik et al., J. Urol. Aug; 162(2):293-306 (1999) and Fortier et al., J. Nat. Cancer Inst. 91(19): 1635-1640(1999)). A variety of other diagnostic markers are also used in similar contexts including p53 and K-ras (see, e.g., Tulchinsky et al., Int J Mol Med 1999 Jul 4(1):99-102 and Minimoto et al., Cancer Detect Prev 2000;24(1):1-12). Therefore, this disclosure of the 205P1B5 polynucleotides and polypeptides (as well as the 205P1B5 polynucleotide probes and anti-205P1B5 antibodies used to identify the presence of these molecules) and their properties allows skilled artisans to utilize these molecules in methods that are analogous to those used, for example, in a variety of diagnostic assays directed to examining conditions associated with cancer.

Typical embodiments of diagnostic methods which utilize the 205P1B5 polynucleotides, polypeptides, reactive T cells and antibodies are analogous to those methods from well-established diagnostic assays which employ, e.g., PSA polynucleotides, polypeptides, reactive T cells and antibodies. For example, just as PSA polynucleotides are used as probes (for example in Northern analysis, see, e.g., Sharief et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 33(3):567-74(1994)) and primers (for example in PCR analysis, see, e.g., Okegawa et al., J. Urol. 163(4): 1189-1190 (2000)) to observe the presence and/or the level of PSA mRNAs in methods of monitoring PSA overexpression or the metastasis of prostate cancers, the 205P1B5 polynucleotides described herein can be

WO 03/020954

PCT/US02/27760

utilized in the same way to detect 205P1B5 overexpression or the metastasis of prostate and other cancers expressing this gene. Alternatively, just as PSA polypeptides are used to generate antibodies specific for PSA which can then be used to observe the presence and/or the level of PSA proteins in methods to monitor PSA protein overexpression (see, e.g., Stephan et al., *Urology* 55(4):560-3 (2000)) or the metastasis of prostate cells (see, e.g., Alanen et al., *Pathol. Res. Pract.* 192(3):233-7 (1996)), the 205P1B5 polypeptides described herein can be utilized to generate antibodies for use in detecting 205P1B5 overexpression or the metastasis of prostate cells and cells of other cancers expressing this gene.

Specifically, because metastases involves the movement of cancer cells from an organ of origin (such as the lung or prostate gland etc.) to a different area of the body (such as a lymph node), assays which examine a biological sample for the presence of cells expressing 205P1B5 polynucleotides and/or polypeptides can be used to provide evidence of metastasis. For example, when a biological sample from tissue that does not normally contain 205P1B5-expressing cells (lymph node) is found to contain 205P1B5-expressing cells such as the 205P1B5 expression seen in LAPC4 and LAPC9, xenografts isolated from lymph node and bone metastasis, respectively, this finding is indicative of metastasis.

Alternatively 205P1B5 polynucleotides and/or polypeptides can be used to provide evidence of cancer, for example, when cells in a biological sample that do not normally express 205P1B5 or express 205P1B5 at a different level are found to express 205P1B5 or have an increased expression of 205P1B5 (see, e.g., the 205P1B5 expression in the cancers listed in Table I and in patient samples etc. shown in the accompanying Figures). In such assays, artisans may further wish to generate supplementary evidence of metastasis by testing the biological sample for the presence of a second tissue restricted marker (in addition to 205P1B5) such as PSA, PSCA etc. (see, e.g., Alanen et al., *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-237 (1996)).

Just as PSA polynucleotide fragments and polynucleotide variants are employed by skilled artisans for use in methods of monitoring PSA, 205P1B5 polynucleotide fragments and polynucleotide variants are used in an analogous manner. In particular, typical PSA polynucleotides used in methods of monitoring PSA are probes or primers which consist of fragments of the PSA cDNA sequence. Illustrating this, primers used to PCR amplify a PSA polynucleotide must include less than the whole PSA sequence to function in the polymerase chain reaction. In the context of such PCR reactions, skilled artisans generally create a variety of different polynucleotide fragments that can be used as primers in order to amplify different portions of a polynucleotide of interest or to optimize amplification reactions (see, e.g., Caetano-Anolles, G. *Biotechniques* 25(3): 472-476, 478-480 (1998); Robertson et al., *Methods Mol. Biol.* 98:121-154 (1998)). An additional illustration of the use of such fragments is provided in Example 4, where a 205P1B5 polynucleotide fragment is used as a probe to show the expression of 205P1B5 RNAs in cancer cells. In addition, variant polynucleotide sequences are typically used as primers and probes for the corresponding mRNAs in PCR and Northern analyses (see, e.g., Sawai et al., *Fetal Diagn. Ther.* 1996 Nov-Dec 11(6):407-13 and *Current Protocols In Molecular Biology*, Volume 2, Unit 2, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995). Polynucleotide fragments and variants are useful in this context where they are capable of binding to a target polynucleotide sequence (e.g. the 205P1B5 polynucleotide shown in SEQ ID NO: 701) under conditions of high stringency.

Furthermore, PSA polypeptides which contain an epitope that can be recognized by an antibody or T cell that specifically binds to that epitope are used in methods of monitoring PSA. 205P1B5 polypeptide fragments and polypeptide analogs or variants can also be used in an analogous manner. This practice of using polypeptide fragments or polypeptide variants to generate antibodies (such as anti-PSA antibodies or T cells) is

WO 03/020954

PCT/US02/27760

typical in the art with a wide variety of systems such as fusion proteins being used by practitioners (see, e.g., Current Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995). In this context, each epitope(s) functions to provide the architecture with which an antibody or T cell is reactive. Typically, skilled artisans create a variety of different polypeptide fragments that can be used in order to generate immune responses specific for different portions of a polypeptide of interest (see, e.g., U.S. Patent No. 5,840,501 and U.S. Patent No. 5,939,533). For example it may be preferable to utilize a polypeptide comprising one of the 205P1B5 biological motifs discussed herein or a motif-bearing subsequence which is readily identified by one of skill in the art based on motifs available in the art. Polypeptide fragments, variants or analogs are typically useful in this context as long as they comprise an epitope capable of generating an antibody or T cell specific for a target polypeptide sequence (e.g. the 205P1B5 polypeptide shown in SEQ ID NO: 703).

As shown herein, the 205P1B5 polynucleotides and polypeptides (as well as the 205P1B5 polynucleotide probes and anti-205P1B5 antibodies or T cells used to identify the presence of these molecules) exhibit specific properties that make them useful in diagnosing cancers such as those listed in Table I. Diagnostic assays that measure the presence of 205P1B5 gene products, in order to evaluate the presence or onset of a disease condition described herein, such as prostate cancer, are used to identify patients for preventive measures or further monitoring, as has been done so successfully with PSA. Moreover, these materials satisfy a need in the art for molecules having similar or complementary characteristics to PSA in situations where, for example, a definite diagnosis of metastasis of prostatic origin cannot be made on the basis of a test for PSA alone (see, e.g., Alanen et al., Pathol. Res. Pract. 192(3): 233-237 (1996)), and consequently, materials such as 205P1B5 polynucleotides and polypeptides (as well as the 205P1B5 polynucleotide probes and anti-205P1B5 antibodies used to identify the presence of these molecules) must be employed to confirm metastases of prostatic origin.

Finally, in addition to their use in diagnostic assays, the 205P1B5 polynucleotides disclosed herein have a number of other utilities such as their use in the identification of oncogenic associated chromosomal abnormalities in the chromosomal region to which the 205P1B5 gene maps (see Example 3 below). Moreover, in addition to their use in diagnostic assays, the 205P1B5-related proteins and polynucleotides disclosed herein have other utilities such as their use in the forensic analysis of tissues of unknown origin (see, e.g., Takahama K Forensic Sci Int 1996 Jun 28;80(1-2): 63-9).

Additionally, 205P1B5-related proteins or polynucleotides of the invention can be used to treat a pathologic condition characterized by the over-expression of 205P1B5. For example, the amino acid or nucleic acid sequence of Figure 2 or Figure 3, or fragments of either, can be used to generate an immune response to the 205P1B5 antigen. Antibodies or other molecules that react with 205P1B5 can be used to modulate the function of this molecule, and thereby provide a therapeutic benefit.

XII.) Inhibition of 205P1B5 Protein Function

The invention includes various methods and compositions for inhibiting the binding of 205P1B5 to its binding partner or its association with other protein(s) as well as methods for inhibiting 205P1B5 function.

XII.A.) Inhibition of 205P1B5 With Intracellular Antibodies

In one approach, a recombinant vector that encodes single chain antibodies that specifically bind to 205P1B5 are introduced into 205P1B5 expressing cells via gene transfer technologies. Accordingly, the encoded single chain anti-205P1B5 antibody is expressed intracellularly, binds to 205P1B5 protein, and thereby

WO 03/020954

PCT/US02/27760

inhibits its function. Methods for engineering such intracellular single chain antibodies are well known. Such intracellular antibodies, also known as "intrabodies", are specifically targeted to a particular compartment within the cell, providing control over where the inhibitory activity of the treatment is focused. This technology has been successfully applied in the art (for review, see Richardson and Marasco, 1995, TIBTECH vol. 13).

5 Intrabodies have been shown to virtually eliminate the expression of otherwise abundant cell surface receptors (see, e.g., Richardson et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3137-3141; Beerli et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 23931-23936; Deshane et al., 1994, Gene Ther. 1: 332-337).

Single chain antibodies comprise the variable domains of the heavy and light chain joined by a flexible linker polypeptide, and are expressed as a single polypeptide. Optionally, single chain antibodies are expressed as a single chain variable region fragment joined to the light chain constant region. Well-known intracellular trafficking signals are engineered into recombinant polynucleotide vectors encoding such single chain antibodies in order to precisely target the intrabody to the desired intracellular compartment. For example, intrabodies targeted to the endoplasmic reticulum (ER) are engineered to incorporate a leader peptide and, optionally, a C-terminal ER retention signal, such as the KDEL amino acid motif. Intrabodies intended to exert activity in the nucleus are engineered to include a nuclear localization signal. Lipid moieties are joined to intrabodies in order to tether the intrabody to the cytosolic side of the plasma membrane. Intrabodies can also be targeted to exert function in the cytosol. For example, cytosolic intrabodies are used to sequester factors within the cytosol, thereby preventing them from being transported to their natural cellular destination.

In one embodiment, intrabodies are used to capture 205P1B5 in the nucleus, thereby preventing its activity within the nucleus. Nuclear targeting signals are engineered into such 205P1B5 intrabodies in order to achieve the desired targeting. Such 205P1B5 intrabodies are designed to bind specifically to a particular 205P1B5 domain. In another embodiment, cytosolic intrabodies that specifically bind to the 205P1B5 protein are used to prevent 205P1B5 from gaining access to the nucleus, thereby preventing it from exerting any biological activity within the nucleus (e.g., preventing 205P1B5 from forming transcription complexes with other factors).

In order to specifically direct the expression of such intrabodies to particular cells, the transcription of the intrabody is placed under the regulatory control of an appropriate tumor-specific promoter and/or enhancer. In order to target intrabody expression specifically to prostate, for example, the PSA promoter and/or promoter/enhancer can be utilized (See, for example, U.S. Patent No. 5,919,652 issued 6 July 1999).

30 XII.B.) Inhibition of 205P1B5 with Recombinant Proteins

In another approach, recombinant molecules bind to 205P1B5 and thereby inhibit 205P1B5 function. For example, these recombinant molecules prevent or inhibit 205P1B5 from accessing/binding to its binding partner(s) or associating with other protein(s). Such recombinant molecules can, for example, contain the reactive part(s) of a 205P1B5 specific antibody molecule. In a particular embodiment, the 205P1B5 binding domain of a 205P1B5 binding partner is engineered into a dimeric fusion protein, whereby the fusion protein comprises two 205P1B5 ligand binding domains linked to the Fc portion of a human IgG, such as human IgG1. Such IgG portion can contain, for example, the C_H2 and C_H3 domains and the hinge region, but not the C_H1 domain. Such dimeric fusion proteins are administered in soluble form to patients suffering from a cancer associated with the expression of 205P1B5, whereby the dimeric fusion protein specifically binds to 205P1B5 and blocks 205P1B5 interaction with a binding partner. Such dimeric fusion proteins are further combined into multimeric proteins using known antibody linking technologies.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

XII.C.) Inhibition of 205P1B5 Transcription or Translation

The present invention also comprises various methods and compositions for inhibiting the transcription of the 205P1B5 gene. Similarly, the invention also provides methods and compositions for inhibiting the translation of 205P1B5 mRNA into protein.

5 In one approach, a method of inhibiting the transcription of the 205P1B5 gene comprises contacting the 205P1B5 gene with a 205P1B5 antisense polynucleotide. In another approach, a method of inhibiting 205P1B5 mRNA translation comprises contacting the 205P1B5 mRNA with an antisense polynucleotide. In another approach, a 205P1B5 specific ribozyme is used to cleave the 205P1B5 message, thereby inhibiting translation. Such antisense and ribozyme based methods can also be directed to the regulatory regions of the 205P1B5 gene, such as the 205P1B5 promoter and/or enhancer elements. Similarly, proteins capable of inhibiting a 205P1B5 gene transcription factor are used to inhibit 205P1B5 mRNA transcription. The various polynucleotides and compositions useful in the aforementioned methods have been described above. The use of antisense and ribozyme molecules to inhibit transcription and translation is well known in the art.

10 Other factors that inhibit the transcription of 205P1B5 by interfering with 205P1B5 transcriptional activation are also useful to treat cancers expressing 205P1B5. Similarly, factors that interfere with 205P1B5 processing are useful to treat cancers that express 205P1B5. Cancer treatment methods utilizing such factors are also within the scope of the invention.

XII.D.) General Considerations for Therapeutic Strategies

Gene transfer and gene therapy technologies can be used to deliver therapeutic polynucleotide molecules to tumor cells synthesizing 205P1B5 (i.e., antisense, ribozyme, polynucleotides encoding intrabodies and other 205P1B5 inhibitory molecules). A number of gene therapy approaches are known in the art. Recombinant vectors encoding 205P1B5 antisense polynucleotides, ribozymes, factors capable of interfering with 205P1B5 transcription, and so forth, can be delivered to target tumor cells using such gene therapy approaches.

20 The above therapeutic approaches can be combined with any one of a wide variety of surgical, chemotherapy or radiation therapy regimens. The therapeutic approaches of the invention can enable the use of reduced dosages of chemotherapy (or other therapies) and/or less frequent administration, an advantage for all patients and particularly for those that do not tolerate the toxicity of the chemotherapeutic agent well.

The anti-tumor activity of a particular composition (e.g., antisense, ribozyme, intrabody), or a combination of such compositions, can be evaluated using various *in vitro* and *in vivo* assay systems. *In vitro* assays that evaluate therapeutic activity include cell growth assays, soft agar assays and other assays indicative of tumor promoting activity, binding assays capable of determining the extent to which a therapeutic composition will inhibit the binding of 205P1B5 to a binding partner, etc.

25 *In vivo*, the effect of a 205P1B5 therapeutic composition can be evaluated in a suitable animal model. For example, xenogenic prostate cancer models can be used, wherein human prostate cancer explants or passaged xenograft tissues are introduced into immune compromised animals, such as nude or SCID mice (Klein et al., 1997, Nature Medicine 3: 402-408). For example, PCT Patent Application WO98/16628, Sawyers et al., published April 23, 1998, describes various xenograft models of human prostate cancer capable of recapitulating the development of primary tumors, micrometastasis, and the formation of osteoblastic metastases characteristic of late stage disease. Efficacy can be predicted using assays that measure inhibition of tumor formation, tumor regression or metastasis, and the like. *In vivo* assays that evaluate the promotion of apoptosis are useful in evaluating therapeutic compositions. In one embodiment, xenografts from tumor bearing mice treated with the therapeutic

WO 03/020954

PCT/US02/27760

composition can be examined for the presence of apoptotic foci and compared to untreated control xenograft-bearing mice. The extent to which apoptotic foci are found in the tumors of the treated mice provides an indication of the therapeutic efficacy of the composition.

The therapeutic compositions used in the practice of the foregoing methods can be formulated into pharmaceutical compositions comprising a carrier suitable for the desired delivery method. Suitable carriers include any material that when combined with the therapeutic composition retains the anti-tumor function of the therapeutic composition and is generally non-reactive with the patient's immune system. Examples include, but are not limited to, any of a number of standard pharmaceutical carriers such as sterile phosphate buffered saline solutions, bacteriostatic water, and the like (see, generally, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal, Ed., 1980).

Therapeutic formulations can be solubilized and administered via any route capable of delivering the therapeutic composition to the tumor site. Potentially effective routes of administration include, but are not limited to, intravenous, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumor, intradermal, intraorgan, orthotopic, and the like. A preferred formulation for intravenous injection comprises the therapeutic composition in a solution of preserved bacteriostatic water, sterile unpreserved water, and/or diluted in polyvinylchloride or polyethylene bags containing 0.9% sterile Sodium Chloride for Injection, USP. Therapeutic protein preparations can be lyophilized and stored as sterile powders, preferably under vacuum, and then reconstituted in bacteriostatic water (containing for example, benzyl alcohol preservative) or in sterile water prior to injection.

Dosages and administration protocols for the treatment of cancers using the foregoing methods will vary with the method and the target cancer, and will generally depend on a number of other factors appreciated in the art.

XIII.) Kits

For use in the diagnostic and therapeutic applications described herein, kits are also within the scope of the invention. Such kits can comprise a carrier, package or container that is compartmentalized to receive one or more containers such as vials, tubes, and the like, each of the container(s) comprising one of the separate elements to be used in the method. For example, the container(s) can comprise a probe that is or can be detectably labeled. Such probe can be an antibody or polynucleotide specific for a 205P1B5-related protein or a 205P1B5 gene or message, respectively. Where the method utilizes nucleic acid hybridization to detect the target nucleic acid, the kit can also have containers containing nucleotide(s) for amplification of the target nucleic acid sequence and/or a container comprising a reporter-means, such as a biotin-binding protein, such as avidin or streptavidin, bound to a reporter molecule, such as an enzymatic, florescent, or radioisotope label. The kit can include all or part of the amino acid sequence of Figure 2 or Figure 3 or analogs thereof, or a nucleic acid molecules that encodes such amino acid sequences.

The kit of the invention will typically comprise the container described above and one or more other containers comprising materials desirable from a commercial and user standpoint, including buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

A label can be present on the container to indicate that the composition is used for a specific therapy or non-therapeutic application, and can also indicate directions for either *in vivo* or *in vitro* use, such as those described above. Directions and or other information can also be included on an insert which is included with the kit.

EXAMPLES

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Various aspects of the invention are further described and illustrated by way of the several examples that follow, none of which are intended to limit the scope of the invention.

Example 1: SSH-Generated Isolation of a cDNA Fragment of the 205P1B5 Gene

To isolate genes that are over-expressed in prostate cancer we used the Suppression Subtractive Hybridization (SSH) procedure using cDNA derived from prostate cancer tissues. The 205P1B5 SSH cDNA sequence was derived from a subtraction consisting of a prostate cancer pool (patients with Gleason scores 6 and 7) minus a mix of cDNAs derived from nine normal tissues (stomach, skeletal muscle, lung, brain, liver, kidney, pancreas, small intestine, and heart). By RT-PCR, the 205P1B5 cDNA was identified as highly expressed in the prostate cancer tissue pool, prostate cancer xenograft pool (LAPC4-AD, LAPC4-AI, LAPC9-AD, LAPC9-AI), and in the metastasis cancer pool with no expression observed in the vital tissue pools consisting of normal liver, kidney, lung, stomach, pancreas, and colon.

The 205P1B5 SSH cDNA sequence of 289 bp matched the Homo sapiens cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2 (neuronal; CHRNA2) with 221/225 (98%) identities (Figure 1). The full length 205P1B5/CHRNA2 cDNA and ORF is described in Figure 2 with the protein sequence listed in Figure 3.

Materials and Methods

RNA Isolation:

Tumor tissues were homogenized in Trizol reagent (Life Technologies, Gibco BRL) using 10 ml/g tissue or 10 ml/ 10⁶ cells to isolate total RNA. Poly A RNA was purified from total RNA using Qiagen's Oligotex mRNA Mini and Midi kits. Total and mRNA were quantified by spectrophotometric analysis (O.D. 260/280 nm) and analyzed by gel electrophoresis.

Oligonucleotides:

The following HPLC purified oligonucleotides were used.

DPNCDN (cDNA synthesis primer):

5'TTTTGATCAAGCTT₃₀3' (SEQ ID NO: 714)

Adaptor 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGCAG3' (SEQ ID NO: 715)

3'GGCCCGTCCTAG5' (SEQ ID NO: 716)

Adaptor 2:

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGTGCGGCCGAG3' (SEQ ID NO: 717)

3'CGGCTCCTAG5' (SEQ ID NO: ____)

PCR primer 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (SEQ ID NO: ____)

Nested primer (NP1):

5'TCGAGCGGCCCGCCGGCAGGA3' (SEQ ID NO: ____)

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Nested primer (NP)2:

5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3' (SEQ ID NO: ____)

Suppression Subtractive Hybridization:

5 Suppression Subtractive Hybridization (SSH) was used to identify cDNAs corresponding to genes that may be differentially expressed in prostate cancer. The SSH reaction utilized cDNA from prostate cancer patients with Gleason scores of 6 and 7. The gene 205P1B5 was derived from a prostate cancer pool, Gleason 6, 7 minus nine normal tissues. The SSH DNA sequence (Figure 1) was identified.

10 The cDNA derived from nine normal tissues (stomach, skeletal muscle, lung, brain, liver, kidney, pancreas, small intestine, and heart) was used as the source of the "driver" cDNA, while the cDNA from a pool of prostate cancer patients with Gleason scores 6 and 7 was used as the source of the "tester" cDNA. Double stranded cDNAs corresponding to tester and driver cDNAs were synthesized from 2 µg of poly(A)⁺ RNA isolated from the relevant tissue, as described above, using CLONTECH's PCR-Select cDNA Subtraction Kit and 1 ng of oligonucleotide DPNCDN as primer. First- and second-strand synthesis were carried out as described in the Kit's user manual protocol (CLONTECH Protocol No. PT1117-1, Catalog No. K1804-1). The

15 resulting cDNA was digested with Dpn II for 3 hrs at 37°C. Digested cDNA was extracted with phenol/chloroform (1:1) and ethanol precipitated.

20 Tester cDNA was generated by diluting 1 µl of Dpn II digested cDNA from the relevant tissue source (see above) (400 ng) in 5 µl of water. The diluted cDNA (2 µl, 160 ng) was then ligated to 2 µl of Adaptor 1 and Adaptor 2 (10 µM), in separate ligation reactions, in a total volume of 10 µl at 16°C overnight, using 400 u of T4 DNA ligase (CLONTECH). Ligation was terminated with 1 µl of 0.2 M EDTA and heating at 72°C for 5 min.

25 The first hybridization was performed by adding 1.5 µl (600 ng) of driver cDNA to each of two tubes containing 1.5 µl (20 ng) Adaptor 1- and Adaptor 2- ligated tester cDNA. In a final volume of 4 µl, the samples were overlaid with mineral oil, denatured in an MJ Research thermal cycler at 98°C for 1.5 minutes, and then were allowed to hybridize for 8 hrs at 68°C. The two hybridizations were then mixed together with an additional 1 µl of fresh denatured driver cDNA and were allowed to hybridize overnight at 68°C. The second hybridization was then diluted in 200 µl of 20 mM Hepes, pH 8.3, 50 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, heated at 70°C for 7 min. and stored at -20°C.

PCR Amplification, Cloning and Sequencing of Gene Fragments Generated from SSH:

30 To amplify gene fragments resulting from SSH reactions, two PCR amplifications were performed. In the primary PCR reaction 1 µl of the diluted final hybridization mix was added to 1 µl of PCR primer 1 (10 µM), 0.5 µl dNTP mix (10 µM), 2.5 µl 10 x reaction buffer (CLONTECH) and 0.5 µl 50 x Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH) in a final volume of 25 µl. PCR 1 was conducted using the following conditions: 75°C for 5 min., 94°C for 25 sec., then 27 cycles of 94°C for 10 sec, 66°C for 30 sec, 72°C for 1.5 min. Five

35 separate primary PCR reactions were performed for each experiment. The products were pooled and diluted 1:10 with water. For the secondary PCR reaction, 1 µl from the pooled and diluted primary PCR reaction was added to the same reaction mix as used for PCR 1, except that primers NP1 and NP2 (10 µM) were used instead of PCR primer 1. PCR 2 was performed using 10-12 cycles of 94°C for 10 sec, 68°C for 30 sec, and 72°C for 1.5 minutes. The PCR products were analyzed using 2% agarose gel electrophoresis.

40 The PCR products were inserted into pCR2.1 using the T/A vector cloning kit (Invitrogen). Transformed *E. coli* were subjected to blue/white and ampicillin selection. White colonies were picked and

WO 03/020954

PCT/US02/27760

arrayed into 96 well plates and were grown in liquid culture overnight. To identify inserts, PCR amplification was performed on 1 ml of bacterial culture using the conditions of PCR1 and NP1 and NP2 as primers. PCR products were analyzed using 2% agarose gel electrophoresis.

Bacterial clones were stored in 20% glycerol in a 96 well format. Plasmid DNA was prepared, sequenced, and subjected to nucleic acid homology searches of the GenBank, dBest, and NCI-CGAP databases.

RT-PCR Expression Analysis:

First strand cDNAs can be generated from 1 µg of mRNA with oligo (dT)12-18 priming using the Gibco-BRL Superscript Preamplification system. The manufacturer's protocol was used which included an incubation for 50 min at 42°C with reverse transcriptase followed by RNase H treatment at 37°C for 20 min. After completing the reaction, the volume can be increased to 200 µl with water prior to normalization. First strand cDNAs from 16 different normal human tissues can be obtained from Clontech.

Normalization of the first strand cDNAs from multiple tissues was performed by using the primers 5'-atctggcgcgctctgctgcacaa3' (SEQ ID NO: ____) and 5'-agccacacgcagctcattgtagaagg 3' (SEQ ID NO: ____) to amplify β-actin. First strand cDNA (5 µl) were amplified in a total volume of 50 µl containing 0.4 µM primers, 0.2 µM each dNTPs, 1XPCR buffer (Clontech, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH8.3) and 1X Klenaq DNA polymerase (Clontech). Five µl of the PCR reaction can be removed at 18, 20, and 22 cycles and used for agarose gel electrophoresis. PCR was performed using an MJ Research thermal cycler under the following conditions: Initial denaturation can be at 94°C for 15 sec, followed by a 18, 20, and 22 cycles of 94°C for 15, 65°C for 2 min, 72°C for 5 sec. A final extension at 72°C was carried out for 2 min. After agarose gel electrophoresis, the band intensities of the 283 b.p. β-actin bands from multiple tissues were compared by visual inspection. Dilution factors for the first strand cDNAs were calculated to result in equal β-actin band intensities in all tissues after 22 cycles of PCR. Three rounds of normalization can be required to achieve equal band intensities in all tissues after 22 cycles of PCR.

To determine expression levels of the 205P1B5 gene, 5 µl of normalized first strand cDNA were analyzed by PCR using 26, and 30 cycles of amplification. Semi-quantitative expression analysis can be achieved by comparing the PCR products at cycle numbers that give light band intensities.

A typical RT-PCR expression analysis is shown in Figure 10. RT-PCR expression analysis was performed on first strand cDNAs generated using pools of tissues from multiple samples. The cDNAs were shown to be normalized using beta-actin PCR.

Example 2: Full Length Cloning of 205P1B5

To isolate genes that are involved in prostate cancer, an experiment was conducted using prostate cancer patients with Gleason scores 6 and 7.

The gene 205P1B5 was derived from a prostate cancer pool minus nine normal tissues subtraction. The SSH DNA sequence (Figure 1) was designated 205P1B5. cDNA clone 205P1B5-clone 1 consisting of the CHRNA2 ORF was identified from normal prostate cDNA. A single base pair variation was identified at position 760 with an A instead of a G when compared to the CHRNA2 sequence.

Example 3: Chromosomal Localization

Chromosomal localization can implicate genes in disease pathogenesis. Several chromosome mapping approaches are available in the art, including fluorescent *in situ* hybridization (FISH), human/hamster radiation

WO 03/020954

PCT/US02/27760

hybrid (RH) panels (Walter et al., 1994; Nature Genetics 7:22; Research Genetics, Huntsville AL), human-rodent somatic cell hybrid panels, such as is available from the Coriell Institute (Camden, New Jersey), and genomic viewers utilizing BLAST homologies to sequenced and mapped genomic clones (NCBI, Bethesda, Maryland).

205P1B5 maps to chromosome 8p21-8p12, using 205P1B5 sequence and the NCBI BLAST tool:

5 (world wide web URL ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?T=HsBlast.html&&ORG=Hs).

This region has been implicated in prostate cancer (Xu et al., Am J Hum Genet 2001 Aug;69(2):341-350).

Example 4: Expression analysis of 205P1B5 in normal tissues and patient specimens

10 Analysis of 205P1B5 by RT-PCR is shown in Figure 10. First strand cDNA was prepared from vital pool 1 (VP: liver, lung and kidney), vital pool 2 (VP2: pancreas, colon and stomach), prostate xenograft pool (LAPC-4AD, LAPC-4AI, LAPC-9AD, LAPC-9AI), prostate cancer pool, and cancer metastasis pool. Normalization was performed by PCR using primers to actin and GAPDH. Semi-quantitative PCR, using primers to 205P1B5, was performed at 26 and 30 cycles of amplification. Results show expression of 205P1B5

15 in prostate cancer pool, prostate xenograft pool, cancer metastasis pool, but not in VP1 and VP2.

Extensive Northern blot analysis of 205P1B5 in 16 human normal tissues demonstrated that 205P1B5 expression is tissue-restricted (Figure 11). Two multiple tissue northern blots (Clontech) with 2 µg of mRNA/lane, were probed with 205P1B5 sequence. Size standards in kilobases (kb) are indicated on the side. An approximately 5 kb transcript was detected in prostate and brain but not in any other normal tissues. A larger

20 205P1B5 transcript of approximately 7.5 kb was only detected in liver.

Expression of 205P1B5 was assayed on a pool of 3 tumors isolated from prostate cancer patients (PCP) and on normal tissues (Figure 12). Northern blots with 10 µg of total RNA/lane were probed with 205P1B5 sequence. Size standards in kilobases (kb) are indicated on the side. 205P1B5 expression was seen in the prostate cancer pool and the normal prostate but not in normal bladder (NB), normal kidney (NK), normal colon (NC). Northern blot analysis on individual prostate cancer patient specimens and prostate cancer xenografts is shown in Figure 13. RNA was extracted from prostate cancer xenografts (LAPC-4AD, LAPC-4AI, LAPC-9AD, LAPC-9AI), prostate cancer cell line PC3, normal prostate (N), prostate tumors (T) and normal adjacent tissue (Nat) derived from prostate cancer patients. Northern blot with 10 µg of total RNA/lane was probed with 205P1B5 sequence. Size standards in kilobases (kb) are indicated on the side. Results show expression of

30 205P1B5 in all prostate tumor specimens tested. Expression is also seen in 3 of the 4 xenografts, but not in the PC3 cell line.

The restricted expression of 205P1B5 in normal tissues and the expression detected in the cancers listed in Table I indicate that 205P1B5 is a therapeutic and prophylactic target and a diagnostic and prognostic marker for human cancer.

35 Figure 15 shows expression of 205P1B5 in cancer metastasis patient specimens. RNA was extracted from prostate cancer metastasis to lymph node obtained from two different patients, as well as from normal bladder (NB), normal kidney (NK), normal lung (NL), normal breast (NBr), normal ovary (NO), and normal pancreas (NPa). Northern blots with 10 µg of total RNA/lane were probed with 205P1B5 sequence. Size standards in kilobases (kb) are indicated on the side. The results show expression of 205P1B5 in both cancer

40 metastasis samples but not in the normal tissues tested.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Example 5: Production of Recombinant 205P1B5 in Prokaryotic Systems

To express recombinant 205P1B5 in prokaryotic cells, the full or partial length 205P1B5 cDNA sequences can be cloned into any one of a variety of expression vectors known in the art. One or more of the following regions of 205P1B5 are expressed in these constructs, amino acids 1 to 529; or any 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 or more contiguous amino acids from 205P1B5, variants, or analogs thereof.

A. *In vitro* transcription and translation constructs:

pCRII: To generate 205P1B5 sense and anti-sense RNA probes for RNA *in situ* investigations, pCRII constructs (Invitrogen, Carlsbad CA) are generated encoding either all or fragments of the 205P1B5 cDNA. The pCRII vector has Sp6 and T7 promoters flanking the insert to drive the transcription of 205P1B5 RNA for use as probes in RNA *in situ* hybridization experiments. These probes are used to analyze the cell and tissue expression of 205P1B5 at the RNA level. Transcribed 205P1B5 RNA representing the cDNA amino acid coding region of the 205P1B5 gene is used in *in vitro* translation systems such as the Trx™ Coupled Reticulolysate System (Promega, Corp., Madison, WI) to synthesize 205P1B5 protein.

B. Bacterial Constructs:

pGEX Constructs: To generate recombinant 205P1B5 proteins in bacteria that are fused to the Glutathione S-transferase (GST) protein, all or parts of the 205P1B5 cDNA protein coding sequence are fused to the GST gene by cloning into pGEX-6P-1 or any other GST- fusion vector of the pGEX family (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). These constructs allow controlled expression of recombinant 205P1B5 protein sequences with GST fused at the amino-terminus and a six histidine epitope (6X His) at the carboxyl-terminus. The GST and 6X His tags permit purification of the recombinant fusion protein from induced bacteria with the appropriate affinity matrix and allow recognition of the fusion protein with anti-GST and anti-His antibodies. The 6X His tag is generated by adding 6 histidine codons to the cloning primer at the 3' end, e.g., of the open reading frame (ORF). A proteolytic cleavage site, such as the PreScission™ recognition site in pGEX-6P-1, may be employed such that it permits cleavage of the GST tag from 205P1B5-related protein. The ampicillin resistance gene and pBR322 origin permits selection and maintenance of the pGEX plasmids in *E. coli*.

pMAL Constructs: To generate, in bacteria, recombinant 205P1B5 proteins that are fused to maltose-binding protein (MBP), all or parts of the 205P1B5 cDNA protein coding sequence are fused to the MBP gene by cloning into the pMAL-c2X and pMAL-p2X vectors (New England Biolabs, Beverly, MA). These constructs allow controlled expression of recombinant 205P1B5 protein sequences with MBP fused at the amino-terminus and a 6X His epitope tag at the carboxyl-terminus. The MBP and 6X His tags permit purification of the recombinant protein from induced bacteria with the appropriate affinity matrix and allow recognition of the fusion protein with anti-MBP and anti-His antibodies. The 6X His epitope tag is generated by adding 6 histidine codons to the 3' cloning primer. A Factor Xa recognition site permits cleavage of the pMAL tag from 205P1B5. The pMAL-c2X and pMAL-p2X vectors are optimized to express the recombinant protein in the cytoplasm or periplasm respectively. Periplasm expression enhances folding of proteins with disulfide bonds.

pET Constructs: To express 205P1B5 in bacterial cells, all or parts of the 205P1B5 cDNA protein coding sequence are cloned into the pET family of vectors (Novagen, Madison, WI). These vectors allow tightly controlled expression of recombinant 205P1B5 protein in bacteria with and without fusion to proteins that enhance solubility, such as NusA and thioredoxin (Trx), and epitope tags, such as 6X His and S-Tag™ that aid

WO 03/020954

PCT/US02/27760

purification and detection of the recombinant protein. For example, constructs are made utilizing pET NusA fusion system 43.1 such that regions of the 205P1B5 protein are expressed as amino-terminal fusions to NusA.

C. Yeast Constructs:

pESC Constructs: To express 205P1B5 in the yeast species *Saccharomyces cerevisiae* for generation of recombinant protein and functional studies, all or parts of the 205P1B5 cDNA protein coding sequence are cloned into the pESC family of vectors each of which contain 1 of 4 selectable markers, HIS3, TRP1, LEU2, and URA3 (Stratagene, La Jolla, CA). These vectors allow controlled expression from the same plasmid of up to 2 different genes or cloned sequences containing either Flag™ or Myc epitope tags in the same yeast cell. This system is useful to confirm protein-protein interactions of 205P1B5. In addition, expression in yeast yields similar post-translational modifications, such as glycosylations and phosphorylations, that are found when expressed in eukaryotic cells.

pESP Constructs: To express 205P1B5 in the yeast species *Saccharomyces pombe*, all or parts of the 205P1B5 cDNA protein coding sequence are cloned into the pESP family of vectors. These vectors allow controlled high level of expression of a 205P1B5 protein sequence that is fused at either the amino terminus or at the carboxyl terminus to GST which aids purification of the recombinant protein. A Flag™ epitope tag allows detection of the recombinant protein with anti-Flag™ antibody.

Example 6: Production of Recombinant 205P1B5 in Eukaryotic Systems

A. Mammalian Constructs:

To express recombinant 205P1B5 in eukaryotic cells, the full or partial length 205P1B5 cDNA sequences can be cloned into any one of a variety of expression vectors known in the art. One or more of the following regions of 205P1B5 are expressed in these constructs, amino acids 1 to 529; or any 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 or more contiguous amino acids from 205P1B5, variants, or analogs thereof.

The constructs can be transfected into any one of a wide variety of mammalian cells such as 293T cells. Transfected 293T cell lysates can be probed with the anti-205P1B5 polyclonal serum, described herein.

pcDNA4/HisMax Constructs: To express 205P1B5 in mammalian cells, the 205P1B5 ORF, or portions thereof, of 205P1B5 are cloned into pcDNA4/HisMax Version A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Protein expression is driven from the cytomegalovirus (CMV) promoter and the SP16 translational enhancer. The recombinant protein has Xpress™ and six histidine (6X His) epitopes fused to the amino-terminus. The pcDNA4/HisMax vector also contains the bovine growth hormone (BGH) polyadenylation signal and transcription termination sequence to enhance mRNA stability along with the SV40 origin for episomal replication and simple vector rescue in cell lines expressing the large T antigen. The Zeocin resistance gene allows for selection of mammalian cells expressing the protein and the ampicillin resistance gene and ColE1 origin permits selection and maintenance of the plasmid in *E. coli*.

pcDNA3.1/MycHis Constructs: To express 205P1B5 in mammalian cells, the 205P1B5 ORF, or portions thereof, of 205P1B5 with a consensus Kozak translation initiation site are cloned into pcDNA3.1/MycHis Version A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Protein expression is driven from the cytomegalovirus (CMV) promoter. The recombinant proteins have the myc epitope and 6X His epitope fused to the carboxyl-terminus. The pcDNA3.1/MycHis vector also contains the bovine growth hormone (BGH) polyadenylation signal and transcription termination sequence to enhance mRNA stability, along with the SV40

WO 03/020954

PCT/US02/27760

origin for episomal replication and simple vector rescue in cell lines expressing the large T antigen. The Neomycin resistance gene can be used, as it allows for selection of mammalian cells expressing the protein and the ampicillin resistance gene and ColE1 origin permits selection and maintenance of the plasmid in *E. coli*.

pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO Construct: To express 205P1B5 in mammalian cells and to allow
 5 detection of the recombinant proteins using fluorescence, the 205P1B5 ORF, or portions thereof, of 205P1B5 with a consensus Kozak translation initiation site are cloned into pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA). Protein expression is driven from the cytomegalovirus (CMV) promoter. The recombinant proteins have the Green Fluorescent Protein (GFP) fused to the carboxyl-terminus facilitating non-invasive, in vivo detection and cell biology studies. The pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO vector also contains the bovine growth hormone (BGH)
 10 polyadenylation signal and transcription termination sequence to enhance mRNA stability along with the SV40 origin for episomal replication and simple vector rescue in cell lines expressing the large T antigen. The Neomycin resistance gene allows for selection of mammalian cells that express the protein, and the ampicillin resistance gene and ColE1 origin permits selection and maintenance of the plasmid in *E. coli*. Additional constructs with an amino-terminal GFP fusion are made in pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO spanning the entire
 15 length of the 205P1B5 proteins.

pAPtag: The 205P1B5 ORF, or portions thereof, of 205P1B5 are cloned into pAPtag-5 (GenHunter Corp. Nashville, TN). This construct generates an alkaline phosphatase fusion at the carboxyl-terminus of the 205P1B5 proteins while fusing the IgGκ signal sequence to the amino-terminus. Constructs are also generated
 20 in which alkaline phosphatase with an amino-terminal IgGκ signal sequence is fused to the amino-terminus of 205P1B5 proteins. The resulting recombinant 205P1B5 proteins are optimized for secretion into the media of transfected mammalian cells and can be used to identify proteins such as ligands or receptors that interact with the 205P1B5 proteins. Protein expression is driven from the CMV promoter and the recombinant proteins also contain myc and 6X His epitopes fused at the carboxyl-terminus that facilitates detection and purification. The Zeocin resistance gene present in the vector allows for selection of mammalian cells expressing the recombinant
 25 protein and the ampicillin resistance gene permits selection of the plasmid in *E. coli*.

pTag5: The 205P1B5 ORF, or portions thereof, of 205P1B5 are cloned into pTag-5. This vector is similar to pAPtag but without the alkaline phosphatase fusion. This construct generates 205P1B5 protein with an amino-terminal IgGκ signal sequence and myc and 6X His epitope tags at the carboxyl-terminus that facilitate
 30 detection and affinity purification. The resulting recombinant 205P1B5 protein is optimized for secretion into the media of transfected mammalian cells, and is used as immunogen or ligand to identify proteins such as ligands or receptors that interact with the 205P1B5 proteins. Protein expression is driven from the CMV promoter. The Zeocin resistance gene present in the vector allows for selection of mammalian cells expressing the protein, and the ampicillin resistance gene permits selection of the plasmid in *E. coli*.

pSecFc: The 205P1B5 ORF, or portions thereof, of 205P1B5 are also cloned into pSecFc. The pSecFc
 35 vector was assembled by cloning the human immunoglobulin G1 (IgG) Fc (hinge, CH2, CH3 regions) into pSecTag2 (Invitrogen, California). This construct generates an IgG1 Fc fusion at the carboxyl-terminus of the 205P1B5 proteins, while fusing the IgGκ signal sequence to N-terminus. 205P1B5 fusions utilizing the murine IgG1 Fc region are also used. The resulting recombinant 205P1B5 proteins are optimized for secretion into the media of transfected mammalian cells, and can be used as immunogens or to identify proteins such as ligands or
 40 receptors that interact with the 205P1B5 protein. Protein expression is driven from the CMV promoter. The

WO 03/020954

PCT/US02/27760

hygromycin resistance gene present in the vector allows for selection of mammalian cells that express the recombinant protein, and the ampicillin resistance gene permits selection of the plasmid in *E. coli*.

pSR α Constructs: To generate mammalian cell lines that express 205P1B5 constitutively, 205P1B5 ORF, or portions thereof, of 205P1B5 are cloned into pSR α constructs. Amphotropic and ecotropic retroviruses are generated by transfection of pSR α constructs into the 293T-10A1 packaging line or co-transfection of pSR α and a helper plasmid (containing deleted packaging sequences) into the 293 cells, respectively. The retrovirus is used to infect a variety of mammalian cell lines, resulting in the integration of the cloned gene, 205P1B5, into the host cell-lines. Protein expression is driven from a long terminal repeat (LTR). The Neomycin resistance gene present in the vector allows for selection of mammalian cells that express the protein, and the ampicillin resistance gene and ColE1 origin permit selection and maintenance of the plasmid in *E. coli*. The retroviral vectors can thereafter be used for infection and generation of various cell lines using, for example, PC3, NIH 3T3, TsuPr1, 293 or rat-1 cells.

Additional pSR α constructs are made that fuse an epitope tag such as the FLAGTM tag to the carboxyl-terminus of 205P1B5 sequences to allow detection using anti-Flag antibodies. For example, the FLAGTM sequence 5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3' is added to cloning primer at the 3' end of the ORF. Additional pSR α constructs are made to produce both amino-terminal and carboxyl-terminal GFP and myc/GX His fusion proteins of the full-length 205P1B5 proteins.

Additional Viral Vectors: Additional constructs are made for viral-mediated delivery and expression of 205P1B5. High virus titer leading to high level expression of 205P1B5 is achieved in viral delivery systems such as adenoviral vectors and herpes amplicon vectors. The 205P1B5 coding sequences or fragments thereof are amplified by PCR and subcloned into the AdEasy shuttle vector (Stratagene). Recombination and virus packaging are performed according to the manufacturer's instructions to generate adenoviral vectors. Alternatively, 205P1B5 coding sequences or fragments thereof are cloned into the HSV-1 vector (Imgenex) to generate herpes viral vectors. The viral vectors are thereafter used for infection of various cell lines such as PC3, NIH 3T3, 293 or rat-1 cells.

Regulated Expression Systems: To control expression of 205P1B5 in mammalian cells, coding sequences of 205P1B5, or portions thereof, are cloned into regulated mammalian expression systems such as the T-Rex System (Invitrogen), the GeneSwitch System (Invitrogen) and the tightly-regulated Ecdysone System (Stratagene). These systems allow the study of the temporal and concentration dependent effects of recombinant 205P1B5. These vectors are thereafter used to control expression of 205P1B5 in various cell lines such as PC3, NIH 3T3, 293 or rat-1 cells.

B. Baculovirus Expression Systems

To generate recombinant 205P1B5 proteins in a baculovirus expression system, 205P1B5 ORF, or portions thereof, are cloned into the baculovirus transfer vector pBlueBac 4.5 (Invitrogen), which provides a His-tag at the N-terminus. Specifically, pBlueBac-205P1B5 is co-transfected with helper plasmid pBac-N-Blue (Invitrogen) into SF9 (*Spodoptera frugiperda*) insect cells to generate recombinant baculovirus (see Invitrogen instruction manual for details). Baculovirus is then collected from cell supernatant and purified by plaque assay.

Recombinant 205P1B5 protein is then generated by infection of HighFive insect cells (Invitrogen) with purified baculovirus. Recombinant 205P1B5 protein can be detected using anti-205P1B5 or anti-His-tag antibody. 205P1B5 protein can be purified and used in various cell-based assays or as immunogen to generate polyclonal and monoclonal antibodies specific for 205P1B5.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Example 7 Antigenicity Profiles and Secondary Structure

Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8, and Figure 9 depict graphically five amino acid profiles of the 205P1B5 amino acid sequence, each assessment available by accessing the ProtScale website (URL world wide web URL expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) on the ExPasy molecular biology server.

These profiles: Figure 5, Hydrophilicity, (Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828); Figure 6, Hydropathicity, (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132); Figure 7, Percentage Accessible Residues (Janin J., 1979 Nature 277:491-492); Figure 8, Average Flexibility, (Bhaskaran R., and Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255); Figure 9, Beta-turn (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1:289-294); and optionally others available in the art, such as on the ProtScale website, were used to identify antigenic regions of the 205P1B5 protein. Each of the above amino acid profiles of 205P1B5 were generated using the following ProtScale parameters for analysis: 1) A window size of 9; 2) 100% weight of the window edges compared to the window center; and, 3) amino acid profile values normalized to lie between 0 and 1.

Hydrophilicity (Figure 5), Hydropathicity (Figure 6) and Percentage Accessible Residues (Figure 7) profiles were used to determine stretches of hydrophilic amino acids (i.e., values greater than 0.5 on the Hydrophilicity and Percentage Accessible Residues profile, and values less than 0.5 on the Hydropathicity profile). Such regions are likely to be exposed to the aqueous environment, be present on the surface of the protein, and thus available for immune recognition, such as by antibodies.

Average Flexibility (Figure 8) and Beta-turn (Figure 9) profiles determine stretches of amino acids (i.e., values greater than 0.5 on the Beta-turn profile and the Average Flexibility profile) that are not constrained in secondary structures such as beta sheets and alpha helices. Such regions are also more likely to be exposed on the protein and thus accessible to immune recognition, such as by antibodies.

Antigenic sequences of the 205P1B5 protein indicated, e.g., by the profiles set forth in Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8, and/or Figure 9 are used to prepare immunogens, either peptides or nucleic acids that encode them, to generate therapeutic and diagnostic anti-205P1B5 antibodies. The immunogen can be any 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 or more than 50 contiguous amino acids, or the corresponding nucleic acids that encode them, from the 205P1B5 protein. In particular, peptide immunogens of the invention can comprise, a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 2 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Hydrophilicity profile of Figure 5; a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 2 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value less than 0.5 in the Hydropathicity profile of Figure 6; a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 2 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Percent Accessible Residues profile of Figure 7; a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 2 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Average Flexibility profile on Figure 8; and, a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 2 in any whole number increment up to 529 that includes an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Beta-turn profile of Figure 9. Peptide immunogens of the invention can also comprise nucleic acids that encode any of the foregoing.

All immunogens of the invention, peptide or nucleic acid, can be embodied in human unit dose form, or comprised by a composition that includes a pharmaceutical excipient compatible with human physiology.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

The secondary structure of 205P1B5, namely the predicted presence and location of alpha helices, extended strands, and random coils, is predicted from the primary amino acid sequence using the HNN - Hierarchical Neural Network method (Guermeur, 1997, world wide web URL /pbil.libcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html), accessed from the ExPasy molecular biology server (world wide web URL: expasy.ch/tools/). The analysis indicates that 205P1B5 is composed 41.40% alpha helix, 12.67% extended strand, and 45.94% random coil (Figure 14A).

Analysis for the potential presence of transmembrane domains in 205P1B5 was carried out using a variety of transmembrane prediction algorithms accessed from the ExPasy molecular biology server (world wide web URL expasy.ch/tools/). The programs predict the presence of 5 transmembrane domains in 205P1B5, consistent with the structure of a G-protein coupled receptor. Shown graphically in Figure 14 are the results of analysis using the TMpred (Figure 14B) and TMHMM (Figure 14C) prediction programs depicting the location of the 5 transmembrane domains. The results of each program, namely the amino acids encoding the transmembrane domains are summarized in Table XXI.

Example 8: Generation of 205P1B5 Polyclonal Antibodies

Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. In addition to immunizing with the full length 205P1B5 protein, computer algorithms are employed in design of immunogens that, based on amino acid sequence analysis contain characteristics of being antigenic and available for recognition by the immune system of the immunized host (see the Example entitled "Antigenicity Profiles"). Such regions would be predicted to be hydrophilic, flexible, in beta-turn conformations, and be exposed on the surface of the protein (see, e.g., Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8, or Figure 9 for amino acid profiles that indicate such regions of 205P1B5).

For example, 205P1B5 recombinant bacterial fusion proteins or peptides encoding hydrophilic, flexible, beta-turn regions of the 205P1B5 sequence, such as amino acids 23-63, are used as antigens to generate polyclonal antibodies in New Zealand White rabbits. It is useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins include, but are not limited to, keyhole limpet hemocyanin (KLH), serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. In one embodiment, a peptide encoding amino acids 23-63 of 205P1B5 is conjugated to KLH and used to immunize the rabbit. Alternatively the immunizing agent may include all or portions of the 205P1B5 protein, analogs or fusion proteins thereof. For example, the 205P1B5 amino acid sequence can be fused using recombinant DNA techniques to any one of a variety of fusion protein partners that are well known in the art, such as glutathione-S-transferase (GST) and HIS tagged fusion proteins. Such fusion proteins are purified from induced bacteria using the appropriate affinity matrix.

In one embodiment, a GST-fusion protein encoding the predicted second extracellular loop of 205P1B5 (amino acids 27-271) is produced and purified and used as immunogen (see the section entitled "Production of 205P1B5 in Prokaryotic Systems"). Other recombinant bacterial fusion proteins that may be employed include maltose binding protein, LacZ, thioredoxin, NusA, or an immunoglobulin constant region (see the section entitled "Production of 205P1B5 in Prokaryotic Systems" and Current Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995; Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N., and Ledbetter, L.(1991) J.Exp. Med. 174, 561-566).

WO 03/020954

PCT/US02/27760

In addition to bacterial derived fusion proteins, mammalian expressed protein antigens are also used. These antigens are expressed from mammalian expression vectors such as the Tag5 and Fc-fusion vectors (see the section entitled "Production of Recombinant 205P1B5 in Eukaryotic Systems"), and retain post-translational modifications such as glycosylations found in native protein. In one embodiment, amino acids 27-271 is cloned into the Tag5 mammalian secretion vector. The recombinant protein is purified by metal chelate chromatography from tissue culture supernatants of 293T cells stably expressing the recombinant vector. The purified Tag5 205P1B5 protein is then used as immunogen.

During the immunization protocol, it is useful to mix or emulsify the antigen in adjuvants that enhance the immune response of the host animal. Examples of adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant (CFA) and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate).

In a typical protocol, rabbits are initially immunized subcutaneously with up to 200 µg, typically 100-200 µg, of fusion protein or peptide conjugated to KLH mixed in complete Freund's adjuvant (CFA). Rabbits are then injected subcutaneously every two weeks with up to 200 µg, typically 100-200 µg, of the immunogen in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Test bleeds are taken approximately 7-10 days following each immunization and used to monitor the titer of the antiserum by ELISA.

To test reactivity and specificity of immune serum, such as the rabbit serum derived from immunization with Tag5 205P1B5 encoding amino acids 27-271, the full-length 205P1B5 cDNA is cloned into pCDNA 3.1 myc-his expression vector (Invitrogen, see the Example entitled "Production of Recombinant 205P1B5 in Eukaryotic Systems"). After transfection of the constructs into 293T cells, cell lysates are probed with the anti-205P1B5 serum and with anti-His antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) to determine specific reactivity to denatured 205P1B5 protein using the Western blot technique. Immunoprecipitation and flow cytometric analyses of 293T and other recombinant 205P1B5-expressing cells determine recognition of native protein by the antiserum. In addition, Western blot, immunoprecipitation, fluorescent microscopy, and flow cytometric techniques using cells that endogenously express 205P1B5 are carried out to test specificity.

The anti-serum from the Tag5 205P1B5 immunized rabbit the serum is affinity purified by passage over a column composed of the Tag5 antigen covalently coupled to Affigel matrix (BioRad, Hercules, Calif.). The serum is then further purified by protein G affinity chromatography to isolate the IgG fraction. Serum from rabbits immunized with fusion proteins, such as GST and MBP fusion proteins, are purified by depletion of antibodies reactive to the fusion partner sequence by passage over an affinity column containing the fusion partner either alone or in the context of an irrelevant fusion protein. Sera from other His-tagged antigens and peptide immunized rabbits as well as fusion partner depleted sera are affinity purified by passage over a column matrix composed of the original protein immunogen or free peptide.

Example 9: Generation of 205P1B5 Monoclonal Antibodies (mAbs)

In one embodiment, therapeutic mAbs to 205P1B5 comprise those that react with epitopes of the protein that would disrupt or modulate the biological function of 205P1B5, for example those that would disrupt its interaction with ligands or proteins that mediate or are involved in its biological activity. Therapeutic mAbs also comprise those that specifically bind epitopes of 205P1B5 exposed on the cell surface and thus are useful in targeting mAb-toxin conjugates. Immunogens for generation of such mAbs include those designed to encode or contain the entire 205P1B5 protein or regions of the 205P1B5 protein predicted to be antigenic from computer analysis of the amino acid sequence (see, e.g., Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8, or Figure 9, and the

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Example entitled "Antigenicity Profiles"). Immunogens include peptides, recombinant bacterial proteins, and mammalian expressed Tag 5 proteins and human and murine IgG FC fusion proteins. In addition, cells expressing high levels of 205P1B5, such as 293T-205P1B5 cells, are used to immunize mice.

To generate mAbs to 205P1B5, mice are first immunized intraperitoneally (IP) with, typically, 10-50 μ g of protein immunogen or 10^7 205P1B5-expressing cells mixed in complete Freund's adjuvant. Mice are then subsequently immunized IP every 2-4 weeks with, typically, 10-50 μ g of protein immunogen or 10^7 cells mixed in incomplete Freund's adjuvant. Alternatively, MPL-TDM adjuvant is used in immunizations. In addition to the above protein and cell-based immunization strategies, a DNA-based immunization protocol is employed in which a mammalian expression vector encoding 205P1B5 sequence is used to immunize mice by direct injection of the plasmid DNA. For example, the predicted second extracellular loop of 205P1B5, amino acids 27-271, is cloned into the Tag5 mammalian secretion vector and the recombinant vector is used as immunogen. In another example, amino acids 23-63 (predicted to be antigenic from sequence analysis, see, e.g., Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8 or Figure 9) is cloned into an Fc-fusion secretion vector in which the 205P1B5 sequence is fused at the amino-terminus to an IgK leader sequence and at the carboxyl-terminus to the coding sequence of the human IgG Fc region. This recombinant vector is then used as immunogen. The plasmid immunization protocols are used in combination with purified proteins expressed from the same vector and with cells expressing 205P1B5.

During the immunization protocol, test bleeds are taken 7-10 days following an injection to monitor titer and specificity of the immune response. Once appropriate reactivity and specificity is obtained as determined by ELISA, Western blotting, immunoprecipitation, fluorescence microscopy, and flow cytometric analyses, fusion and hybridoma generation is then carried out with established procedures well known in the art (see, e.g., Harlow and Lane, 1988).

In one embodiment for generating 205P1B5 monoclonal antibodies, a Tag5-205P1B5 antigen encoding amino acids 27-271 is expressed and purified from stably transfected 293T cells. Balb C mice are initially immunized intraperitoneally with 25 μ g of the Tag5 205P1B5 protein mixed in complete Freund's adjuvant. Mice are subsequently immunized every two weeks with 25 μ g of the antigen mixed in incomplete Freund's adjuvant for a total of three immunizations. ELISA using the Tag5 antigen determines the titer of serum from immunized mice. Reactivity and specificity of serum to full length 205P1B5 protein is monitored by Western blotting, immunoprecipitation and flow cytometry using 293T cells transfected with an expression vector encoding the 205P1B5 cDNA (see e.g., the Example entitled "Production of Recombinant 205P1B5 in Eukaryotic Systems"). Other recombinant 205P1B5-expressing cells or cells endogenously expressing 205P1B5 are also used. Mice showing the strongest reactivity are rested and given a final injection of Tag5 antigen in PBS and then sacrificed four days later. The spleens of the sacrificed mice are harvested and fused to SPO/2 myeloma cells using standard procedures (Harlow and Lane, 1988). Supernatants from HAT selected growth wells are screened by ELISA, Western blot, immunoprecipitation, fluorescent microscopy, and flow cytometry to identify 205P1B5 specific antibody-producing clones.

The binding affinity of a 205P1B5 monoclonal antibody is determined using standard technologies. Affinity measurements quantify the strength of antibody to epitope binding and are used to help define which 205P1B5 monoclonal antibodies preferred for diagnostic or therapeutic use, as appreciated by one of skill in the art. The BIAcore system (Uppsala, Sweden) is a preferred method for determining binding affinity. The BIAcore system uses surface plasmon resonance (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23:1; Morton and

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Myszka, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) to monitor biomolecular interactions in real time. BIAcore analysis conveniently generates association rate constants, dissociation rate constants, equilibrium dissociation constants, and affinity constants.

5 **Example 10: HLA Class I and Class II Binding Assays**

HLA class I and class II binding assays using purified HLA molecules are performed in accordance with disclosed protocols (e.g., PCT publications WO 94/20127 and WO 94/03205; Sidney *et al.*, *Current Protocols in Immunology* 18.3.1 (1998); Sidney, *et al.*, *J. Immunol.* 154:247 (1995); Sette, *et al.*, *Mol. Immunol.* 31:813 (1994)). Briefly, purified MHC molecules (5 to 500 nM) are incubated with various unlabeled peptide inhibitors and 1-10 nM ¹²⁵I-radiolabeled probe peptides as described. Following incubation, MHC-peptide complexes are separated from free peptide by gel filtration and the fraction of peptide bound is determined. Typically, in preliminary experiments, each MHC preparation is titrated in the presence of fixed amounts of radiolabeled peptides to determine the concentration of HLA molecules necessary to bind 10-20% of the total radioactivity. All subsequent inhibition and direct binding assays are performed using these HLA concentrations.

Since under these conditions [label]<[HLA] and IC₅₀>[HLA], the measured IC₅₀ values are reasonable approximations of the true K_D values. Peptide inhibitors are typically tested at concentrations ranging from 120 µg/ml to 1.2 ng/ml, and are tested in two to four completely independent experiments. To allow comparison of the data obtained in different experiments, a relative binding figure is calculated for each peptide by dividing the IC₅₀ of a positive control for inhibition by the IC₅₀ for each tested peptide (typically unlabeled versions of the radiolabeled probe peptide). For database purposes, and inter-experiment comparisons, relative binding values are compiled. These values can subsequently be converted back into IC₅₀ nM values by dividing the IC₅₀ nM of the positive controls for inhibition by the relative binding of the peptide of interest. This method of data compilation is accurate and consistent for comparing peptides that have been tested on different days, or with different lots of purified MHC.

Binding assays as outlined above may be used to analyze HLA supermotif and/or HLA motif-bearing peptides.

30 **Example 11: Identification of HLA Supermotif- and Motif-Bearing CTL Candidate Epitopes**

HLA vaccine compositions of the invention can include multiple epitopes. The multiple epitopes can comprise multiple HLA supermotifs or motifs to achieve broad population coverage. This example illustrates the identification and confirmation of supermotif- and motif-bearing epitopes for the inclusion in such a vaccine composition. Calculation of population coverage is performed using the strategy described below.

35 **Computer searches and algorithms for identification of supermotif and/or motif-bearing epitopes**

The searches performed to identify the motif-bearing peptide sequences in the Example entitled "Antigenicity Profiles" and Tables V-XVIII employ the protein sequence data from the gene product of 205P1B5 set forth in Figures 2 and 3.

Computer searches for epitopes bearing HLA Class I or Class II supermotifs or motifs are performed as follows. All translated 205P1B5 protein sequences are analyzed using a text string search software program to identify potential peptide sequences containing appropriate HLA binding motifs; such programs are readily

WO 03/020954

PCT/US02/27760

produced in accordance with information in the art in view of known motif/super-motif disclosures. Furthermore, such calculations can be made mentally.

Identified A2-, A3-, and DR-super-motif sequences are scored using polynomial algorithms to predict their capacity to bind to specific HLA-Class I or Class II molecules. These polynomial algorithms account for the impact of different amino acids at different positions, and are essentially based on the premise that the overall affinity (or ΔG) of peptide-HLA molecule interactions can be approximated as a linear polynomial function of the type:

$$''\Delta G'' = a_{1j} \times a_{2j} \times a_{3j} \dots \times a_{nj}$$

where a_{ij} is a coefficient which represents the effect of the presence of a given amino acid (j) at a given position (i) along the sequence of a peptide of n amino acids. The crucial assumption of this method is that the effects at each position are essentially independent of each other (i.e., independent binding of individual side-chains). When residue j occurs at position i in the peptide, it is assumed to contribute a constant amount j_i to the free energy of binding of the peptide irrespective of the sequence of the rest of the peptide.

The method of derivation of specific algorithm coefficients has been described in Gulukota *et al.*, *J. Mol. Biol.* 267:1258-126, 1997; (see also Sidney *et al.*, *Human Immunol.* 45:79-93, 1996; and Southwood *et al.*, *J. Immunol.* 160:3363-3373, 1998). Briefly, for all i positions, anchor and non-anchor alike, the geometric mean of the average relative binding (ARB) of all peptides carrying j is calculated relative to the remainder of the group, and used as the estimate of j_i . For Class II peptides, if multiple alignments are possible, only the highest scoring alignment is utilized, following an iterative procedure. To calculate an algorithm score of a given peptide in a test set, the ARB values corresponding to the sequence of the peptide are multiplied. If this product exceeds a chosen threshold, the peptide is predicted to bind. Appropriate thresholds are chosen as a function of the degree of stringency of prediction desired.

Selection of HLA-A2 supertype cross-reactive peptides

Complete protein sequences from 205P1B5 are scanned utilizing motif identification software, to identify 8-, 9-, 10- and 11-mer sequences containing the HLA-A2-super-motif main anchor specificity. Typically, these sequences are then scored using the protocol described above and the peptides corresponding to the positive-scoring sequences are synthesized and tested for their capacity to bind purified HLA-A*0201 molecules *in vitro* (HLA-A*0201 is considered a prototype A2 supertype molecule).

These peptides are then tested for the capacity to bind to additional A2-supertype molecules (A*0202, A*0203, A*0206, and A*6802). Peptides that bind to at least three of the five A2-supertype alleles tested are typically deemed A2-supertype cross-reactive binders. Preferred peptides bind at an affinity equal to or less than 500 nM to three or more HLA-A2 supertype molecules.

Selection of HLA-A3 supermotif-bearing epitopes

The 205P1B5 protein sequence scanned above is also examined for the presence of peptides with the HLA-A3-super-motif primary anchors. Peptides corresponding to the HLA A3 supermotif-bearing sequences are then synthesized and tested for binding to HLA-A*0301 and HLA-A*1101 molecules, the molecules encoded by the two most prevalent A3-supertype alleles. The peptides that bind at least one of the two alleles with binding affinities of ≤ 500 nM, often ≤ 200 nM, are then tested for binding cross-reactivity to the other common A3-supertype alleles (e.g., A*3101, A*3301, and A*6801) to identify those that can bind at least three of the five HLA-A3-supertype molecules tested.

Selection of HLA-B7 supermotif-bearing epitopes

WO 03/020954

PCT/US02/27760

The 205P1B5 protein is also analyzed for the presence of 8-, 9-, 10-, or 11-mer peptides with the HLA-B7-supermotif. Corresponding peptides are synthesized and tested for binding to HLA-B*0702, the molecule encoded by the most common B7-supertype allele (*i.e.*, the prototype B7 supertype allele). Peptides binding B*0702 with IC_{50} of ≤ 500 nM are identified using standard methods. These peptides are then tested for binding to other common B7-supertype molecules (e.g., B*3501, B*5101, B*5301, and B*5401). Peptides capable of binding to three or more of the five B7-supertype alleles tested are thereby identified.

Selection of A1 and A24 motif-bearing epitopes

To further increase population coverage, HLA-A1 and -A24 epitopes can also be incorporated into vaccine compositions. An analysis of the 205P1B5 protein can also be performed to identify HLA-A1- and A24-motif-containing sequences.

High affinity and/or cross-reactive binding epitopes that bear other motif and/or supermotifs are identified using analogous methodology.

Example 12: Confirmation of Immunogenicity

Cross-reactive candidate CTL A2-supermotif-bearing peptides that are identified as described herein are selected to confirm *in vitro* immunogenicity. Confirmation is performed using the following methodology:

Target Cell Lines for Cellular Screening:

The .221A2.1 cell line, produced by transferring the HLA-A2.1 gene into the HLA-A, -B, -C null mutant human B-lymphoblastoid cell line 721.221, is used as the peptide-loaded target to measure activity of HLA-A2.1-restricted CTL. This cell line is grown in RPMI-1640 medium supplemented with antibiotics, sodium pyruvate, nonessential amino acids and 10% (v/v) heat inactivated FCS. Cells that express an antigen of interest, or transfectants comprising the gene encoding the antigen of interest, can be used as target cells to confirm the ability of peptide-specific CTLs to recognize endogenous antigen.

Primary CTL Induction Cultures:

Generation of Dendritic Cells (DC): PBMCs are thawed in RPMI with 30 μ g/ml DNase, washed twice and resuspended in complete medium (RPMI-1640 plus 5% AB human serum, non-essential amino acids, sodium pyruvate, L-glutamine and penicillin/streptomycin). The monocytes are purified by plating 10×10^6 PBMC/well in a 6-well plate. After 2 hours at 37°C, the non-adherent cells are removed by gently shaking the plates and aspirating the supernatants. The wells are washed a total of three times with 3 ml RPMI to remove most of the non-adherent and loosely adherent cells. Three ml of complete medium containing 50 ng/ml of GM-CSF and 1,000 U/ml of IL-4 are then added to each well. TNF α is added to the DCs on day 6 at 75 ng/ml and the cells are used for CTL induction cultures on day 7.

Induction of CTL with DC and Peptide: CD8⁺ T-cells are isolated by positive selection with Dynal immunomagnetic beads (Dynabeads® M-450) and the detach-bead® reagent. Typically about $200-250 \times 10^6$ PBMC are processed to obtain 24×10^6 CD8⁺ T-cells (enough for a 48-well plate culture). Briefly, the PBMCs are thawed in RPMI with 30 μ g/ml DNase, washed once with PBS containing 1% human AB serum and resuspended in PBS/1% AB serum at a concentration of 20×10^6 cells/ml. The magnetic beads are washed 3 times with PBS/AB serum, added to the cells (140 μ l beads/ 20×10^6 cells) and incubated for 1 hour at 4°C with continuous mixing. The beads and cells are washed 4x with PBS/AB serum to remove the nonadherent cells and resuspended at 100×10^6 cells/ml (based on the original cell number) in PBS/AB serum containing 100 μ l/ml detach-bead® reagent and 30 μ g/ml DNase. The mixture is incubated for 1 hour at room temperature with

WO 03/020954

PCT/US02/27760

continuous mixing. The beads are washed again with PBS/AB/DNAse to collect the CD8+ T-cells. The DC are collected and centrifuged at 1300 rpm for 5-7 minutes, washed once with PBS with 1% BSA, counted and pulsed with 40µg/ml of peptide at a cell concentration of 1-2x10⁶/ml in the presence of 3µg/ml β₂-microglobulin for 4 hours at 20°C. The DC are then irradiated (4,200 rads), washed 1 time with medium and counted again.

5 *Setting up induction cultures:* 0.25 ml cytokine-generated DC (at 1x10⁵ cells/ml) are co-cultured with 0.25ml of CD8+ T-cells (at 2x10⁶ cell/ml) in each well of a 48-well plate in the presence of 10 ng/ml of IL-7. Recombinant human IL-10 is added the next day at a final concentration of 10 ng/ml and rhuman IL-2 is added 48 hours later at 10 IU/ml.

10 *Restimulation of the induction cultures with peptide-pulsed adherent cells:* Seven and fourteen days after the primary induction, the cells are restimulated with peptide-pulsed adherent cells. The PBMCs are thawed and washed twice with RPMI and DNAse. The cells are resuspended at 5x10⁶ cells/ml and irradiated at ~4200 rads. The PBMCs are plated at 2x10⁶ in 0.5 ml complete medium per well and incubated for 2 hours at 37°C. The plates are washed twice with RPMI by tapping the plate gently to remove the nonadherent cells and the adherent cells pulsed with 10µg/ml of peptide in the presence of 3 µg/ml β₂ microglobulin in 0.25ml RPMI/5%AB per well for 2 hours at 37°C. Peptide solution from each well is aspirated and the wells are washed once with RPMI. Most of the media is aspirated from the induction cultures (CD8+ cells) and brought to 0.5 ml with fresh media. The cells are then transferred to the wells containing the peptide-pulsed adherent cells. Twenty four hours later recombinant human IL-10 is added at a final concentration of 10 ng/ml and recombinant human IL-2 is added the next day and again 2-3 days later at 50IU/ml (Tsai *et al.*, *Critical Reviews in Immunology* 18(1-2):65-75, 1998). Seven days later, the cultures are assayed for CTL activity in a ⁵¹Cr release assay. In some experiments the cultures are assayed for peptide-specific recognition in the *in situ* IFNγ ELISA at the time of the second restimulation followed by assay of endogenous recognition 7 days later. After expansion, activity is measured in both assays for a side-by-side comparison.

Measurement of CTL lytic activity by ⁵¹Cr release.

25 Seven days after the second restimulation, cytotoxicity is determined in a standard (5 hr) ⁵¹Cr release assay by assaying individual wells at a single E:T. Peptide-pulsed targets are prepared by incubating the cells with 10µg/ml peptide overnight at 37°C.

Adherent target cells are removed from culture flasks with trypsin-EDTA. Target cells are labeled with 200µCi of ⁵¹Cr sodium chromate (Dupont, Wilmington, DE) for 1 hour at 37°C. Labeled target cells are resuspended at 10⁶ per ml and diluted 1:10 with K562 cells at a concentration of 3.3x10⁶/ml (an NK-sensitive erythroblastoma cell line used to reduce non-specific lysis). Target cells (100 µl) and effectors (100µl) are plated in 96 well round-bottom plates and incubated for 5 hours at 37°C. At that time, 100 µl of supernatant are collected from each well and percent lysis is determined according to the formula:
 30 [(cpm of the test sample- cpm of the spontaneous ⁵¹Cr release sample)/(cpm of the maximal ⁵¹Cr release sample- cpm of the spontaneous ⁵¹Cr release sample)] x 100.

35 Maximum and spontaneous release are determined by incubating the labeled targets with 1% Triton X-100 and media alone, respectively. A positive culture is defined as one in which the specific lysis (sample-background) is 10% or higher in the case of individual wells and is 15% or more at the two highest E:T ratios when expanded cultures are assayed.

40 *In situ* Measurement of Human IFNγ Production as an Indicator of Peptide-specific and Endogenous Recognition

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Immulon 2 plates are coated with mouse anti-human IFN γ monoclonal antibody (4 μ g/ml 0.1M NaHCO₃, pH8.2) overnight at 4°C. The plates are washed with Ca²⁺, Mg²⁺-free PBS/0.05% Tween 20 and blocked with PBS/10% FCS for two hours, after which the CTLs (100 μ l/well) and targets (100 μ l/well) are added to each well, leaving empty wells for the standards and blanks (which received media only). The target cells, either peptide-pulsed or endogenous targets, are used at a concentration of 1x10⁶ cells/ml. The plates are incubated for 48 hours at 37°C with 5% CO₂.

Recombinant human IFN-gamma is added to the standard wells starting at 400 pg or 1200pg/100 microliter/well and the plate incubated for two hours at 37°C. The plates are washed and 100 μ l of biotinylated mouse anti-human IFN-gamma monoclonal antibody (2 microgram/ml in PBS/3%FCS/0.05% Tween 20) are added and incubated for 2 hours at room temperature. After washing again, 100 microliter HRP-streptavidin (1:4000) are added and the plates incubated for one hour at room temperature. The plates are then washed 6x with wash buffer, 100 microliter/well developing solution (TMB 1:1) are added, and the plates allowed to develop for 5-15 minutes. The reaction is stopped with 50 microliter/well 1M H₃PO₄ and read at OD450. A culture is considered positive if it measured at least 50 pg of IFN-gamma/well above background and is twice the background level of expression.

CTL Expansion

Those cultures that demonstrate specific lytic activity against peptide-pulsed targets and/or tumor targets are expanded over a two week period with anti-CD3. Briefly, 5x10⁶ CD8⁺ cells are added to a T25 flask containing the following: 1x10⁶ irradiated (4,200 rad) PBMC (autologous or allogeneic) per ml, 2x10⁶ irradiated (8,000 rad) EBV-transformed cells per ml, and OKT3 (anti-CD3) at 30ng per ml in RPMI-1640 containing 10% (v/v) human AB serum, non-essential amino acids, sodium pyruvate, 25 μ M 2-mercaptoethanol, L-glutamine and penicillin/streptomycin. Recombinant human IL2 is added 24 hours later at a final concentration of 200IU/ml and every three days thereafter with fresh media at 50IU/ml. The cells are split if the cell concentration exceeds 1x10⁶/ml and the cultures are assayed between days 13 and 15 at E:T ratios of 30, 10, 3 and 1:1 in the ⁵¹Cr release assay or at 1x10⁶/ml in the *in situ* IFN γ assay using the same targets as before the expansion.

Cultures are expanded in the absence of anti-CD3⁺ as follows. Those cultures that demonstrate specific lytic activity against peptide and endogenous targets are selected and 5x10⁶ CD8⁺ cells are added to a T25 flask containing the following: 1x10⁶ autologous PBMC per ml which have been peptide-pulsed with 10 μ g/ml peptide for two hours at 37°C and irradiated (4,200 rad); 2x10⁶ irradiated (8,000 rad) EBV-transformed cells per ml RPMI-1640 containing 10%(v/v) human AB serum, non-essential AA, sodium pyruvate, 25mM 2-ME, L-glutamine and gentamicin.

Immunogenicity of A2 supermotif-bearing peptides

A2-supermotif cross-reactive binding peptides are tested in the cellular assay for the ability to induce peptide-specific CTL in normal individuals. In this analysis, a peptide is typically considered to be an epitope if it induces peptide-specific CTLs in at least individuals, and preferably, also recognizes the endogenously expressed peptide.

Immunogenicity can also be confirmed using PBMCs isolated from patients bearing a tumor that expresses 205P1B5. Briefly, PBMCs are isolated from patients, re-stimulated with peptide-pulsed monocytes and assayed for the ability to recognize peptide-pulsed target cells as well as transfected cells endogenously expressing the antigen.

Evaluation of A*03/A11 immunogenicity

WO 03/020954

PCT/US02/27760

HLA-A3 supermotif-bearing cross-reactive binding peptides are also evaluated for immunogenicity using methodology analogous for that used to evaluate the immunogenicity of the HLA-A2 supermotif peptides.

Evaluation of B7 immunogenicity

Immunogenicity screening of the B7-supertype cross-reactive binding peptides identified as set forth herein are confirmed in a manner analogous to the confirmation of A2-and A3-supermotif-bearing peptides.

Peptides bearing other supermotifs/motifs, e.g., HLA-A1, HLA-A24 *etc.* are also confirmed using similar methodology

Example 13: Implementation of the Extended Supermotif to Improve the Binding Capacity of Native Epitopes by Creating Analogs

HLA motifs and supermotifs (comprising primary and/or secondary residues) are useful in the identification and preparation of highly cross-reactive native peptides, as demonstrated herein. Moreover, the definition of HLA motifs and supermotifs also allows one to engineer highly cross-reactive epitopes by identifying residues within a native peptide sequence which can be analoged to confer upon the peptide certain characteristics, e.g. greater cross-reactivity within the group of HLA molecules that comprise a supertype, and/or greater binding affinity for some or all of those HLA molecules. Examples of analoging peptides to exhibit modulated binding affinity are set forth in this example.

Analoging at Primary Anchor Residues

Peptide engineering strategies are implemented to further increase the cross-reactivity of the epitopes. For example, the main anchors of A2-supermotif-bearing peptides are altered, for example, to introduce a preferred L, I, V, or M at position 2, and I or V at the C-terminus.

To analyze the cross-reactivity of the analog peptides, each engineered analog is initially tested for binding to the prototype A2 supertype allele A*0201, then, if A*0201 binding capacity is maintained, for A2-supertype cross-reactivity.

Alternatively, a peptide is confirmed as binding one or all supertype members and then analoged to modulate binding affinity to any one (or more) of the supertype members to add population coverage.

The selection of analogs for immunogenicity in a cellular screening analysis is typically further restricted by the capacity of the parent wild type (WT) peptide to bind at least weakly, *i.e.*, bind at an IC₅₀ of 5000nM or less, to three or more A2 supertype alleles. The rationale for this requirement is that the WT peptides must be present endogenously in sufficient quantity to be biologically relevant. Analoged peptides have been shown to have increased immunogenicity and cross-reactivity by T cells specific for the parent epitope (*see, e.g., Parkhurst et al., J. Immunol.* 157:2539, 1996; and Pogue *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8166, 1995).

In the cellular screening of these peptide analogs, it is important to confirm that analog-specific CTLs are also able to recognize the wild-type peptide and, when possible, target cells that endogenously express the epitope.

Analoging of HLA-A3 and B7-supermotif-bearing peptides

Analog of HLA-A3 supermotif-bearing epitopes are generated using strategies similar to those employed in analoging HLA-A2 supermotif-bearing peptides. For example, peptides binding to 3/5 of the A3-supertype molecules are engineered at primary anchor residues to possess a preferred residue (V, S, M, or A) at position 2.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

The analog peptides are then tested for the ability to bind A*03 and A*11 (prototype A3 supertype alleles). Those peptides that demonstrate ≤ 500 nM binding capacity are then confirmed as having A3-supertype cross-reactivity.

Similarly to the A2- and A3- motif bearing peptides, peptides binding 3 or more B7-supertype alleles can be improved, where possible, to achieve increased cross-reactive binding or greater binding affinity or binding half life. B7 supermotif-bearing peptides are, for example, engineered to possess a preferred residue (V, I, L, or F) at the C-terminal primary anchor position, as demonstrated by Sidney *et al.* (*J. Immunol.* 157:3480-3490, 1996).

Analoging at primary anchor residues of other motif and/or supermotif-bearing epitopes is performed in a like manner.

The analog peptides are then be confirmed for immunogenicity, typically in a cellular screening assay. Again, it is generally important to demonstrate that analog-specific CTLs are also able to recognize the wild-type peptide and, when possible, targets that endogenously express the epitope.

Analoging at Secondary Anchor Residues

Moreover, HLA supermotifs are of value in engineering highly cross-reactive peptides and/or peptides that bind HLA molecules with increased affinity by identifying particular residues at secondary anchor positions that are associated with such properties. For example, the binding capacity of a B7 supermotif-bearing peptide with an F residue at position 1 is analyzed. The peptide is then analoged to, for example, substitute L for F at position 1. The analoged peptide is evaluated for increased binding affinity, binding half life and/or increased cross-reactivity. Such a procedure identifies analoged peptides with enhanced properties.

Engineered analogs with sufficiently improved binding capacity or cross-reactivity can also be tested for immunogenicity in HLA-B7-transgenic mice, following for example, IFA immunization or lipopeptide immunization. Analogued peptides are additionally tested for the ability to stimulate a recall response using PBMC from patients with 205P1B5-expressing tumors.

Other analoging strategies

Another form of peptide analoging, unrelated to anchor positions, involves the substitution of a cysteine with α -amino butyric acid. Due to its chemical nature, cysteine has the propensity to form disulfide bridges and sufficiently alter the peptide structurally so as to reduce binding capacity. Substitution of α -amino butyric acid for cysteine not only alleviates this problem, but has been shown to improve binding and crossbinding capabilities in some instances (*see, e.g.*, the review by Sette *et al.*, In: Persistent Viral Infections, Eds. R. Ahmed and I. Chen, John Wiley & Sons, England, 1999).

Thus, by the use of single amino acid substitutions, the binding properties and/or cross-reactivity of peptide ligands for HLA supertype molecules can be modulated.

Example 14. Identification and confirmation of 205P1B5-derived sequences with HLA-DR binding motifs

Peptide epitopes bearing an HLA class II supermotif or motif are identified and confirmed as outlined below using methodology similar to that described for HLA Class I peptides.

Selection of HLA-DR-supermotif-bearing epitopes.

To identify 205P1B5-derived, HLA class II HTL epitopes, the 205P1B5 antigen is analyzed for the presence of sequences bearing an HLA-DR-motif or supermotif. Specifically, 15-mer sequences are selected

WO 03/020954

PCT/US02/27760

comprising a DR-supermotif, comprising a 9-mer core, and three-residue N- and C-terminal flanking regions (15 amino acids total).

Protocols for predicting peptide binding to DR molecules have been developed (Southwood *et al.*, *J. Immunol.* 160:3363-3373, 1998). These protocols, specific for individual DR molecules, allow the scoring, and ranking, of 9-mer core regions. Each protocol not only scores peptide sequences for the presence of DR-supermotif primary anchors (i.e., at position 1 and position 6) within a 9-mer core, but additionally evaluates sequences for the presence of secondary anchors. Using allele-specific selection tables (see, e.g., Southwood *et al.*, *ibid.*), it has been found that these protocols efficiently select peptide sequences with a high probability of binding a particular DR molecule. Additionally, it has been found that performing these protocols in tandem, specifically those for DR1, DR4w4, and DR7, can efficiently select DR cross-reactive peptides.

The 205P1B5-derived peptides identified above are tested for their binding capacity for various common HLA-DR molecules. All peptides are initially tested for binding to the DR molecules in the primary panel: DR1, DR4w4, and DR7. Peptides binding at least two of these three DR molecules are then tested for binding to DR2w2 β 1, DR2w2 β 2, DR6w19, and DR9 molecules in secondary assays. Finally, peptides binding at least two of the four secondary panel DR molecules, and thus cumulatively at least four of seven different DR molecules, are screened for binding to DR4w15, DR5w11, and DR8w2 molecules in tertiary assays. Peptides binding at least seven of the ten DR molecules comprising the primary, secondary, and tertiary screening assays are considered cross-reactive DR binders. 205P1B5-derived peptides found to bind common HLA-DR alleles are of particular interest.

20 Selection of DR3 motif peptides

Because HLA-DR3 is an allele that is prevalent in Caucasian, Black, and Hispanic populations, DR3 binding capacity is a relevant criterion in the selection of HTL epitopes. Thus, peptides shown to be candidates may also be assayed for their DR3 binding capacity. However, in view of the binding specificity of the DR3 motif, peptides binding only to DR3 can also be considered as candidates for inclusion in a vaccine formulation.

To efficiently identify peptides that bind DR3, target 205P1B5 antigens are analyzed for sequences carrying one of the two DR3-specific binding motifs reported by Geluk *et al.* (*J. Immunol.* 152:5742-5748, 1994). The corresponding peptides are then synthesized and confirmed as having the ability to bind DR3 with an affinity of 1 μ M or better, i.e., less than 1 μ M. Peptides are found that meet this binding criterion and qualify as HLA class II high affinity binders.

DR3 binding epitopes identified in this manner are included in vaccine compositions with DR supermotif-bearing peptide epitopes.

Similarly to the case of HLA class I motif-bearing peptides, the class II motif-bearing peptides are analogized to improve affinity or cross-reactivity. For example, aspartic acid at position 4 of the 9-mer core sequence is an optimal residue for DR3 binding, and substitution for that residue often improves DR3 binding.

35 Example 15: Immunogenicity of 205P1B5-derived HTL epitopes

This example determines immunogenic DR supermotif- and DR3 motif-bearing epitopes among those identified using the methodology set forth herein.

Immunogenicity of HTL epitopes are confirmed in a manner analogous to the determination of immunogenicity of CTL epitopes, by assessing the ability to stimulate HTL responses and/or by using

WO 03/020954

PCT/US02/27760

appropriate transgenic mouse models. Immunogenicity is determined by screening for: 1.) *in vitro* primary induction using normal PBMC or 2.) recall responses from patients who have 205P1B5-expressing tumors.

Example 16: Calculation of phenotypic frequencies of HLA-supertypes in various ethnic

backgrounds to determine breadth of population coverage

This example illustrates the assessment of the breadth of population coverage of a vaccine composition comprised of multiple epitopes comprising multiple supermotifs and/or motifs.

In order to analyze population coverage, gene frequencies of HLA alleles are determined. Gene frequencies for each HLA allele are calculated from antigen or allele frequencies utilizing the binomial distribution formulae $gf=1-(\text{SQRT}(1-af))$ (see, e.g., Sidney *et al.*, *Human Immunol.* 45:79-93, 1996). To obtain overall phenotypic frequencies, cumulative gene frequencies are calculated, and the cumulative antigen frequencies derived by the use of the inverse formula $[af=1-(1-Cgf)^2]$.

Where frequency data is not available at the level of DNA typing, correspondence to the serologically defined antigen frequencies is assumed. To obtain total potential supertype population coverage no linkage disequilibrium is assumed, and only alleles confirmed to belong to each of the superotypes are included (minimal estimates). Estimates of total potential coverage achieved by inter-loci combinations are made by adding to the A coverage the proportion of the non-A covered population that could be expected to be covered by the B alleles considered (e.g., $\text{total}=A+B*(1-A)$). Confirmed members of the A3-like supertype are A3, A11, A31, A*3301, and A*6801. Although the A3-like supertype may also include A34, A66, and A*7401, these alleles were not included in overall frequency calculations. Likewise, confirmed members of the A2-like supertype family are A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*6802, and A*6901. Finally, the B7-like supertype-confirmed alleles are: B7, B*3501-03, B51, B*5301, B*5401, B*5501-2, B*5601, B*6701, and B*7801 (potentially also B*1401, B*3504-06, B*4201, and B*5602).

Population coverage achieved by combining the A2-, A3- and B7-supertypes is approximately 86% in five major ethnic groups. Coverage may be extended by including peptides bearing the A1 and A24 motifs. On average, A1 is present in 12% and A24 in 29% of the population across five different major ethnic groups (Caucasian, North American Black, Chinese, Japanese, and Hispanic). Together, these alleles are represented with an average frequency of 39% in these same ethnic populations. The total coverage across the major ethnicities when A1 and A24 are combined with the coverage of the A2-, A3- and B7-supertype alleles is >95%. An analogous approach can be used to estimate population coverage achieved with combinations of class II motif-bearing epitopes.

Immunogenicity studies in humans (e.g., Bertoni *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100:503, 1997; Doolan *et al.*, *Immunity* 7:97, 1997; and Threlkeld *et al.*, *J. Immunol.* 159:1648, 1997) have shown that highly cross-reactive binding peptides are almost always recognized as epitopes. The use of highly cross-reactive binding peptides is an important selection criterion in identifying candidate epitopes for inclusion in a vaccine that is immunogenic in a diverse population.

With a sufficient number of epitopes (as disclosed herein and from the art), an average population coverage is predicted to be greater than 95% in each of five major ethnic populations. The game theory Monte Carlo simulation analysis, which is known in the art (see e.g., Osborne, M.J. and Rubinstein, A. "A course in game theory" MIT Press, 1994), can be used to estimate what percentage of the individuals in a population comprised of the Caucasian, North American Black, Japanese, Chinese, and Hispanic ethnic groups would

WO 03/020954

PCT/US02/27760

recognize the vaccine epitopes described herein. A preferred percentage is 90%. A more preferred percentage is 95%.

Example 17: CTL Recognition Of Endogenously Processed Antigens After Priming

5 This example confirms that CTL induced by native or analoged peptide epitopes identified and selected as described herein recognize endogenously synthesized, *i.e.*, native antigens.

Effector cells isolated from transgenic mice that are immunized with peptide epitopes, for example HLA-A2 supermotif-bearing epitopes, are re-stimulated *in vitro* using peptide-coated stimulator cells. Six days later, effector cells are assayed for cytotoxicity and the cell lines that contain peptide-specific cytotoxic activity are further re-stimulated. An additional six days later, these cell lines are tested for cytotoxic activity on ⁵¹Cr
10 labeled Jurkat-A2.1/K^b target cells in the absence or presence of peptide, and also tested on ⁵¹Cr labeled target cells bearing the endogenously synthesized antigen, *i.e.* cells that are stably transfected with 205P1B5 expression vectors.

The results demonstrate that CTL lines obtained from animals primed with peptide epitope recognize
15 endogenously synthesized 205P1B5 antigen. The choice of transgenic mouse model to be used for such an analysis depends upon the epitope(s) that are being evaluated. In addition to HLA-A*0201/K^b transgenic mice, several other transgenic mouse models including mice with human A11, which may also be used to evaluate A3 epitopes, and B7 alleles have been characterized and others (*e.g.*, transgenic mice for HLA-A1 and A24) are being developed. HLA-DR1 and HLA-DR3 mouse models have also been developed, which may be used to
20 evaluate HTL epitopes.

Example 18: Activity Of CTL-HTL Conjugated Epitopes In Transgenic Mice

This example illustrates the induction of CTLs and HTLs in transgenic mice, by use of a 205P1B5-derived CTL and HTL peptide vaccine compositions. The vaccine composition used herein comprise peptides to
25 be administered to a patient with a 205P1B5-expressing tumor. The peptide composition can comprise multiple CTL and/or HTL epitopes. The epitopes are identified using methodology as described herein. This example also illustrates that enhanced immunogenicity can be achieved by inclusion of one or more HTL epitopes in a CTL vaccine composition; such a peptide composition can comprise an HTL epitope conjugated to a CTL epitope. The CTL epitope can be one that binds to multiple HLA family members at an affinity of 500 nM or
30 less, or analogs of that epitope. The peptides may be lipidated, if desired.

Immunization procedures: Immunization of transgenic mice is performed as described (Alexander *et al.*, *J. Immunol.* 159:4753-4761, 1997). For example, A2/K^b mice, which are transgenic for the human HLA A2.1 allele and are used to confirm the immunogenicity of HLA-A*0201 motif- or HLA-A2 supermotif-bearing epitopes, and are primed subcutaneously (base of the tail) with a 0.1 ml of peptide in Incomplete Freund's
35 Adjuvant, or if the peptide composition is a lipidated CTL/HTL conjugate, in DMSO/saline, or if the peptide composition is a polypeptide, in PBS or Incomplete Freund's Adjuvant. Seven days after priming, splenocytes obtained from these animals are restimulated with syngenic irradiated LPS-activated lymphoblasts coated with peptide.

Cell lines: Target cells for peptide-specific cytotoxicity assays are Jurkat cells transfected with the
40 HLA-A2.1/K^b chimeric gene (*e.g.*, Vitiello *et al.*, *J. Exp. Med.* 173:1007, 1991)

WO 03/020954

PCT/US02/27760

In vitro CTL activation: One week after priming, spleen cells (30×10^6 cells/flask) are co-cultured at 37°C with syngeneic, irradiated (3000 rads), peptide coated lymphoblasts (10×10^6 cells/flask) in 10 ml of culture medium/T25 flask. After six days, effector cells are harvested and assayed for cytotoxic activity.

Assay for cytotoxic activity: Target cells (1.0 to 1.5×10^6) are incubated at 37°C in the presence of $200 \mu\text{l}$ of ^{51}Cr . After 60 minutes, cells are washed three times and resuspended in R10 medium. Peptide is added where required at a concentration of $1 \mu\text{g/ml}$. For the assay, 10^4 ^{51}Cr -labeled target cells are added to different concentrations of effector cells (final volume of $200 \mu\text{l}$) in U-bottom 96-well plates. After a six hour incubation period at 37°C , a 0.1 ml aliquot of supernatant is removed from each well and radioactivity is determined in a Micromedic automatic gamma counter. The percent specific lysis is determined by the formula: percent specific release = $100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})$. To facilitate comparison between separate CTL assays run under the same conditions, % ^{51}Cr release data is expressed as lytic units/ 10^6 cells. One lytic unit is arbitrarily defined as the number of effector cells required to achieve 30% lysis of 10,000 target cells in a six hour ^{51}Cr release assay. To obtain specific lytic units/ 10^6 , the lytic units/ 10^6 obtained in the absence of peptide is subtracted from the lytic units/ 10^6 obtained in the presence of peptide. For example, if 30% ^{51}Cr release is obtained at the effector (E): target (T) ratio of 50:1 (i.e., 5×10^5 effector cells for 10,000 targets) in the absence of peptide and 5:1 (i.e., 5×10^4 effector cells for 10,000 targets) in the presence of peptide, the specific lytic units would be: $[(1/50,000) - (1/500,000)] \times 10^6 = 18 \text{ LU}$.

The results are analyzed to assess the magnitude of the CTL responses of animals injected with the immunogenic CTL/HTL conjugate vaccine preparation and are compared to the magnitude of the CTL response achieved using, for example, CTL epitopes as outlined above in the Example entitled "Confirmation of Immunogenicity". Analyses similar to this may be performed to confirm the immunogenicity of peptide conjugates containing multiple CTL epitopes and/or multiple HTL epitopes. In accordance with these procedures, it is found that a CTL response is induced, and concomitantly that an HTL response is induced upon administration of such compositions.

Example 19: Selection of CTL and HTL epitopes for inclusion in an 205P1B5-specific vaccine.

This example illustrates a procedure for selecting peptide epitopes for vaccine compositions of the invention. The peptides in the composition can be in the form of a nucleic acid sequence, either single or one or more sequences (i.e., minigene) that encodes peptide(s), or can be single and/or polypeptidic peptides.

The following principles are utilized when selecting a plurality of epitopes for inclusion in a vaccine composition. Each of the following principles is balanced in order to make the selection.

Epitopes are selected which, upon administration, mimic immune responses that are correlated with 205P1B5 clearance. The number of epitopes used depends on observations of patients who spontaneously clear 205P1B5. For example, if it has been observed that patients who spontaneously clear 205P1B5 generate an immune response to at least three (3) from 205P1B5 antigen, then three or four (3-4) epitopes should be included for HLA class I. A similar rationale is used to determine HLA class II epitopes.

Epitopes are often selected that have a binding affinity of an IC_{50} of 500 nM or less for an HLA class I molecule, or for class II, an IC_{50} of 1000 nM or less; or HLA Class I peptides with high binding scores from the BIMAS web site, at URL bimas.dcrt.nih.gov/.

In order to achieve broad coverage of the vaccine through out a diverse population, sufficient supermotif bearing peptides, or a sufficient array of allele-specific motif bearing peptides, are selected to give

WO 03/020954

PCT/US02/27760

broad population coverage. In one embodiment, epitopes are selected to provide at least 80% population coverage. A Monte Carlo analysis, a statistical evaluation known in the art, can be employed to assess breadth, or redundancy, of population coverage.

When creating polyepitopic compositions, or a minigene that encodes same, it is typically desirable to generate the smallest peptide possible that encompasses the epitopes of interest. The principles employed are similar, if not the same, as those employed when selecting a peptide comprising nested epitopes. For example, a protein sequence for the vaccine composition is selected because it has maximal number of epitopes contained within the sequence, *i.e.*, it has a high concentration of epitopes. Epitopes may be nested or overlapping (*i.e.*, frame shifted relative to one another). For example, with overlapping epitopes, two 9-mer epitopes and one 10-mer epitope can be present in a 10 amino acid peptide. Each epitope can be exposed and bound by an HLA molecule upon administration of such a peptide. A multi-epitopic, peptide can be generated synthetically, recombinantly, or via cleavage from the native source. Alternatively, an analog can be made of this native sequence, whereby one or more of the epitopes comprise substitutions that alter the cross-reactivity and/or binding affinity properties of the polyepitopic peptide. Such a vaccine composition is administered for therapeutic or prophylactic purposes. This embodiment provides for the possibility that an as yet undiscovered aspect of immune system processing will apply to the native nested sequence and thereby facilitate the production of therapeutic or prophylactic immune response-inducing vaccine compositions. Additionally such an embodiment provides for the possibility of motif-bearing epitopes for an HLA makeup that is presently unknown. Furthermore, this embodiment (absent the creating of any analogs) directs the immune response to multiple peptide sequences that are actually present in 205P1B5, thus avoiding the need to evaluate any junctional epitopes. Lastly, the embodiment provides an economy of scale when producing nucleic acid vaccine compositions. Related to this embodiment, computer programs can be derived in accordance with principles in the art, which identify in a target sequence, the greatest number of epitopes per sequence length.

A vaccine composition comprised of selected peptides, when administered, is safe, efficacious, and elicits an immune response similar in magnitude to an immune response that controls or clears cells that bear or overexpress 205P1B5.

Example 20: Construction of "Minigene" Multi-Epitope DNA Plasmids

This example discusses the construction of a minigene expression plasmid. Minigene plasmids may, of course, contain various configurations of B cell, CTL and/or HTL epitopes or epitope analogs as described herein.

A minigene expression plasmid typically includes multiple CTL and HTL peptide epitopes. In the present example, HLA-A2, -A3, -B7 supermotif-bearing peptide epitopes and HLA-A1 and -A24 motif-bearing peptide epitopes are used in conjunction with DR supermotif-bearing epitopes and/or DR3 epitopes. HLA class I supermotif or motif-bearing peptide epitopes derived 205P1B5, are selected such that multiple supermotifs/motifs are represented to ensure broad population coverage. Similarly, HLA class II epitopes are selected from 205P1B5 to provide broad population coverage, *i.e.* both HLA DR-1-4-7 supermotif-bearing epitopes and HLA DR-3 motif-bearing epitopes are selected for inclusion in the minigene construct. The selected CTL and HTL epitopes are then incorporated into a minigene for expression in an expression vector.

Such a construct may additionally include sequences that direct the HTL epitopes to the endoplasmic reticulum. For example, the Ii protein may be fused to one or more HTL epitopes as described in the art,

WO 03/020954

PCT/US02/27760

wherein the CLIP sequence of the Ii protein is removed and replaced with an HLA class II epitope sequence so that HLA class II epitope is directed to the endoplasmic reticulum, where the epitope binds to an HLA class II molecules.

This example illustrates the methods to be used for construction of a minigene-bearing expression plasmid. Other expression vectors that may be used for minigene compositions are available and known to those of skill in the art.

The minigene DNA plasmid of this example contains a consensus Kozak sequence and a consensus murine kappa Ig-light chain signal sequence followed by CTL and/or HTL epitopes selected in accordance with principles disclosed herein. The sequence encodes an open reading frame fused to the Myc and His antibody epitope tag coded for by the pcDNA 3.1 Myc-His vector.

Overlapping oligonucleotides that can, for example, average about 70 nucleotides in length with 15 nucleotide overlaps, are synthesized and HPLC-purified. The oligonucleotides encode the selected peptide epitopes as well as appropriate linker nucleotides, Kozak sequence, and signal sequence. The final multiepitope minigene is assembled by extending the overlapping oligonucleotides in three sets of reactions using PCR. A Perkin/Elmer 9600 PCR machine is used and a total of 30 cycles are performed using the following conditions: 95°C for 15 sec, annealing temperature (5° below the lowest calculated T_m of each primer pair) for 30 sec, and 72°C for 1 min.

For example, a minigene is prepared as follows. For a first PCR reaction, 5 µg of each of two oligonucleotides are annealed and extended: In an example using eight oligonucleotides, i.e., four pairs of primers, oligonucleotides 1+2, 3+4, 5+6, and 7+8 are combined in 100 µl reactions containing *Pfu* polymerase buffer (1x= 10 mM KCL, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-chloride, pH 8.75, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 100 µg/ml BSA), 0.25 mM each dNTP, and 2.5 U of *Pfu* polymerase. The full-length dimer products are gel-purified, and two reactions containing the product of 1+2 and 3+4, and the product of 5+6 and 7+8 are mixed, annealed, and extended for 10 cycles. Half of the two reactions are then mixed, and 5 cycles of annealing and extension carried out before flanking primers are added to amplify the full length product. The full-length product is gel-purified and cloned into pCR-blunt (Invitrogen) and individual clones are screened by sequencing.

Example 21: The Plasmid Construct and the Degree to Which It Induces Immunogenicity.

The degree to which a plasmid construct, for example a plasmid constructed in accordance with the previous Example, is able to induce immunogenicity is confirmed *in vitro* by determining epitope presentation by APC following transduction or transfection of the APC with an epitope-expressing nucleic acid construct. Such a study determines "antigenicity" and allows the use of human APC. The assay determines the ability of the epitope to be presented by the APC in a context that is recognized by a T cell by quantifying the density of epitope-HLA class I complexes on the cell surface. Quantitation can be performed by directly measuring the amount of peptide eluted from the APC (see, e.g., Sijts *et al.*, *J. Immunol.* 156:683-692, 1996; Demotz *et al.*, *Nature* 342:682-684, 1989); or the number of peptide-HLA class I complexes can be estimated by measuring the amount of lysis or lymphokine release induced by diseased or transfected target cells, and then determining the concentration of peptide necessary to obtain equivalent levels of lysis or lymphokine release (see, e.g., Kageyama *et al.*, *J. Immunol.* 154:567-576, 1995).

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Alternatively, immunogenicity is confirmed through *in vivo* injections into mice and subsequent *in vitro* assessment of CTL and HTL activity, which are analyzed using cytotoxicity and proliferation assays, respectively, as detailed *e.g.*, in Alexander *et al.*, *Immunity* 1:751-761, 1994.

For example, to confirm the capacity of a DNA minigene construct containing at least one HLA-A2 supermotif peptide to induce CTLs *in vivo*, HLA-A2.1/K^b transgenic mice, for example, are immunized intramuscularly with 100 µg of naked cDNA. As a means of comparing the level of CTLs induced by cDNA immunization, a control group of animals is also immunized with an actual peptide composition that comprises multiple epitopes synthesized as a single polypeptide as they would be encoded by the minigene.

Splenocytes from immunized animals are stimulated twice with each of the respective compositions (peptide epitopes encoded in the minigene or the polyepitopic peptide), then assayed for peptide-specific cytotoxic activity in a ⁵¹Cr release assay. The results indicate the magnitude of the CTL response directed against the A2-restricted epitope, thus indicating the *in vivo* immunogenicity of the minigene vaccine and polyepitopic vaccine.

It is, therefore, found that the minigene elicits immune responses directed toward the HLA-A2 supermotif peptide epitopes as does the polyepitopic peptide vaccine. A similar analysis is also performed using other HLA-A3 and HLA-B7 transgenic mouse models to assess CTL induction by HLA-A3 and HLA-B7 motif or supermotif epitopes, whereby it is also found that the minigene elicits appropriate immune responses directed toward the provided epitopes.

To confirm the capacity of a class II epitope-encoding minigene to induce HTLs *in vivo*, DR transgenic mice, or for those epitopes that cross react with the appropriate mouse MHC molecule, I-A^b-restricted mice, for example, are immunized intramuscularly with 100 µg of plasmid DNA. As a means of comparing the level of HTLs induced by DNA immunization, a group of control animals is also immunized with an actual peptide composition emulsified in complete Freund's adjuvant. CD4⁺ T cells, *i.e.* HTLs, are purified from splenocytes of immunized animals and stimulated with each of the respective compositions (peptides encoded in the minigene). The HTL response is measured using a ³H-thymidine incorporation proliferation assay, (*see, e.g.*, Alexander *et al.* *Immunity* 1:751-761, 1994). The results indicate the magnitude of the HTL response, thus demonstrating the *in vivo* immunogenicity of the minigene.

DNA minigenes, constructed as described in the previous Example, can also be confirmed as a vaccine in combination with a boosting agent using a prime boost protocol. The boosting agent can consist of recombinant protein (*e.g.*, Barnett *et al.*, *Aids Res. and Human Retroviruses* 14, Supplement 3:S299-S309, 1998) or recombinant vaccinia, for example, expressing a minigene or DNA encoding the complete protein of interest (*see, e.g.*, Hanke *et al.*, *Vaccine* 16:439-445, 1998; Sedegah *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:7648-53, 1998; Hanke and McMichael, *Immunol. Letters* 66:177-181, 1999; and Robinson *et al.*, *Nature Med.* 5:526-34, 1999).

For example, the efficacy of the DNA minigene used in a prime boost protocol is initially evaluated in transgenic mice. In this example, A2.1/K^b transgenic mice are immunized IM with 100 µg of a DNA minigene encoding the immunogenic peptides including at least one HLA-A2 supermotif-bearing peptide. After an incubation period (ranging from 3-9 weeks), the mice are boosted IP with 10⁷ pfu/mouse of a recombinant vaccinia virus expressing the same sequence encoded by the DNA minigene. Control mice are immunized with 100 µg of DNA or recombinant vaccinia without the minigene sequence, or with DNA encoding the minigene, but without the vaccinia boost. After an additional incubation period of two weeks, splenocytes from the mice are immediately assayed for peptide-specific activity in an ELISPOT assay. Additionally, splenocytes are

WO 03/020954

PCT/US02/27760

stimulated *in vitro* with the A2-restricted peptide epitopes encoded in the minigene and recombinant vaccinia, then assayed for peptide-specific activity in an alpha, beta and/or gamma IFN ELISA.

It is found that the minigene utilized in a prime-boost protocol elicits greater immune responses toward the HLA-A2 supermotif peptides than with DNA alone. Such an analysis can also be performed using HLA-A11 or HLA-B7 transgenic mouse models to assess CTL induction by HLA-A3 or HLA-B7 motif or supermotif epitopes. The use of prime boost protocols in humans is described below in the Example entitled "Induction of CTL Responses Using a Prime Boost Protocol."

Example 22: Peptide Composition for Prophylactic Uses

Vaccine compositions of the present invention can be used to prevent 205P1B5 expression in persons who are at risk for tumors that bear this antigen. For example, a polypeptidic peptide epitope composition (or a nucleic acid comprising the same) containing multiple CTL and HTL epitopes such as those selected in the above Examples, which are also selected to target greater than 80% of the population, is administered to individuals at risk for a 205P1B5-associated tumor.

For example, a peptide-based composition is provided as a single polypeptide that encompasses multiple epitopes. The vaccine is typically administered in a physiological solution that comprises an adjuvant, such as Incomplete Freund's Adjuvant. The dose of peptide for the initial immunization is from about 1 to about 50,000 µg, generally 100-5,000 µg, for a 70 kg patient. The initial administration of vaccine is followed by booster dosages at 4 weeks followed by evaluation of the magnitude of the immune response in the patient, by techniques that determine the presence of epitope-specific CTL populations in a PBMC sample. Additional booster doses are administered as required. The composition is found to be both safe and efficacious as a prophylaxis against 205P1B5-associated disease.

Alternatively, a composition typically comprising transfecting agents is used for the administration of a nucleic acid-based vaccine in accordance with methodologies known in the art and disclosed herein.

Example 23: Polypeptidic Vaccine Compositions Derived from Native 205P1B5 Sequences

A native 205P1B5 polypeptide sequence is analyzed, preferably using computer algorithms defined for each class I and/or class II supermotif or motif, to identify "relatively short" regions of the polypeptide that comprise multiple epitopes. The "relatively short" regions are preferably less in length than an entire native antigen. This relatively short sequence that contains multiple distinct or overlapping, "nested" epitopes is selected; it can be used to generate a minigene construct. The construct is engineered to express the peptide, which corresponds to the native protein sequence. The "relatively short" peptide is generally less than 250 amino acids in length, often less than 100 amino acids in length, preferably less than 75 amino acids in length, and more preferably less than 50 amino acids in length. The protein sequence of the vaccine composition is selected because it has maximal number of epitopes contained within the sequence, *i.e.*, it has a high concentration of epitopes. As noted herein, epitope motifs may be nested or overlapping (*i.e.*, frame shifted relative to one another). For example, with overlapping epitopes, two 9-mer epitopes and one 10-mer epitope can be present in a 10 amino acid peptide. Such a vaccine composition is administered for therapeutic or prophylactic purposes.

The vaccine composition will include, for example, multiple CTL epitopes from 205P1B5 antigen and at least one HTL epitope. This polypeptidic native sequence is administered either as a peptide or as a nucleic

WO 03/020954

PCT/US02/27760

acid sequence which encodes the peptide. Alternatively, an analog can be made of this native sequence, whereby one or more of the epitopes comprise substitutions that alter the cross-reactivity and/or binding affinity properties of the polypeptidic peptide.

The embodiment of this example provides for the possibility that an as yet undiscovered aspect of immune system processing will apply to the native nested sequence and thereby facilitate the production of therapeutic or prophylactic immune response-inducing vaccine compositions. Additionally such an embodiment provides for the possibility of motif-bearing epitopes for an HLA makeup that is presently unknown. Furthermore, this embodiment (excluding an analoged embodiment) directs the immune response to multiple peptide sequences that are actually present in native 205P1B5, thus avoiding the need to evaluate any junctional epitopes. Lastly, the embodiment provides an economy of scale when producing peptide or nucleic acid vaccine compositions.

Related to this embodiment, computer programs are available in the art which can be used to identify in a target sequence, the greatest number of epitopes per sequence length.

15 Example 24: Polypeptidic Vaccine Compositions From Multiple Antigens

The 205P1B5 peptide epitopes of the present invention are used in conjunction with epitopes from other target tumor-associated antigens, to create a vaccine composition that is useful for the prevention or treatment of cancer that expresses 205P1B5 and such other antigens. For example, a vaccine composition can be provided as a single polypeptide that incorporates multiple epitopes from 205P1B5 as well as tumor-associated antigens that are often expressed with a target cancer associated with 205P1B5 expression, or can be administered as a composition comprising a cocktail of one or more discrete epitopes. Alternatively, the vaccine can be administered as a minigene construct or as dendritic cells which have been loaded with the peptide epitopes *in vitro*.

25 Example 25: Use of peptides to evaluate an immune response

Peptides of the invention may be used to analyze an immune response for the presence of specific antibodies, CTL or HTL directed to 205P1B5. Such an analysis can be performed in a manner described by Ogg *et al.*, *Science* 279:2103-2106, 1998. In this Example, peptides in accordance with the invention are used as a reagent for diagnostic or prognostic purposes, not as an immunogen.

In this example highly sensitive human leukocyte antigen tetrameric complexes ("tetramers") are used for a cross-sectional analysis of, for example, 205P1B5 HLA-A*0201-specific CTL frequencies from HLA A*0201-positive individuals at different stages of disease or following immunization comprising an 205P1B5 peptide containing an A*0201 motif. Tetrameric complexes are synthesized as described (Musey *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 337:1267, 1997). Briefly, purified HLA heavy chain (A*0201 in this example) and β 2-microglobulin are synthesized by means of a prokaryotic expression system. The heavy chain is modified by deletion of the transmembrane-cytosolic tail and COOH-terminal addition of a sequence containing a BirA enzymatic biotinylation site. The heavy chain, β 2-microglobulin, and peptide are refolded by dilution. The 45-kD refolded product is isolated by fast protein liquid chromatography and then biotinylated by BirA in the presence of biotin (Sigma, St. Louis, Missouri), adenosine 5' triphosphate and magnesium. Streptavidin-phycoerythrin conjugate is added in a 1:4 molar ratio, and the tetrameric product is concentrated to 1 mg/ml. The resulting product is referred to as tetramer-phycoerythrin.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

For the analysis of patient blood samples, approximately one million PBMCs are centrifuged at 300g for 5 minutes and resuspended in 50 μ l of cold phosphate-buffered saline. Tri-color analysis is performed with the tetramer-phycoerythrin, along with anti-CD8-Tricolor, and anti-CD38. The PBMCs are incubated with tetramer and antibodies on ice for 30 to 60 min and then washed twice before formaldehyde fixation. Gates are applied to contain >99.98% of control samples. Controls for the tetramers include both A*0201-negative individuals and A*0201-positive non-diseased donors. The percentage of cells stained with the tetramer is then determined by flow cytometry. The results indicate the number of cells in the PBMC sample that contain epitope-restricted CTLs, thereby readily indicating the extent of immune response to the 205P1B5 epitope, and thus the status of exposure to 205P1B5, or exposure to a vaccine that elicits a protective or therapeutic response.

Example 26: Use of Peptide Epitopes to Evaluate Recall Responses

The peptide epitopes of the invention are used as reagents to evaluate T cell responses, such as acute or recall responses, in patients. Such an analysis may be performed on patients who have recovered from 205P1B5-associated disease or who have been vaccinated with an 205P1B5 vaccine.

For example, the class I restricted CTL response of persons who have been vaccinated may be analyzed. The vaccine may be any 205P1B5 vaccine. PBMC are collected from vaccinated individuals and HLA typed. Appropriate peptide epitopes of the invention that, optimally, bear supermotifs to provide cross-reactivity with multiple HLA supertype family members, are then used for analysis of samples derived from individuals who bear that HLA type.

PBMC from vaccinated individuals are separated on Ficoll-Histopaque density gradients (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), washed three times in HBSS (GIBCO Laboratories), resuspended in RPMI-1640 (GIBCO Laboratories) supplemented with L-glutamine (2mM), penicillin (50U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), and Hepes (10mM) containing 10% heat-inactivated human AB serum (complete RPMI) and plated using microculture formats. A synthetic peptide comprising an epitope of the invention is added at 10 μ g/ml to each well and HBV core 128-140 epitope is added at 1 μ g/ml to each well as a source of T cell help during the first week of stimulation.

In the microculture format, 4×10^5 PBMC are stimulated with peptide in 8 replicate cultures in 96-well round bottom plate in 100 μ l/well of complete RPMI. On days 3 and 10, 100 μ l of complete RPMI and 20 U/ml final concentration of rIL-2 are added to each well. On day 7 the cultures are transferred into a 96-well flat-bottom plate and restimulated with peptide, rIL-2 and 10^5 irradiated (3,000 rad) autologous feeder cells. The cultures are tested for cytotoxic activity on day 14. A positive CTL response requires two or more of the eight replicate cultures to display greater than 10% specific ^{51} Cr release, based on comparison with non-diseased control subjects as previously described (Rehermann, *et al.*, *Nature Med.* 2:1104,1108, 1996; Rehermann *et al.*, *J. Clin. Invest.* 97:1655-1665, 1996; and Rehermann *et al.*, *J. Clin. Invest.* 98:1432-1440, 1996).

Target cell lines are autologous and allogeneic EBV-transformed B-LCL that are either purchased from the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI, Boston, MA) or established from the pool of patients as described (Guilhot, *et al.*, *J. Virol.* 66:2670-2678, 1992).

Cytotoxicity assays are performed in the following manner. Target cells consist of either allogeneic HLA-matched or autologous EBV-transformed B lymphoblastoid cell line that are incubated overnight with the synthetic peptide epitope of the invention at 10 μ M, and labeled with 100 μ Ci of ^{51} Cr (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) for 1 hour after which they are washed four times with HBSS.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Cytolytic activity is determined in a standard 4-h, split well ^{51}Cr release assay using U-bottomed 96 well plates containing 3,000 targets/well. Stimulated PBMC are tested at effector/target (E/T) ratios of 20-50:1 on day 14. Percent cytotoxicity is determined from the formula: $100 \times [(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})]$. Maximum release is determined by lysis of targets by detergent (2% Triton X-100; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Spontaneous release is <25% of maximum release for all experiments.

The results of such an analysis indicate the extent to which HLA-restricted CTL populations have been stimulated by previous exposure to 205P1B5 or an 205P1B5 vaccine.

Similarly, Class II restricted HTL responses may also be analyzed. Purified PBMC are cultured in a 96-well flat bottom plate at a density of 1.5×10^5 cells/well and are stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ synthetic peptide of the invention, whole 205P1B5 antigen, or PHA. Cells are routinely plated in replicates of 4-6 wells for each condition. After seven days of culture, the medium is removed and replaced with fresh medium containing 10U/ml IL-2. Two days later, 1 μCi ^3H -thymidine is added to each well and incubation is continued for an additional 18 hours. Cellular DNA is then harvested on glass fiber mats and analyzed for ^3H -thymidine incorporation. Antigen-specific T cell proliferation is calculated as the ratio of ^3H -thymidine incorporation in the presence of antigen divided by the ^3H -thymidine incorporation in the absence of antigen.

Example 27: Induction Of Specific CTL Response In Humans

A human clinical trial for an immunogenic composition comprising CTL and HTL epitopes of the invention is set up as an IND Phase I, dose escalation study and carried out as a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Such a trial is designed, for example, as follows:

A total of about 27 individuals are enrolled and divided into 3 groups:

Group I: 3 subjects are injected with placebo and 6 subjects are injected with 5 μg of peptide composition;

Group II: 3 subjects are injected with placebo and 6 subjects are injected with 50 μg peptide composition;

Group III: 3 subjects are injected with placebo and 6 subjects are injected with 500 μg of peptide composition.

After 4 weeks following the first injection, all subjects receive a booster inoculation at the same dosage. The endpoints measured in this study relate to the safety and tolerability of the peptide composition as well as its immunogenicity. Cellular immune responses to the peptide composition are an index of the intrinsic activity of this peptide composition, and can therefore be viewed as a measure of biological efficacy. The following summarize the clinical and laboratory data that relate to safety and efficacy endpoints.

Safety: The incidence of adverse events is monitored in the placebo and drug treatment group and assessed in terms of degree and reversibility.

Evaluation of Vaccine Efficacy: For evaluation of vaccine efficacy, subjects are bled before and after injection. Peripheral blood mononuclear cells are isolated from fresh heparinized blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation, aliquoted in freezing media and stored frozen. Samples are assayed for CTL and HTL activity.

The vaccine is found to be both safe and efficacious.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Example 28: Phase II Trials In Patients Expressing 205P1B5

Phase II trials are performed to study the effect of administering the CTL-HTL peptide compositions to patients having cancer that expresses 205P1B5. The main objectives of the trial are to determine an effective dose and regimen for inducing CTLs in cancer patients that express 205P1B5, to establish the safety of inducing a CTL and HTL response in these patients, and to see to what extent activation of CTLs improves the clinical picture of these patients, as manifested, e.g., by the reduction and/or shrinking of lesions. Such a study is designed, for example, as follows:

The studies are performed in multiple centers. The trial design is an open-label, uncontrolled, dose escalation protocol wherein the peptide composition is administered as a single dose followed six weeks later by a single booster shot of the same dose. The dosages are 50, 500 and 5,000 micrograms per injection. Drug-associated adverse effects (severity and reversibility) are recorded.

There are three patient groupings. The first group is injected with 50 micrograms of the peptide composition and the second and third groups with 500 and 5,000 micrograms of peptide composition, respectively. The patients within each group range in age from 21-65 and represent diverse ethnic backgrounds. All of them have a tumor that expresses 205P1B5.

Clinical manifestations or antigen-specific T-cell responses are monitored to assess the effects of administering the peptide compositions. The vaccine composition is found to be both safe and efficacious in the treatment of 205P1B5-associated disease.

Example 29: Induction of CTL Responses Using a Prime Boost Protocol

A prime boost protocol similar in its underlying principle to that used to confirm the efficacy of a DNA vaccine in transgenic mice, such as described above in the Example entitled "The Plasmid Construct and the Degree to Which It Induces Immunogenicity," can also be used for the administration of the vaccine to humans. Such a vaccine regimen can include an initial administration of, for example, naked DNA followed by a boost using recombinant virus encoding the vaccine, or recombinant protein/polypeptide or a peptide mixture administered in an adjuvant.

For example, the initial immunization may be performed using an expression vector, such as that constructed in the Example entitled "Construction of 'Minigene' Multi-Epitope DNA Plasmids" in the form of naked nucleic acid administered IM (or SC or ID) in the amounts of 0.5-5 mg at multiple sites. The nucleic acid (0.1 to 1000 µg) can also be administered using a gene gun. Following an incubation period of 3-4 weeks, a booster dose is then administered. The booster can be recombinant fowlpox virus administered at a dose of 5×10^7 to 5×10^9 pfu. An alternative recombinant virus, such as an MVA, canarypox, adenovirus, or adeno-associated virus, can also be used for the booster, or the polypeptidic protein or a mixture of the peptides can be administered. For evaluation of vaccine efficacy, patient blood samples are obtained before immunization as well as at intervals following administration of the initial vaccine and booster doses of the vaccine. Peripheral blood mononuclear cells are isolated from fresh heparinized blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation, aliquoted in freezing media and stored frozen. Samples are assayed for CTL and HTL activity. Analysis of the results indicates that a magnitude of response sufficient to achieve a therapeutic or protective immunity against 205P1B5 is generated.

Example 30: Administration of Vaccine Compositions Using Dendritic Cells (DC)

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Vaccines comprising peptide epitopes of the invention can be administered using APCs, or "professional" APCs such as DC. In this example, peptide-pulsed DC are administered to a patient to stimulate a CTL response *in vivo*. In this method, dendritic cells are isolated, expanded, and pulsed with a vaccine comprising peptide CTL and HTL epitopes of the invention. The dendritic cells are infused back into the patient to elicit CTL and HTL responses *in vivo*. The induced CTL and HTL then destroy or facilitate destruction, respectively, of the target cells that bear the 205P1B5 protein from which the epitopes in the vaccine are derived.

For example, a cocktail of epitope-comprising peptides is administered *ex vivo* to PBMC, or isolated DC therefrom. A pharmaceutical to facilitate harvesting of DC can be used, such as Progenipoiectin™ (Monsanto, St. Louis, MO) or GM-CSF/IL-4. After pulsing the DC with peptides, and prior to reinfusion into patients, the DC are washed to remove unbound peptides.

As appreciated clinically, and readily determined by one of skill based on clinical outcomes, the number of DC reinfused into the patient can vary (*see, e.g., Nature Med.* 4:328, 1998; *Nature Med.* 2:52, 1996 and *Prostate* 32:272, 1997). Although 2-50 x 10⁶ DC per patient are typically administered, larger number of DC, such as 10⁷ or 10⁸ can also be provided. Such cell populations typically contain between 50-90% DC.

In some embodiments, peptide-loaded PBMC are injected into patients without purification of the DC. For example, PBMC generated after treatment with an agent such as Progenipoiectin™ are injected into patients without purification of the DC. The total number of PBMC that are administered often ranges from 10⁸ to 10¹⁰. Generally, the cell doses injected into patients is based on the percentage of DC in the blood of each patient, as determined, for example, by immunofluorescence analysis with specific anti-DC antibodies. Thus, for example, if Progenipoiectin™ mobilizes 2% DC in the peripheral blood of a given patient, and that patient is to receive 5 x 10⁶ DC, then the patient will be injected with a total of 2.5 x 10⁸ peptide-loaded PBMC. The percent DC mobilized by an agent such as Progenipoiectin™ is typically estimated to be between 2-10%, but can vary as appreciated by one of skill in the art.

Ex vivo activation of CTL/HTL responses

Alternatively, *ex vivo* CTL or HTL responses to 205P1B5 antigens can be induced by incubating, in tissue culture, the patient's, or genetically compatible, CTL or HTL precursor cells together with a source of APC, such as DC, and immunogenic peptides. After an appropriate incubation time (typically about 7-28 days), in which the precursor cells are activated and expanded into effector cells, the cells are infused into the patient, where they will destroy (CTL) or facilitate destruction (HTL) of their specific target cells, *i.e.*, tumor cells.

Example 31: An Alternative Method of Identifying and Confirming Motif-Bearing Peptides

Another method of identifying and confirming motif-bearing peptides is to elute them from cells bearing defined MHC molecules. For example, EBV transformed B cell lines used for tissue typing have been extensively characterized to determine which HLA molecules they express. In certain cases these cells express only a single type of HLA molecule. These cells can be transfected with nucleic acids that express the antigen of interest, *e.g.* 205P1B5. Peptides produced by endogenous antigen processing of peptides produced as a result of transfection will then bind to HLA molecules within the cell and be transported and displayed on the cell's surface. Peptides are then eluted from the HLA molecules by exposure to mild acid conditions and their amino acid sequence determined, *e.g.*, by mass spectral analysis (*e.g., Kubo et al., J. Immunol.* 152:3913, 1994). Because the majority of peptides that bind a particular HLA molecule are motif-bearing, this is an alternative

WO 03/020954

PCT/US02/27760

modality for obtaining the motif-bearing peptides correlated with the particular HLA molecule expressed on the cell.

Alternatively, cell lines that do not express endogenous HLA molecules can be transfected with an expression construct encoding a single HLA allele. These cells can then be used as described, *i.e.*, they can then be transfected with nucleic acids that encode 205P1B5 to isolate peptides corresponding to 205P1B5 that have been presented on the cell surface. Peptides obtained from such an analysis will bear motif(s) that correspond to binding to the single HLA allele that is expressed in the cell.

As appreciated by one in the art, one can perform a similar analysis on a cell bearing more than one HLA allele and subsequently determine peptides specific for each HLA allele expressed. Moreover, one of skill would also recognize that means other than transfection, such as loading with a protein antigen, can be used to provide a source of antigen to the cell.

Example 32: Complementary Polynucleotides

Sequences complementary to the 205P1B5-encoding sequences, or any parts thereof, are used to detect, decrease, or inhibit expression of naturally occurring 205P1B5. Although use of oligonucleotides comprising from about 15 to 30 base pairs is described, essentially the same procedure is used with smaller or with larger sequence fragments. Appropriate oligonucleotides are designed using, *e.g.*, OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and the coding sequence of 205P1B5. To inhibit transcription, a complementary oligonucleotide is designed from the most unique 5' sequence and used to prevent promoter binding to the coding sequence. To inhibit translation, a complementary oligonucleotide is designed to prevent ribosomal binding to the 205P1B5-encoding transcript.

Example 33: Purification of Naturally-occurring or Recombinant 205P1B5 Using 205P1B5

Specific Antibodies

Naturally occurring or recombinant 205P1B5 is substantially purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for 205P1B5. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-205P1B5 antibody to an activated chromatographic resin, such as CNBr-activated SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech). After the coupling, the resin is blocked and washed according to the manufacturer's instructions.

Media containing 205P1B5 are passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of 205P1B5 (*e.g.*, high ionic strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt antibody/205P1B5 binding (*e.g.*, a buffer of pH 2 to pH 3, or a high concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate ion), and GCR.P is collected.

Example 34: Identification of Molecules Which Interact with 205P1B5

205P1B5, or biologically active fragments thereof, are labeled with 121 I Bolton-Hunter reagent. (See, *e.g.*, Bolton et al. (1973) Biochem. J. 133:529.) Candidate molecules previously arrayed in the wells of a multi-well plate are incubated with the labeled 205P1B5, washed, and any wells with labeled 205P1B5 complex are assayed. Data obtained using different concentrations of 205P1B5 are used to calculate values for the number, affinity, and association of 205P1B5 with the candidate molecules.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Example 35: *In Vivo* Assay for 205P1B5 Tumor Growth Promotion

The effect of the 205P1B5 protein on tumor cell growth is evaluated *in vivo* by gene overexpression in tumor-bearing mice. For example, SCID mice are injected subcutaneously on each flank with 1×10^6 of either PC3, TSUPR1, or DU145 cells containing tkNeo empty vector or 205P1B5. At least two strategies may be used:

(1) Constitutive 205P1B5 expression under regulation of a promoter such as a constitutive promoter obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), or from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, provided such promoters are compatible with the host cell systems, and (2) Regulated expression under control of an inducible vector system, such as ecdysone, tet, etc., provided such promoters are compatible with the host cell systems. Tumor volume is then monitored at the appearance of palpable tumors and followed over time to determine if 205P1B5-expressing cells grow at a faster rate and whether tumors produced by 205P1B5-expressing cells demonstrate characteristics of altered aggressiveness (e.g. enhanced metastasis, vascularization, reduced responsiveness to chemotherapeutic drugs).

Additionally, mice can be implanted with 1×10^5 of the same cells orthotopically to determine if 205P1B5 has an effect on local growth in the prostate or on the ability of the cells to metastasize, specifically to lungs, lymph nodes, and bone marrow.

The assay is also useful to determine the 205P1B5 inhibitory effect of candidate therapeutic compositions, such as for example, 205P1B5 intrabodies, 205P1B5 antisense molecules and ribozymes.

Example 36: 205P1B5 Monoclonal Antibody-mediated Inhibition of Prostate Tumors *In Vivo*

The significant expression of 205P1B5, in cancer tissues, together with its restrictive expression in normal tissues along with its expected cell surface expression makes 205P1B5 an excellent target for antibody therapy. Similarly, 205P1B5 is a target for T cell-based immunotherapy. Thus, the therapeutic efficacy of anti-205P1B5 mAbs in human prostate cancer xenograft mouse models is evaluated by using androgen-independent LAPC-4 and LAPC-9 xenografts (Craft, N., *et al.*, Cancer Res, 1999, 59(19): p. 5030-6) and the androgen independent recombinant cell line PC3-205P1B5 (see, e.g., Kaighn, M.E., *et al.*, Invest Urol, 1979, 17(1): p. 16-23).

Antibody efficacy on tumor growth and metastasis formation is studied, e.g., in a mouse orthotopic prostate cancer xenograft model. The antibodies can be unconjugated, as discussed in this Example, or can be conjugated to a therapeutic modality, as appreciated in the art. Anti-205P1B5 mAbs inhibit formation of both the androgen-dependent LAPC-9 and androgen-independent PC3-205P1B5 tumor xenografts. Anti-205P1B5 mAbs also retard the growth of established orthotopic tumors and prolonged survival of tumor-bearing mice. These results indicate the utility of anti-205P1B5 mAbs in the treatment of local and advanced stages of prostate cancer. (See, e.g., (Saffran, D., *et al.*, PNAS 10:1073-1078 or world wide web URL pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698)

Administration of the anti-205P1B5 mAbs led to retardation of established orthotopic tumor growth and inhibition of metastasis to distant sites, resulting in a significant prolongation in the survival of tumor-bearing mice. These studies indicate that 205P1B5 as an attractive target for immunotherapy and demonstrate the therapeutic potential of anti-205P1B5 mAbs for the treatment of local and metastatic prostate cancer. This

WO 03/020954

PCT/US02/27760

example demonstrates that unconjugated 205P1B5 monoclonal antibodies are effective to inhibit the growth of human prostate tumor xenografts grown in SCID mice; accordingly a combination of such efficacious monoclonal antibodies is also effective.

5 Tumor inhibition using multiple unconjugated 205P1B5 mAbs

Materials and Methods

205P1B5 Monoclonal Antibodies:

Monoclonal antibodies are raised against 205P1B5 as described in the Example entitled "Generation of 205P1B5 Monoclonal Antibodies (mAbs)." The antibodies are characterized by ELISA, Western blot, FACS, and immunoprecipitation for their capacity to bind 205P1B5. Epitope mapping data for the anti-205P1B5 mAbs, as determined by ELISA and Western analysis, recognize epitopes on the 205P1B5 protein.

Immunohistochemical analysis of prostate cancer tissues and cells with these antibodies is performed.

The monoclonal antibodies are purified from ascites or hybridoma tissue culture supernatants by Protein-G Sepharose chromatography, dialyzed against PBS, filter sterilized, and stored at -20°C. Protein determinations are performed by a Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA). A therapeutic monoclonal antibody or a cocktail comprising a mixture of individual monoclonal antibodies is prepared and used for the treatment of mice receiving subcutaneous or orthotopic injections of LAPC-9 prostate tumor xenografts.

Prostate Cancer Xenografts and Cell Lines

The LAPC-9 xenograft, which expresses a wild-type androgen receptor and produces prostate-specific antigen (PSA), is passaged in 6- to 8-week-old male ICR-severe combined immunodeficient (SCID) mice (Taconic Farms) by s.c. trocar implant (Craft, N., *et al.*, *supra*). Single-cell suspensions of LAPC-9 tumor cells are prepared as described in Craft, *et al.* The prostate carcinoma cell line PC3 (American Type Culture Collection) is maintained in DMEM supplemented with L-glutamine and 10% (vol/vol) FBS.

A PC3-205P1B5 cell population is generated by retroviral gene transfer as described in Hubert, R.S., *et al.*, STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(25): p. 14523-8. Anti-205P1B5 staining is detected by using an FITC-conjugated goat anti-mouse antibody (Southern Biotechnology Associates) followed by analysis on a Coulter Epics-XL flow cytometer.

Xenograft Mouse Models

Subcutaneous (s.c.) tumors are generated by injection of 1×10^6 LAPC-9, PC3, or PC3-205P1B5 cells mixed at a 1:1 dilution with Matrigel (Collaborative Research) in the right flank of male SCID mice. To test antibody efficacy on tumor formation, i.p. antibody injections are started on the same day as tumor-cell injections. As a control, mice are injected with either purified mouse IgG (ICN) or PBS; or a purified monoclonal antibody that recognizes an irrelevant antigen not expressed in human cells. In preliminary studies, no difference is found between mouse IgG or PBS on tumor growth. Tumor sizes are determined by vernier caliper measurements, and the tumor volume is calculated as length x width x height. Mice with s.c. tumors greater than 1.5 cm in diameter are sacrificed. PSA levels are determined by using a PSA ELISA kit (Anogen, Mississauga, Ontario). Circulating levels of anti-205P1B5 mAbs are determined by a capture ELISA kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). (See, e.g., (Saffran, D., *et al.*, PNAS 10:1073-1078 or world wide web URL pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698)

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Orthotopic injections are performed under anesthesia by using ketamine/xylazine. An incision is made through the abdominal muscles to expose the bladder and seminal vesicles, which then are delivered through the incision to expose the dorsal prostate. LAPC-9 cells (5×10^5) mixed with Matrigel are injected into each dorsal lobe in a 10- μ l volume. To monitor tumor growth, mice are bled on a weekly basis for determination of PSA levels. Based on the PSA levels, the mice are segregated into groups for the appropriate treatments. To test the effect of anti-205P1B5 mAbs on established orthotopic tumors, i.p. antibody injections are started when PSA levels reach 2–80 ng/ml.

Anti-205P1B5 mAbs Inhibit Growth of 205P1B5-Expressing Prostate-Cancer Tumors

The effect of anti-205P1B5 mAbs on tumor formation is tested by using the LAPC-9 orthotopic model. As compared with the s.c. tumor model, the orthotopic model, which requires injection of tumor cells directly in the mouse prostate, results in a local tumor growth, development of metastasis in distal sites, deterioration of mouse health, and subsequent death (Saffran, D., et al., PNAS supra; Fu, X., et al., Int J Cancer, 1992, 52(6): p. 987-90; Kubota, T., J Cell Biochem, 1994, 56(1): p. 4-8). The features make the orthotopic model more representative of human disease progression and allowed us to follow the therapeutic effect of mAbs on clinically relevant end points.

Accordingly, LAPC-9 tumor cells are injected into the mouse prostate, and 2 days later, the mice are segregated into two groups and treated with either: a) 50-2000 μ g, usually 200-500 μ g, of anti-205P1B5 Ab, or b) PBS three times per week for two to five weeks. Mice are monitored weekly for circulating PSA levels as an indicator of tumor growth.

A major advantage of the orthotopic prostate-cancer model is the ability to study the development of metastases. Formation of metastasis in mice bearing established orthotopic tumors is studied by IHC analysis on lung sections using an antibody against a prostate-specific cell-surface protein STEAP expressed at high levels in LAPC-9 xenografts (Hubert, R.S., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(25): p. 14523-8).

Mice bearing established orthotopic LAPC-9 tumors are administered 1000 μ g injections of either anti-205P1B5 mAb or PBS over a 4-week period. Mice in both groups are allowed to establish a high tumor burden (PSA levels greater than 300 ng/ml), to ensure a high frequency of metastasis formation in mouse lungs. Mice then are killed and their prostate and lungs are analyzed for the presence of LAPC-9 cells by anti-STEAP IHC analysis.

These studies demonstrate a broad anti-tumor efficacy of anti-205P1B5 antibodies on initiation and progression of prostate cancer in xenograft mouse models. Anti-205P1B5 antibodies inhibit tumor formation of both androgen-dependent and androgen-independent tumors as well as retarding the growth of already established tumors and prolong the survival of treated mice. Moreover, anti-205P1B5 mAbs demonstrate a dramatic inhibitory effect on the spread of local prostate tumor to distal sites, even in the presence of a large tumor burden. Thus, anti-205P1B5 mAbs are efficacious on major clinically relevant end points/PSA levels (tumor growth), prolongation of survival, and health.

Example 37: Comparison of 205P1B5 to Known Genes

205P1B5 is a 529 amino acid protein with a calculated MW of 59.7kDa, and pI of 5.69. As shown in Figure 4, 205P1B5 shows 100% identity to the human cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2 (gi :12734121). 205P1B5 is predicted to be a cell surface protein that functions as an ion transporter (Vizi ES and Lendvai B, Brain Res Brain Res Rev. 1999, 30:219; Shao Z and Yakel JL, J Physiol. 2000, 527:507). As

WO 03/020954

PCT/US02/27760

described by Vizi et Lendvai, nicotinic acetylcholine receptors participates in calcium and sodium signaling in both synaptic and non-synaptic locations (Vizi ES and Lendvai B. Brain Res Brain Res Rev. 1999, 30:219). The expression of nicotinic cholinergic receptors has been documented in small cell lung cancer, where they are functionally active and induce calcium flux in response to stimuli (Codignola A et al, FEBS Lett. 1994, 342:

5 286). Thus, substances that modulate the presence or effect of cholinergic receptors are used for diagnosis, prophylaxis, prognosis and/or treatment of a disease condition disclosed herein, such as a cancer listed in Table I.

Example 38: Identification of Potential Signal Transduction Pathways

10 Many mammalian proteins have been reported to interact with signaling molecules and to participate in regulating signaling pathways (J Neurochem. 2001; 76:217-223). Using immunoprecipitation and Western blotting techniques, proteins are identified that associate with 205P1B5 and mediate signaling events. Several pathways known to play a role in cancer biology can be regulated by several of these genes, including phospholipid pathways such as PI3K, AKT, etc, adhesion and migration pathways, including FAK, Rho, Rac-1, etc, as well as mitogenic/survival cascades such as ERK, p38, etc (Cell Growth Differ. 2000,11:279; J Biol Chem. 1999, 274:801; Oncogene 2000, 19:3003, J. Cell Biol. 1997, 138:913.). Using Western blotting techniques, the ability of 205P1B5 to regulate these pathways is examined. Cells expressing 205P1B5 and cells lacking these genes are either left untreated or stimulated with ions, channel activators, or antibodies. Cell lysates are analyzed using anti-phospho-specific antibodies (Cell Signaling, Santa Cruz Biotechnology) in order to detect phosphorylation and regulation of ERK, p38, AKT, PI3K, PLC and other signaling molecules.

20 When 205P1B5 plays a role in the regulation of signaling pathways, whether individually or communally, it is used as a target for diagnostic, preventative and therapeutic purposes.

To confirm that 205P1B5 directly or indirectly activates known signal transduction pathways in cells, luciferase (luc) based transcriptional reporter assays are carried out in cells expressing individual genes. These transcriptional reporters contain consensus-binding sites for known transcription factors that lie downstream of well-characterized signal transduction pathways. The reporters and examples of these associated transcription factors, signal transduction pathways, and activation stimuli are listed below.

1. NFkB-luc, NFkB/Rel; Ik-kinase/SAPK; growth/apoptosis/stress
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; growth/differentiation
3. AP-1-luc, FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; growth/apoptosis/stress
4. ARE-luc, androgen receptor; steroids/MAPK; growth/differentiation/apoptosis
5. p53-luc, p53; SAPK; growth/differentiation/apoptosis
6. CRE-luc, CREB/ATF2; PKA/p38; growth/apoptosis/stress

35 Gene-mediated effects are assayed in cells showing mRNA expression. Luciferase reporter plasmids can be introduced by lipid-mediated transfection (TFX-50, Promega). Luciferase activity, an indicator of relative transcriptional activity, is measured by incubation of cell extracts with luciferin substrate and luminescence of the reaction is monitored in a luminometer. Signaling pathways activated by 205P1B5 are mapped and used for the identification and validation of therapeutic targets. When these genes are involved in cell signaling, they are used as targets for diagnostic, preventative and therapeutic purposes.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Example 39: Involvement in Tumor Progression

205P1B5 can contribute to the growth of cancer cells. The role of 205P1B5 in tumor growth is investigated in a variety of primary and transfected cell lines including prostate, colon, bladder and kidney cell lines as well as NIH 3T3 cells engineered to stably express 205P1B5. Parental cells lacking 205P1B5 and cells expressing the gene are evaluated for cell growth using a well-documented proliferation assay (Fraser SP, Grimes JA, Djangoz MB. Prostate. 2000;44:61, Johnson DE, Ochieng J, Evans SL. Anticancer Drugs. 1996; 7:288). The proliferation of control 3T3 and 3T3-205P1B5 were compared using an Alamar blue assay. Control and 205P1B5 expressing cells were grown in 0.5% or 10% FBS and analyzed after 48 and 72 hours. As shown in figure 16, expression of 205P1B5 enhanced the proliferation of NIH 3T3 cells stably expressing 205P1B5.

These results indicate that 205P1B5 plays a critical role in tumor cell growth.

To confirm the role of 205P1B5 in the transformation process, the effect of 205P1B5 in colony forming assays is evaluated. Parental NIH3T3 cells lacking 205P1B5 are compared to NIH-3T3 cells expressing 205P1B5, using a soft agar assay under stringent and more permissive conditions (Song Z. et al. Cancer Res. 2000; 60:6730). It is found that 205P1B5 causes cellular transformation.

To confirm the role of 205P1B5 in invasion and metastasis of cancer cells, a well-established Transwell Insert System assay (Becton Dickinson) (Cancer Res. 1999; 59:6010) is used. Control cells, including prostate, colon, bladder and kidney cell lines lacking 205P1B5 are compared to cells expressing 205P1B5. Cells are loaded with the fluorescent dye, calcein, and plated in the top well of the Transwell insert coated with a basement membrane analog. Invasion is determined by fluorescence of cells in the lower chamber relative to the fluorescence of the entire cell population. It is found that 205P1B5 causes invasion.

205P1B5 can also play a role in cell cycle and apoptosis. Parental cells and cells expressing 205P1B5 are compared for differences in cell cycle regulation using a well-established BrdU assay (Abdel-Malek ZA. J Cell Physiol. 1988, 136:247). In short, cells are grown under both optimal (full serum) and limiting (low serum) conditions are labeled with BrdU and stained with anti-BrdU Ab and propidium iodide. Cells are analyzed for entry into the G1, S, and G2M phases of the cell cycle. Alternatively, the effect of stress on apoptosis is evaluated in control parental cells and cells expressing genes under consideration, including normal and tumor prostate, colon and lung cells. Engineered and parental cells are treated with various chemotherapeutic agents, such as etoposide, flutamide, etc, and protein synthesis inhibitors, such as cycloheximide. Cells are stained with annexin V-FITC and cell death is measured by FACS analysis. It is found that 205P1B5 adversely affects cell cycling and apoptosis.

The function of 205P1B5 is evaluated using anti-sense RNA technology coupled to the various functional assays described above, e.g. growth, invasion and migration. Anti-sense RNA oligonucleotides can be introduced into 205P1B5 expressing cells, thereby preventing the expression of 205P1B5. Control and anti-sense containing cells are analyzed for proliferation, invasion, migration, apoptotic and transcriptional potential. The local as well as systemic effects of the loss of 205P1B5 expression are evaluated. It is found that 205P1B5 expression adversely impacts properties such as proliferation, invasion, migration, apoptosis and transcription.

When 205P1B5 plays a role in cell growth, transformation, invasion or apoptosis, it is used as a target for diagnostic, preventative and therapeutic purposes.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Example 40: Regulation of Transcription

Several ion transporters have been shown to play a role in transcriptional regulation of eukaryotic genes. Regulation of gene expression can be evaluated by studying gene expression in cells expressing or lacking 205P1B5. For this purpose, two types of experiments are performed. In the first set of experiments, RNA from parental and gene-expressing cells are extracted and hybridized to commercially available gene arrays (Clontech) (Smid-Koopman, E, et al. Br. J. Cancer 2000 83:246). Resting cells as well as cells treated with ions, FBS or androgen are compared. Differentially expressed genes are identified in accordance with procedures known in the art. The differentially expressed genes are then mapped to biological pathways (see, e.g., Chen K et al. Thyroid. 2001. 11:41.).

In the second set of experiments, specific transcriptional pathway activation is evaluated using commercially available (Stratagene) luciferase reporter constructs including: NFkB-luc, SRE-luc, ELK1-luc, ARE-luc, p53-luc, and CRE-luc. These transcriptional reporters contain consensus binding sites for known transcription factors that lie downstream of well-characterized signal transduction pathways, and represent a good tool to ascertain pathway activation and screen for positive and negative modulators of pathway activation.

Thus, it is found that 205P1B5 adversely impacts gene regulation, and it is used as a target for diagnostic, prognostic, preventative and therapeutic purposes.

Example 41: Subcellular Localization and Cell Binding

Based on bioinformatic analysis and function, 205P1B5 is indicated to be located at the cell surface.

The cellular location of 205P1B5 is confirmed using subcellular fractionation techniques widely used in cellular biology (Storrie B, et al. Methods Enzymol. 1990;182:203-25). A variety of cell lines, including prostate, kidney and bladder cell lines can be separated into nuclear, cytosolic and membrane fractions. Gene expression and location in nuclei, heavy membranes (lysosomes, peroxisomes, and mitochondria), light membranes (plasma membrane and endoplasmic reticulum), and soluble protein fractions are tested using Western blotting techniques.

Alternatively, 293T cells are transfected with an expression vector encoding 205P1B5 HIS-tagged (PCDNA 3.1 MYC/HIS, Invitrogen), and the subcellular localization of 205P1B5 is confirmed by immunofluorescence. Alternatively, the location of the HIS-tagged 205P1B5 is followed by Western blotting to confirm the cell surface localization.

When 205P1B5 is localized to specific subcellular locale, such as the cell surface, it is used as a target for diagnostic, preventative and therapeutic purposes as appreciated by one of ordinary skill in the art.

Example 42: Protein and Ion Transporter Function

Based on bioinformatic analysis, 205P1B5 is indicated to function as a transporter. To confirm that 205P1B5 functions as an ion channel, FACS analysis and electrophysiology techniques are used (Gergely L, Cook L, Agnello V. Clin Diagn Lab Immunol. 1997;4:70; Skryma R, et al. J Physiol. 2000, 527: 71). Using FACS analysis and commercially available indicators (Molecular Probes), parental cells and cells expressing 205P1B5 are compared for their ability to transport calcium, sodium and potassium. Prostate, colon, bladder and kidney normal and tumor cell lines are used in these studies. For example cells loaded with calcium responsive

WO 03/020954

PCT/US02/27760

indicators such as Fluo4 and Fura red are incubated in the presence or absence of ions and analyzed by flow cytometry.

Information derived from these procedures confirms important mechanisms by which cancer cells are regulated by 205P1B5. 205P1B5 regulates prostate cancer growth by regulating intracellular levels of calcium. Of note, calcium channel inhibitors have been reported to induce the death of certain cancer cells, including prostate cancer cell lines (Batra S, Popper LD, Hartley-Asp B. Prostate. 1991,19: 299).

Using a modified rhodamine retention assay (Davies J et al. Science 2000, 290:2295; Leith C et al. Blood 1995, 86:2329) it is confirmed that 205P1B5 functions as a protein transporter. Cell lines, such as prostate, colon, bladder and kidney cancer and normal cells, expressing or lacking 205P1B5 are loaded with Calcein AM (Molecular Probes). Cells are examined over time for dye transport using a fluorescent microscope or fluorometer. Quantitation is performed using a fluorometer (Hollo Z. et al., Biochim. Biophys. Acta. 1994. 1191:384). Information obtained from such experiments determines that 205P1B5 serves to extrude chemotherapeutic drugs, such as doxorubicin, paclitaxel, etoposide, etc, from tumor cells, thereby lowering drug content and reducing tumor responsiveness to treatment. Such a system also determines that 205P1B5 functions in transporting small molecules.

When 205P1B5 functions as a transporter, it is used as a target for preventative, prognostic, diagnostic and/or therapeutic purposes as well as drug sensitivity/resistance.

Using electrophysiology, uninjected oocytes and oocytes injected with gene-specific cRNA are compared for ion channel activity. Patch/voltage clamp assays are performed on oocytes in the presence or absence of selected ions, including calcium, potassium, sodium, etc. Ion channel activators (such as cAMP/GMP, forskolin, TPA, etc) and inhibitors (such as calcicludine, conotoxin, TEA, tetrodotoxin, etc) confirm that 205P1B5 functions as an ion channel (Schweitz H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1994. 91:878; Skryma R. et al. Prostate. 1997. 33:112). Using similar techniques, it was recently demonstrated that hCaT induces calcium flux in 293T cells (Wissenbach, U., et al. J. Biol. Chem. 2001, 276: 19461). The magnitude of the flux shown in this paper was similar to the one observed in figure A, where hCaT was expressed in prostate cancer cells.

Thus, 205P1B5 functions as an ion channel, and it is used as a target for diagnostic, preventative, prognostic and therapeutic purposes.

30 **Example 43: Involvement in Cell-Cell Communication**

Cell-cell communication is essential in maintaining organ integrity and homeostasis, both of which become dysregulated during tumor formation and progression. Intercellular communications can be measured using two types of assays (J. Biol. Chem. 2000, 275:25207). In the first assay, cells loaded with a fluorescent dye are incubated in the presence of unlabeled recipient cells and the cell populations are examined under fluorescent microscopy. This qualitative assay measures the exchange of dye between adjacent cells. In the second assay system, donor and recipient cell populations are treated as above and quantitative measurements of the recipient cell population are performed by FACS analysis. Using these two assay systems, cells expressing or lacking 205P1B5 are compared and it is determined that 205P1B5 adversely impacts cellular communications. This assay also identifies small molecules and/or specific antibodies that modulate cell-cell communication.

Thus, 205P1B5 adversely impacts cell-cell communication, and it is used as a target for diagnostic, prognostic, preventative and therapeutic purposes.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Example 44: Protein-Protein Interaction

Several ion transporters have been shown to interact with other proteins, thereby forming a protein complex that can regulate ion transport, cell division, gene transcription, and cell transformation (Biochem Biophys Res Commun. 2000; 277: 611; J Biol Chem. 1999; 274: 20812). Using immunoprecipitation techniques as well as two yeast hybrid systems, proteins that associate with 205P1B5 are identified. Immunoprecipitates from cells expressing 205P1B5 and cells lacking 205P1B5 are compared for specific protein-protein associations. 205P1B5 may also associate with, for example, effector molecules, such as adaptor proteins, SNARE proteins, signaling molecules, syntaxins, ATPase subunits, etc (J Biol Chem. 1999; 274: 20812; Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:14523). Studies comparing 205P1B5 positive and 205P1B5 negative cells as well as studies comparing unstimulated/resting cells and cells treated with epithelial cell activators, such as cytokines, growth factors, androgen and anti-integrin Ab reveal unique interactions.

In addition, protein-protein interactions are confirmed using two yeast hybrid methodologies (see, e.g., Curr Opin Chem Biol. 1999, 3:64). A vector carrying a library of proteins fused to the activation domain of a transcription factor is introduced into yeast expressing a 205P1B5-DNA-binding domain fusion protein and a reporter construct. Protein-protein interaction is detected by colorimetric reporter activity. Specific association with effector molecules and transcription factors directs one of skill to the mode of action of 205P1B5, and thus identifies therapeutic, preventative and/or diagnostic targets for cancer. This and similar assays are also used to identify and screen for small molecules that interact with 205P1B5.

Thus, 205P1B5 associates with proteins or small molecules and is used as a target for diagnostic, prognostic, preventative and therapeutic purposes.

Example 45: Transcript Variants of 205P1B5

Transcript variants are variants of matured mRNA from the same gene by alternative transcription or alternative splicing. Alternative transcripts are transcripts from the same gene but start transcription at different points. Splice variants are mRNA variants spliced differently from the same transcript. In eukaryotes, when a multi-exon gene is transcribed from genomic DNA, the initial RNA is spliced to produce functional mRNA, which has only exons and is used for translation into an amino acid sequence. Accordingly, a given gene can have zero to many alternative transcripts and each transcript can have zero to many splice variants. Each transcript variant has a unique exon makeup, and can have different coding and/or non-coding (5' or 3' end) portions, from the original transcript. Transcript variants can code for similar or different proteins with the same or a similar function or may encode proteins with different functions, and may be expressed in the same tissue at the same time, or at different tissue, or at different times, proteins encoded by transcript variants can have similar or different cellular or extracellular localizations, i.e., be secreted.

Transcript variants are identified by a variety of art-accepted methods. For example, alternative transcripts and splice variants are identified in a full-length cloning experiment, or by use of full-length transcript and EST sequences. First, all human ESTs were grouped into clusters which show direct or indirect identity with each other. Second, ESTs in the same cluster were further grouped into sub-clusters and assembled into a consensus sequence. The original gene sequence is compared to the consensus sequence(s) or other full-length sequences. Each consensus sequence is a potential splice variant for that gene (see, e.g., Kan, Z., *et al.*, Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs, Genome Research,

WO 03/020954

PCT/US02/27760

2001 May, 11(5):889-900). Even when a variant is identified that is not a full-length clone, that portion of the variant is useful for antigen generation and for further cloning of the full-length splice variant, using techniques known in the art.

Moreover, computer programs are available in the art that identify transcript variants based on genomic sequences. Genomic-based transcript variant identification programs include FgenesH (A. Salamov and V. Solovyev, "Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA," *Genome Research*. 2000 April;10(4):516-22); Grail (world wide web URL //compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm) and GenScan (world wide web URL //genes.mit.edu/GENSCAN.html). For a general discussion of splice variant identification protocols see, e.g., Southan, C., A genomic perspective on human proteases, *FEBS Lett.* 2001 Jun 8; 498(2-3):214-8; de Souza, S.J., *et al.*, Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags, *Proc. Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7; 97(23):12690-3.

To further confirm the parameters of a transcript variant, a variety of techniques are available in the art, such as full-length cloning, proteomic validation, PCR-based validation, and 5' RACE validation, etc. (see e.g., Proteomic Validation: Brennan, S.O., *et al.*, Albumin banks peninsula: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry, *Biochem Biophys Acta*. 1999 Aug 17;1433(1-2):321-6; Ferranti P, *et al.*, Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, *Eur J Biochem*. 1997 Oct 1;249(1):1-7. For PCR-based Validation: Wellmann S, *et al.*, Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology, *Clin Chem*. 2001 Apr; 47(4):654-60; Jia, H.P., *et al.*, Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach, *Gene*. 2001 Jan 24; 263(1-2):211-8. For PCR-based and 5' RACE Validation: Brigle, K.E., *et al.*, Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms, *Biochem Biophys Acta*. 1997 Aug 7; 1353(2): 191-8).

It is known in the art that genomic regions are modulated in cancers. When the genomic region, to which a gene maps, is modulated in a particular cancer, the alternative transcripts or splice variants of the gene are modulated as well. Disclosed herein is that 205P1B5 has a particular expression profile related to cancer. Alternative transcripts and splice variants of 205P1B5 may also be involved in cancers in the same or different tissues, thus serving as tumor-associated markers/antigens.

Example 46: Single Nucleotide Polymorphisms of 205P1B5

A Single Nucleotide Polymorphism (SNP) is a single base pair variation in nucleotide sequences. At a specific point of the genome, there are four possible nucleotide base pairs: A/T, C/G, G/C and T/A. Genotype refers to the base pair make-up of one or more spots in the genome of an individual, while haplotype refers to base pair make-up of more than one varied spots on the same DNA molecule (chromosome in higher organism). SNPs that occur on a cDNA are called cSNPs. These cSNPs may change amino acids of the protein encoded by the gene and thus change the functions of the protein. Some SNPs cause inherited diseases and some others contribute to quantitative variations in phenotype and reactions to environmental factors including diet and drugs among individuals. Therefore, SNPs and/or combinations of alleles (called haplotypes) have many applications including diagnosis of inherited diseases, determination of drug reactions and dosage, identification of genes responsible for diseases and discovery of genetic relationship between individuals (P. Nowotny, J. M. Kwon and A. M. Goats, "SNP analysis to dissect human traits," *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001 Oct; 11(5):637-641; M. Pirmohamed and B. K. Park, "Genetic susceptibility to adverse drug reactions," *Trends Pharmacol. Sci.* 2001

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Jun; 22(6):298-305; J. H. Riley, C. J. Allan, E. Lai and A. Roses, "The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes," *Pharmacogenomics*. 2000 Feb; 1(1):39-47; R. Judson, J. C. Stephens and A. Windemuth, "The predictive power of haplotypes in clinical response," *Pharmacogenomics*. 2000 Feb; 1(1):15-26).

5 SNPs are identified by a variety of art-accepted methods (P. Bean, "The promising voyage of SNP target discovery," *Am. Clin. Lab.* 2001 Oct-Nov; 20(9):18-20; K. M. Weiss, "In search of human variation," *Genome Res.* 1998 Jul; 8(7):691-697; M. M. She, "Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies," *Clin. Chem.* 2001 Feb; 47(2):164-172). For example, SNPs are identified by sequencing DNA fragments that show polymorphism by gel-based methods such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).
10 They can also be discovered by direct sequencing of DNA samples pooled from different individuals or by comparing sequences from different DNA samples. With the rapid accumulation of sequence data in public and private databases, one can discover SNPs by comparing sequences using computer programs (Z. Gu, L. Hillier and P. Y. Kwok, "Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace," *Hum. Mutat.* 1998; 12(4):221-225).
15 SNPs can be verified and genotype or haplotype of an individual can be determined by a variety of methods including direct sequencing and high throughput microarrays (P. Y. Kwok, "Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001; 2:235-258; M. Kokoris, K. Dix, K. Moynihan, J. Matulis, B. Erwin, P. Grass, B. Hines and A. Dueterhoeft, "High-throughput SNP genotyping with the Masscode system," *Mol. Diagn.* 2000 Dec; 5(4):329-340).

20 Two variants are identified for 205P1B5. These are set forth in Figure 2 and Figure 3.

Throughout this application, various website data content, publications, patent applications and patents are referenced. (Websites are referenced by their Uniform Resource Locator, or URL, addresses on the World Wide Web.) The disclosures of each of these references are hereby incorporated by reference herein in their
25 entireties.

The present invention is not to be limited in scope by the embodiments disclosed herein, which are intended as single illustrations of individual aspects of the invention, and any that are functionally equivalent are within the scope of the invention. Various modifications to the models and methods of the invention, in addition
30 to those described herein, will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and teachings, and are similarly intended to fall within the scope of the invention. Such modifications or other embodiments can be practiced without departing from the true scope and spirit of the invention.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLES

5 **TABLE I: Tissues that Express 205P1B5 When Malignant Prostate****TABLE II: AMINO ACID ABBREVIATIONS**

10

SINGLE LETTER	THREE LETTER	FULL NAME
F	Phe	phenylalanine
L	Leu	leucine
S	Ser	serine
Y	Tyr	tyrosine
C	Cys	cysteine
W	Trp	tryptophan
P	Pro	proline
H	His	histidine
Q	Gln	glutamine
R	Arg	arginine
I	Ile	isoleucine
M	Met	methionine
T	Thr	threonine
N	Asn	asparagine
K	Lys	lysine
V	Val	valine
A	Ala	alanine
D	Asp	aspartic acid
E	Glu	glutamic acid
G	Gly	glycine

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE III: AMINO ACID SUBSTITUTION MATRIX

Adapted from the GCG Software 9.0 BLOSUM62 amino acid substitution matrix (block substitution matrix). The higher the value, the more likely a substitution is found in related, natural proteins. (See world wide web URL <http://icp.unibe.ch/manual/blosum62.html>)

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A		
9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C		
6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D			
5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E				
6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F					
6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G						
8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H							
4	-3	2	1	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I									
5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K									
4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L										
5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M											
6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N												
7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P													
5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q														
5	-1	-1	-3	-3	-2	R															
4	1	-2	-3	-2	S																
5	0	-2	-2	T																	
4	-3	-1	V																		
11	2	W																			
7	Y																				

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE IV A

SUPERMOTIFS	POSITION 2 (Primary Anchor)	POSITION 3 (Primary Anchor)	POSITION C Terminus (Primary Anchor)
A1	TLVMS		FWY
A2	LIVMATQ		IVMATL
A3	VSMA7LI		RK
A24	YFWIVLMT		FLYWLM
B7	P		VILRMWYA
B27	RHK		FYLWMIVA
B44	ED		FWYLIMVA
B58	ATS		FWYLIVMA
B62	QLIVMP		FWYMIVLA
MOTIFS			
A1	TSM		Y
A1		DEAS	Y
A2.1	LMVQIAT		VLMAT
A3	LMVISATFCGD		KYRHFA
A11	VTMLISAGNCDF		KRYH
A24	YFWM		FLIW
A*3101	MVTALIS		RK
A*3301	MVALRIST		RK
A*6801	AVTMSLI		RK
B*0702	P		LMFWYIV
B*3501	P		LMFWYIVA
B51	P		LIVFWYAM
B*5301	P		IMFWYALV
B*5401	P		ATIVLMFWY

5 Bolded residues are preferred, italicized residues are less preferred: A peptide is considered motif-bearing if it has primary anchors at each primary anchor position for a motif or supermotif as specified in the above table.

10 TABLE IV (B): HLA CLASS II SUPERMOTIF

1	6	9
W, F, Y, V, I, L	A, V, I, L, P, C, S, T	A, V, I, L, C, S, T, M, Y

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE IV (C): HLA Class II Motifs

		1° anchor 1	2	3	4	5	1° anchor 6	7	8	9
MOTIFS		FMYLIPW	M	T	W	I	VSTCPALIM	MH R		MH WDE
DR4	preferred									
	deleterious									
DR1	preferred	MELIPWY	C	CH	PAMQ PD	CWD	VMATSPILIC	M		AVM
	deleterious									
DR7	preferred	MFLIPWY	M	W	A		IVMSACTPPL	M		IV
	deleterious									
DR3	MOTIFS	1° anchor 1	2	3	1° anchor 4	5	1° anchor 6			
motif ^a		LIVMFY			D					
preferred		LIVMFAY			DNQEST		KRH			
motif ^b										
preferred		MELIPWY					VMSTACPILI			
DR										
Supern motif										
Italicized residues indicate less preferred or "tolerated" residues										

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE IV (D): HLA Class I Supramotifs

SUPER-MOTIFS	POSITION:	1	2	3	4	5	6	7	8	C-terminus
A1			^{1°} Anchor TILPMAS							^{1°} Anchor FWY
A2			^{1°} Anchor LIVM ⁴ ITQ							^{1°} Anchor LIVMAT
A3	preferred deleterious	DE (3/5); P (5/5)	^{1°} Anchor VSMAITLI	YTFW (4/5) DE (4/5)		YTFW (3/5)	YTFW (4/5)	P (4/5)		^{1°} Anchor RK
A24			^{1°} Anchor YTFWITLMT							^{1°} Anchor FIVHLM
B7	preferred deleterious	FWY (5/5) LIVM (3/5) DE (3/5); P (5/5); G (4/5); AG (5/5); QN (3/5)	^{1°} Anchor P	FWY (4/5)		DE (3/5)	G (4/5)	QN (4/5)	DE (4/5)	^{1°} Anchor VILFMTVA
B27			^{1°} Anchor RHK							^{1°} Anchor FVLMITVA
B44			^{1°} Anchor ED							^{1°} Anchor FWYLIIMVA
B58			^{1°} Anchor ATS							^{1°} Anchor FWYLIIVAA
B62			^{1°} Anchor QLITMP							^{1°} Anchor FWYDITVA

Italicized residues indicate less preferred or "tolerated" residues

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE IV (E): HLA Class I Motifs

	POSITION: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 C-terminus									
A1 9-mer	preferred deletions	GFY W	1 st Anchor STM	DEA	YFW	P	DEQN	YFW	or C-terminus 1 st Anchor Y	
A1 9-mer	preferred deletions	GRHK A	ASTCLIVM RHKDEPY	RHKLIVMP DEAS	ASTC DE	ASTC PQN	LIVM PG	DE GP	1 st Anchor Y	
A1 10-mer	preferred deletions	YFW GP	1 st Anchor STM	DEAQN	A	YFWQN	PASTC	GDE	P	1 st Anchor Y
A1 10-mer	preferred deletions	YFW RHK	STCLIVM RHKDEPY	RHKLIVM DEAS	DE	RHK A	RHKYFW PG	RHK G	YFW	1 st Anchor Y
A2.1 9-mer	preferred deletions	YFW DEP	1 st Anchor LMIVQ ₄₁₇	YFW	STC	YFW	A	P	1 st Anchor VLM ₄₁₇	
			DERKH	DERKH	DERKH	DERKH	DERKH	DERKH	DERKH	

Italicized residues indicate less preferred or "tolerated" residues

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE IV (E): HLA Class I Motifs, continued

	POSITION:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-Terminus
A2.1 10-mer	preferred	AYFW	I ² Anchor LWIPQ4 I	LVM	G		G		FYWL VIM		I ² Anchor VLLM417
A3	deleterious	DEP		DE	RKHA	P		RKH	DERKH	RKH	
	preferred	RHK	I ² Anchor IMKVIS4 TFCCGD	YFW	PRHKYFW	A	YFW		P		I ² Anchor KYRHP4
A11	deleterious	DEP		DE							
	preferred	A	I ² Anchor VTLMIS AGNCDF	YFW	YFW	A	YFW	YFW	P		I ² Anchor KRHH
A24	deleterious	DEP									
	preferred	YFWRHK	I ² Anchor YFWM	STC				YFW	YFW	G	I ² Anchor FLIW
9-mer	deleterious	DEG		DE	G	QNP	DERH K	G	AQN		
A24	preferred		I ² Anchor YFWM		P	YFWP		P			I ² Anchor FLIW
A3101	deleterious			GDE	QN	RHK	DE	A	QN	DEA	
	preferred	RHK	I ² Anchor MYTLLIS	YFW	P		YFW	YFW	AP		I ² Anchor RK
A3301	deleterious	DEP		DE		ADE	DE	DE	DE		
	preferred		I ² Anchor MV/ALF ST	YFW				AYFW			I ² Anchor RK
	deleterious	QIP		DE							

Italicized residues indicate less preferred or "tolerated" residues

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE IV (E): HLA Class I Motifs, continued

	POSITION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-Terminus
A6801	preferred	YFWSTC	¹ Anchor AVTASLI			YFWLIV M		YFW	P	¹ Anchor RK	
	deleterious	GP		DEG		RHK			A		
B0702	preferred	RHKFW Y	¹ Anchor P	RHK		RHK	RHK	RHK	PA	¹ Anchor LMFWTAlV	
	deleterious	DEQNP		DEP	DE	DE	GDE	QN	DE		
B3501	preferred	FWYLIV M	¹ Anchor P	FWY				FWY		¹ Anchor LMFWYIV A	
	deleterious	AGP				G	G				
B51	preferred	LIVMFW Y	¹ Anchor P	FWY	STC	FWY		G	FWY	¹ Anchor LIVFWTAM	
	deleterious	AGPDER HKSTC				DE	G	DEQN	GDE		
B5301	preferred	LIVMFW Y	¹ Anchor P	FWY	STC	FWY		LIVMFWY	FWY	¹ Anchor IMFWY/L V	
	deleterious	AGPQN									
B5401	preferred	FWY	¹ Anchor P	FWYL IVM		LIVM	G	RHKQN ALIVM	DE FWYAP	¹ Anchor ATVLMF WY	
	deleterious	GPQNDE		GDES TC		RHKDE	DE	QNDGE	DE		

Italicized residues indicate less preferred or "tolerated" residues. The information in this Table is specific for 9-mers unless otherwise specified.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE V				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A1, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	184	SIDVTFPPF	25.000	1.
2	55	HTETEDRLF	22.500	2.
3	80	TSDVVIVRF	15.000	3.
4	57	ETEDRLFKEH	11.250	4.
5	215	QMEQTVDLK	9.000	5.
6	323	LVIPLIGEY	5.000	6.
7	210	KIDLEQMEQ	2.500	7.
8	314	ITEHPSTS	2.250	8.
9	386	PVELCHPLR	1.800	9.
10	469	ALEGVHYIA	1.800	10.
11	409	DAEEREVVV	1.800	11.
12	481	RSEDADSSV	1.350	12.
13	244	KYDCCAEIY	1.250	13.
14	79	NTSDVVIVR	1.250	14.
15	255	VTYAFVIRR	1.250	15.
16	328	IGEYLLFTM	1.125	16.
17	280	SCLTVLVFY	1.000	17.
18	150	NADGEFAVT	1.000	18.
19	460	LLSPHMQK	1.000	19.
20	248	CAEYDPDVT	0.900	20.
21	416	VVEEDRWA	0.900	21.
22	450	KAEALLQEG	0.900	22.
23	212	DLEQMEQTV	0.900	23.
24	3	PSCPVLFSF	0.750	24.
25	115	WSDYKLRWN	0.750	25.
26	279	ISCLTVLVF	0.750	26.
27	455	LQEGELLIS	0.675	27.
28	124	PTDFGNITS	0.625	28.
29	232	AIVNATGTY	0.500	29.
30	95	LIDVDEKNQ	0.500	30.
31	389	LCHPLRLKL	0.500	31.
32	407	NVDAEEREV	0.500	32.
33	372	GCVPRWLLM	0.500	33.
34	97	DVDEKNQMM	0.500	34.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE V

HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A1, 9-mers

Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
35	360	HTMPHWVRG	0.500	35.
36	482	SEDADSSVK	0.500	36.
37	236	ATGTYNKK	0.500	37.
38	172	HWVPPAIYK	0.500	38.
39	272	LIIPCLIS	0.500	39.
40	140	IWIPDIVLY	0.500	40.
41	228	SGEWAIVNA	0.450	41.
42	486	DSSVKEDWK	0.300	42.
43	181	SSCIDVTF	0.300	43.
44	112	KQWSDYKYL	0.270	44.
45	142	IPDIVLYNN	0.250	45.
46	499	VIDRIFLWL	0.250	46.
47	5	CPVFLSFTK	0.250	47.
48	252	YPDVITYAFV	0.250	48.
49	457	EGELLSPH	0.225	49.
50	152	DGEFAVTHM	0.225	50.

TABLE VI

HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A1, 10-mers

Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	55	HTETEDRLFK	225.000	51.
2	248	CAEIYPDVTY	90.000	52.
3	481	RSEDADSSVK	27.000	53.
4	97	DVDEKNQMMT	2.500	54.
5	57	ETEDRLFKHL	2.250	55.
6	314	ITEIPSTSL	2.250	56.
7	250	EIYPDVITYAF	2.000	57.
8	279	ISCLTVLVFY	1.500	58.
9	112	KQWSDYKLR	1.350	59.
10	236	ATGTYNKKY	1.250	60.
11	150	NADGEFAVTH	1.000	61.
12	170	TVHWVPPAIY	1.000	62.
13	4	SCPVFLSFTK	1.000	63.
14	459	ELLSPHMQK	1.000	64.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE VI				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A1, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
15	416	VVEEEDRWAC	0.900	65.
16	26	GEEAKRPPPR	0.900	66.
17	486	DSSVKEDWKY	0.750	67.
18	183	CSIDVTFFPF	0.750	68.
19	80	TSDVVIVRFG	0.750	69.
20	252	YPDVTYAFVI	0.625	70.
21	95	LIDVDEKNQM	0.500	71.
22	476	IADHLRSEDA	0.500	72.
23	278	LISCLTVLVF	0.500	73.
24	484	DADSSVKEDW	0.500	74.
25	372	GCVPRWLLMN	0.500	75.
26	322	SLVIPLIGEY	0.500	76.
27	499	VIDRIFLWLF	0.500	77.
28	515	GTIGLFLPPF	0.500	78.
29	254	DVTYAFVIRR	0.500	79.
30	407	NVDAEREVV	0.500	80.
31	316	EHPSTSLVI	0.500	81.
32	210	KIDLEQMEQT	0.500	82.
33	79	NTSDVVIVRF	0.500	83.
34	219	TVDLKDYWES	0.500	84.
35	272	LIIPCLLISC	0.500	85.
36	231	WAIVNATGTY	0.500	86.
37	21	LTPAGGEEAK	0.500	87.
38	386	PVELCHPLRL	0.450	88.
39	457	EGELLLSPHM	0.450	89.
40	469	ALEGVHYIAD	0.450	90.
41	290	PSDCGEKITL	0.375	91.
42	446	ASGPKAEALL	0.300	92.
43	180	KSSCSIDVIF	0.300	93.
44	136	PSEMIWIPDI	0.270	94.
45	360	HTMPHWVRGA	0.250	95.
46	358	STHTMPHWVR	0.250	96.
47	157	VTHMTKAHLF	0.250	97.
48	339	VILSIVITVF	0.250	98.
49	259	FVIRRLPLFY	0.250	99.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE VI				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A1, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
50	228	SGEWAIVNAT	0.225	100.

TABLE VII				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A2, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	331	YLLFTMIFV	14974.754	101.
2	506	WLFHVCFL	4599.389	102.
3	281	CLTVLVFYL	1567.359	103.
4	303	VLLSLTVFL	739.032	104.
5	504	FLWLFIVC	679.693	105.
6	396	KLSPSYHWL	616.839	106.
7	513	FLGTIGLFL	540.469	107.
8	304	LLSLTVFLL	484.457	108.
9	103	QMMTTNVWL	313.968	109.
10	276	LLISCLTV	257.342	110.
11	332	LLFTMIFVT	256.368	111.
12	520	FLPPFLAGM	199.733	112.
13	454	LLQEGELL	148.896	113.
14	344	VITVFVLNV	142.093	114.
15	13	KLSLWWLLL	127.106	115.
16	518	GLFLPPFLA	106.613	116.
17	8	FLSFTKLSL	98.267	117.
18	468	KALEGVHYI	97.322	118.
19	306	SLTVFLLLI	91.183	119.
20	327	LIGEYLLFT	90.344	120.
21	379	LMNRPPFPV	85.394	121.
22	497	AMVIDRIFL	84.856	122.
23	336	MIFVTLIV	56.725	123.
24	370	LLGCVPRWL	39.948	124.
25	453	ALLQEGELL	38.730	125.
26	310	FLLITEII	35.673	126.
27	277	LLISCLTVL	34.246	127.
28	502	RIFLWLFII	29.030	128.
29	166	FSTGTIVHWV	26.419	129.
30	499	VIDRIFLWL	20.873	130.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE VII				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A2, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
31	461	LLSPHMQKA	19.425	131.
32	139	MIWIPDIVL	16.993	132.
33	313	LITEHPST	16.426	133.
34	278	LISCLTVLV	16.258	134.
35	342	SIVTVFVL	16.065	135.
36	339	VILSIVITV	13.975	136.
37	324	VIPLIGEYL	13.457	137.
38	134	RVPSEMIWI	11.548	138.
39	149	NNADGEFAV	10.797	139.
40	271	NLIPCLLI	10.433	140.
41	296	KITLCISVL	9.695	141.
42	84	VIVRFGLSI	9.267	142.
43	508	FIIVCFLGT	8.955	143.
44	488	SVKEDWKYV	8.165	144.
45	335	TMFVTLSI	7.535	145.
46	48	ALPQGGSHI	7.452	146.
47	252	YPDVTYAFV	6.892	147.
48	269	TINLIHCL	6.756	148.
49	358	STHTMPHWV	5.313	149.
50	517	IGLFLPPFL	4.824	150.

TABLE VIII				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A2, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	303	VLLSLTVFLL	1792.489	151.
2	331	YLLFTMFVT	693.701	152.
3	378	LLMNRPPPPV	437.482	153.
4	340	TLISIVTVFV	382.536	154.
5	370	LLGCVPRWLL	272.371	155.
6	332	LLFTIMFVTL	255.302	156.
7	89	GLSIAQLIDV	159.970	157.
8	498	MVIDRIFLWL	136.147	158.
9	277	LLISCLTVLV	118.238	159.
10	15	SLWWLLTPA	94.839	160.
11	343	IVITVFVLNV	90.423	161.

WO 03/020954

PCT/US02/2760

TABLE VIII				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A2, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
12	369	ALLGCVPRWL	86.945	162.
13	453	ALLQEGELL	79.041	163.
14	276	CLLSCLTVL	74.536	164.
15	460	LLSPHMQKA	71.872	165.
16	304	LLSLTVFLL	69.001	166.
17	338	FVTLIVITV	64.388	167.
18	327	LIGEYLLFTM	63.515	168.
19	13	KLSLWVLLT	59.989	169.
20	298	TLCISVLLSL	49.134	170.
21	335	TMIFVTLIV	47.369	171.
22	102	NQMMTTNVWL	44.076	172.
23	302	SVLSLTVFL	38.038	173.
24	280	SCLTVLVFYL	37.856	174.
25	461	LLSPHMQKAL	36.316	175.
26	312	LLITEHPST	29.137	176.
27	502	RIFLWLFIV	27.565	177.
28	288	YLPSCGEEKI	23.516	178.
29	263	RLPLFYTNL	21.362	179.
30	204	WTYDKAKIDL	17.906	180.
31	516	TIGFLPPFL	16.155	181.
32	148	YNNADGEFAV	12.113	182.
33	273	IPCLLISCL	11.485	183.
34	296	KILCISVLL	10.281	184.
35	496	VAMVIDRFL	10.264	185.
36	260	VIRRLIFYT	9.713	186.
37	300	CISVLLSLTV	9.563	187.
38	323	LVPLIGEYL	8.564	188.
39	284	VLVFLPSDC	8.446	189.
40	308	TVFLLITEI	7.769	190.
41	508	FIIVCFLGTI	7.497	191.
42	506	WLFHIVCFLG	7.356	192.
43	306	SLTVFLLIT	7.027	193.
44	504	FLWLFIVCF	6.544	194.
45	520	FLPPFLAGMI	6.239	195.
46	83	VVIVRFGLSI	5.897	196.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE VIII				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A2, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
47	257	YAFVIRRLPL	5.050	197.
48	324	VIPLIGEYLL	4.993	198.
49	490	KEDWKYVAMV	4.355	199.
50	487	SSVKEDWKYV	4.245	200.

TABLE IX				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A3, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	104	MMTINVLWK	180.000	201.
2	460	LLSPHMQK	90.000	202.
3	215	QMEQTVDLK	60.000	203.
4	198	KMKFGSWTY	36.000	204.
5	255	VTYAFVIRR	18.000	205.
6	506	WLFIVCFL	13.500	206.
7	518	GLFLPPFLA	13.500	207.
8	13	KLSLWWLL	10.800	208.
9	504	FLWLFIVC	9.000	209.
10	288	YLPSCGEEK	6.000	210.
11	119	KLRWNPTDF	6.000	211.
12	281	CLTVLVFYL	5.400	212.
13	306	SLTVFLLI	5.400	213.
14	304	LLSLTVFLL	5.400	214.
15	340	TLSIVITVF	4.500	215.
16	502	RIFLWLFII	4.050	216.
17	110	WLKQEWSDY	4.000	217.
18	236	ATGTYNSEK	3.000	218.
19	396	KLSPSYHWL	2.700	219.
20	93	AQLIDVDEK	2.700	220.
21	271	NLIIPCLLI	2.700	221.
22	335	TMIFVTLIS	2.700	222.
23	202	GSWTYDKAK	2.250	223.
24	332	LLFTMIFVT	2.250	224.
25	79	NTSDVVIVR	1.800	225.
26	184	SIDVTFFPF	1.800	226.
27	454	LLQEGELLL	1.800	227.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE IX				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A3, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
28	497	AMVIDRIFL	1.800	228.
29	513	FLGTIGLFL	1.800	229.
30	310	FLLLITEH	1.350	230.
31	277	LLISCLTVL	1.350	231.
32	388	ELCHPLRLK	1.350	232.
33	369	ALLGCVPRW	1.350	233.
34	469	ALEGVHYIA	1.350	234.
35	520	FLPPFLAGM	1.350	235.
36	8	FLSFTKLSL	1.200	236.
37	164	HLFSTGTVH	1.000	237.
38	190	FFPDQQNCK	1.000	238.
39	65	HLFRGYNRW	1.000	239.
40	453	ALLQEGELL	0.900	240.
41	516	TIGLELPPF	0.900	241.
42	132	SLRVPSEMI	0.900	242.
43	5	CPVFLSFTK	0.900	243.
44	139	MIWIFDIVL	0.900	244.
45	103	QMMITNVWL	0.900	245.
46	331	YLLFTMIFV	0.900	246.
47	303	VLLSLTVFL	0.900	247.
48	326	PLIGEYLLF	0.900	248.
49	342	SIVITVFVL	0.810	249.
50	260	VIRRLPLFY	0.800	250.

TABLE X				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A3, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	103	QMMITNVWLK	270.000	251.
2	110	WLKQEWSDYK	60.000	252.
3	459	ELLSPHMQK	27.000	253.
4	504	FLWLFIVCF	22.500	254.
5	332	LLFTMIFVTL	13.500	255.
6	303	VLLSLTVFLL	8.100	256.
7	61	RLFKHLFRGY	6.000	257.
8	441	HLHSGASGPK	6.000	258.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE X				
HLA Peptide Scoring Results - 205PIB5 - A3, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
9	346	TVFVLNVHHR	6.000	259.
10	304	LLSLTVFLLL	5.400	260.
11	263	RLPLFYTNL	3.600	261.
12	515	GTIGLFLPPF	3.038	262.
13	146	VLYNNADGEF	3.000	263.
14	139	MIWIPDIVLY	3.000	264.
15	370	LLGCVPRWLL	2.700	265.
16	298	TLCISVLLSL	2.700	266.
17	499	VIDRIFLWLF	2.700	267.
18	13	KLSLWWLLLT	2.700	268.
19	518	GLFLPPFLAG	2.700	269.
20	322	SLVIPLIGEY	2.700	270.
21	254	DVTYAFVIRR	2.160	271.
22	250	EYDPVITYAF	2.025	272.
23	55	HTETEDRLF	2.000	273.
24	453	ALLQEGELL	1.800	274.
25	89	GLSIAQLIDV	1.800	275.
26	153	GEFAVTHMTK	1.800	276.
27	15	SLWWLLTPA	1.500	277.
28	276	CLISCLTVL	1.350	278.
29	199	MKFGSWTYDK	1.350	279.
30	497	AMVIDRIFLW	1.350	280.
31	214	EQMEQTVDLK	1.215	281.
32	472	GVHYIADHLR	1.200	282.
33	259	FVIRRLPLFY	1.200	283.
34	373	CVPRWLLMNR	1.200	284.
35	278	LISCLTVLVF	1.200	285.
36	21	LTPAGGEEAK	1.000	286.
37	164	HLFSTGTVHW	1.000	287.
38	358	STHIMPHWVR	0.900	288.
39	235	NATGTYNKK	0.900	289.
40	265	PLFYTNLI	0.900	290.
41	394	RLKLSPSYHW	0.900	291.
42	138	EMIWIPDIVL	0.810	292.
43	396	KLSPSYHWLE	0.810	293.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE X
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A3, 10-mers

Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
44	498	MVIDRIFLWL	0.810	294.
45	331	YLLFTIMFVT	0.675	295.
46	336	MFVTLISIV	0.600	296.
47	502	RIFLWLFITV	0.600	297.
48	288	YLPSCDCGEKI	0.600	298.
49	92	IAQLIDVDEK	0.600	299.
50	170	TVHWVPPAIY	0.600	300.

TABLE XI
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A11, 9-mers

Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	460	LLSPHMQK	1.200	301.
2	200	KFGSWTYDK	1.200	302.
3	236	ATGTYNKK	1.000	303.
4	5	CPVFLSFTK	0.900	304.
5	93	AQLIDVDEK	0.900	305.
6	255	VTYAFVIRR	0.800	306.
7	104	MMTTNVWLK	0.800	307.
8	494	KYVAMVIDR	0.720	308.
9	190	PPDQQNCK	0.400	309.
10	288	YLPSCDCGEK	0.400	310.
11	215	QMEQTVDLK	0.400	311.
12	79	NTSDVVIVR	0.400	312.
13	22	TPAGGEEAK	0.200	313.
14	235	NATGTYNKK	0.200	314.
15	368	GALLGCVPR	0.180	315.
16	414	EVVVEEDR	0.180	316.
17	154	EFAVTHMTK	0.120	317.
18	254	DVTYAFVIR	0.120	318.
19	56	TETEDRLF	0.120	319.
20	134	RVPSEMTWI	0.120	320.
21	498	MVIDRIFLW	0.090	321.
22	374	VPRWLLMNR	0.080	322.
23	518	GLFLPPFLA	0.072	323.
24	502	RIFLWLFII	0.072	324.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XI				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A11, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
25	202	GSWTYDKAK	0.060	325.
26	172	HWVPPAIYK	0.060	326.
27	472	GVHYIADHL	0.060	327.
28	482	SEADSSVK	0.060	328.
29	347	VFVLNVHHR	0.060	329.
30	434	GTLCSHGHL	0.045	330.
31	169	GVVHWVPPA	0.045	331.
32	346	TVFVLNVHH	0.040	332.
33	386	PVELCHPLR	0.040	333.
34	64	KHLFRGYNR	0.036	334.
35	112	KQEWSDYKL	0.036	335.
36	415	VVVEEDRW	0.030	336.
37	323	LVIPLIGEY	0.030	337.
38	339	VTLSIVITV	0.030	338.
39	259	FVIRRLPLF	0.030	339.
40	302	SVLISLTVF	0.030	340.
41	82	DVVIVRFGL	0.027	341.
42	198	KMKFGSWTY	0.024	342.
43	13	KLSLWLLLL	0.024	343.
44	11	FTKLSLWWL	0.020	344.
45	495	YVAMVIDRI	0.020	345.
46	442	LHSGASGPK	0.020	346.
47	170	TVHWVPPAI	0.020	347.
48	111	LKQEWSDYK	0.020	348.
49	428	HVAPSVGTL	0.020	349.
50	85	IVRFGLSIA	0.020	350.

TABLE XII				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A11, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	55	HTETEDRLF	2.000	351.
2	103	QMMITNVWLK	1.600	352.
3	472	GVHYIADHLR	1.200	353.
4	21	LTPAGGEEAK	1.000	354.
5	346	TVFVLNVHHR	0.800	355.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XII				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A11, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
6	373	CVPRWLLMNR	0.800	356.
7	153	GEFAVTHMTK	0.720	357.
8	287	FYLPSCGGEK	0.600	358.
9	4	SCPVFLSFTK	0.600	359.
10	110	WLKQEWSDYK	0.400	360.
11	358	STHTMPHWVR	0.400	361.
12	441	HLHSGASGPK	0.400	362.
13	214	EQMEQTVDLK	0.360	363.
14	459	ELLSPHMQK	0.360	364.
15	254	DVTYAFVIRR	0.240	365.
16	189	FPFDQQNCK	0.200	366.
17	235	NATGTYNKK	0.200	367.
18	92	IAQLIDVDEK	0.200	368.
19	112	KQEWSDYKLR	0.180	369.
20	199	MKFGSWTYDK	0.080	370.
21	171	VHWVPPAIYK	0.080	371.
22	66	LFRGYNRWAR	0.080	372.
23	481	RSEDADSSVK	0.060	373.
24	343	IVITVFVLNV	0.060	374.
25	259	FVIRRLPLFY	0.060	375.
26	498	MVIDRIFLWL	0.060	376.
27	83	VVIVRFGLSI	0.060	377.
28	413	REVVVVEEDR	0.054	378.
29	502	RIFLWLFIV	0.048	379.
30	515	GTIGLFLPPF	0.045	380.
31	169	GTVHWVPPAI	0.045	381.
32	434	GTLCSHGHLH	0.045	382.
33	204	WTYDKAKIDL	0.040	383.
34	510	IVCFLGTIGL	0.040	384.
35	308	TVFLLLITEI	0.040	385.
36	234	VNATGTYNKK	0.040	386.
37	338	FVTLIVITV	0.040	387.
38	22	TPAGGEAKR	0.040	388.
39	488	SVKEDWKYVA	0.040	389.
40	334	FTMIFVTLIS	0.040	390.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XII				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A11, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
41	26	GEEAKRPPPR	0.036	391.
42	323	LVPLIGEYL	0.030	392.
43	302	SVLLSLTVFL	0.030	393.
44	89	GLSIAQLDV	0.024	394.
45	263	RLPLFYTNL	0.024	395.
46	394	RLKLSPSYHW	0.024	396.
47	351	NVHHRSPSTH	0.020	397.
48	11	FTKLSLWWLL	0.020	398.
49	365	WVRGALLGCV	0.020	399.
50	407	NVDAEEREVV	0.020	400.

TABLE XIII				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A24, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	256	TYAFVIRRL	280.000	401.
2	251	IYPDVITYAF	252.000	402.
3	205	TYDKAKIDL	200.000	403.
4	147	LYNNADGEF	165.000	404.
5	330	EYLLFTMIF	150.000	405.
6	87	RFGLSIAQL	40.000	406.
7	333	LFTMIFVTL	33.600	407.
8	258	AFVIRRLPL	30.000	408.
9	512	CFLGTIGLF	15.000	409.
10	112	KQEWSDYKL	13.200	410.
11	305	LSLTVFLLL	10.080	411.
12	244	KYDCCAIEY	10.000	412.
13	309	VFLLLITEI	9.900	413.
14	396	KLSPSYHWL	9.600	414.
15	337	IFVTLSIVI	9.000	415.
16	82	DVVIVRFGL	8.400	416.
17	270	INLIIPCLL	8.400	417.
18	324	VIPLIGEYL	8.400	418.
19	269	TINLIIPCL	8.400	419.
20	297	ITLCISVLL	8.400	420.
21	299	LCISVLLSL	8.400	421.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XIII				
HLA Peptide Scoring Results – 205PIB5 – A24, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
22	296	KITLCISVL	8.000	422.
23	13	KLSLWWLL	8.000	423.
24	474	HYIADHLRS	7.500	424.
25	69	GYNRWARPV	7.500	425.
26	239	TYNSKKYDC	7.500	426.
27	303	VLLSLTVFL	7.200	427.
28	214	EQMEQTVDL	7.200	428.
29	517	IGFLPPFL	7.200	429.
30	454	LLQEGELL	7.200	430.
31	266	LPYTINLI	7.000	431.
32	499	VIDRIFLWL	6.720	432.
33	452	EALLQEGEL	6.600	433.
34	389	LCHPLRLKL	6.336	434.
35	434	GTLCSHGHL	6.000	435.
36	342	SIVITVFVL	6.000	436.
37	1	MGPSCPVEL	6.000	437.
38	447	SGPKAEALL	6.000	438.
39	462	LSPHMQKAL	6.000	439.
40	453	ALLQEGELL	6.000	440.
41	497	AMVIDRIFL	6.000	441.
42	264	LPLFYTNL	6.000	442.
43	400	SYHWLESNV	6.000	443.
44	117	DYKLRWNPT	6.000	444.
45	325	IPLIGEYLL	6.000	445.
46	224	DYWESGEWA	6.000	446.
47	277	LLISCLTVL	6.000	447.
48	103	QMMITNVWL	6.000	448.
49	472	GVHYIADHL	5.600	449.
50	513	FLGTIGLFL	5.600	450.

TABLE XIV				
HLA Peptide Scoring Results – 205PIB5 – A24, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	494	KYVAMVIDRI	210.000	451.
2	224	DYWESGEWAI	60.000	452.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XIV				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - A24, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
3	512	CF LGTIGLFL	42.000	453.
4	7	VFLSFTKL SL	30.000	454.
5	10	SFTKL SLWWL	20.000	455.
6	87	RFGLSIAQLI	16.800	456.
7	258	AFVIRRLPLF	15.000	457.
8	498	MVIDRIFLWL	12.096	458.
9	263	RLPLFYTNL	12.000	459.
10	296	KITLCISVLL	11.200	460.
11	309	VFLLLITEH	10.500	461.
12	57	ETEDRLFKHL	10.368	462.
13	323	LVIPLIGEYL	10.080	463.
14	251	IYPDVTYAFV	9.000	464.
15	369	ALLGCVPRWL	8.400	465.
16	361	TMPHWVRGAL	8.400	466.
17	268	YTINLIIPCL	8.400	467.
18	471	EGVHYIADHL	8.400	468.
19	269	TINLIIPCLL	8.400	469.
20	505	LWLFHVCFL	8.400	470.
21	5	CPVFLSFTKL	7.920	471.
22	239	TYNSKKYDCC	7.500	472.
23	147	LYNNADGEFA	7.500	473.
24	330	EYLLFTMIFV	7.500	474.
25	273	IIPCLLSLCL	7.200	475.
26	302	SVLLSLTVFL	7.200	476.
27	280	SCLTVLVFYL	7.200	477.
28	304	LLSLTVFLLL	6.720	478.
29	332	LLFTMIFVTL	6.720	479.
30	267	FYTINLIIPC	6.000	480.
31	324	VIPLIGEYLL	6.000	481.
32	453	ALLQEGELL	6.000	482.
33	452	EALLQEGELL	6.000	483.
34	138	EMTWIPDIVL	6.000	484.
35	102	NQMMITINVWL	6.000	485.
36	341	LSIVITVFVL	6.000	486.
37	496	VAMVIDRIFL	6.000	487.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XIV				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – A24, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
38	276	CLLISCLTVL	6.000	488.
39	314	ITELPSTSL	6.000	489.
40	303	VLLSLTVFLL	6.000	490.
41	255	VTYAFVIRRL	5.600	491.
42	180	KSSCSIDVTF	5.600	492.
43	298	TLCSIVLLSL	5.600	493.
44	388	ELCHPLRLKL	5.280	494.
45	380	MNRPPPPVEL	5.280	495.
46	178	IYKSSCSIDV	5.000	496.
47	446	ASGPKAEALL	4.800	497.
48	318	IPSTSLVIPL	4.800	498.
49	11	FTKLSLWWLL	4.800	499.
50	516	TIGLFLPPFL	4.800	500.

TABLE XV				
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – B7, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	362	MPHWVRGAL	120.000	501.
2	33	PPRAPGDPL	120.000	502.
3	325	IPLIGEYLL	80.000	503.
4	274	IPCLLISCL	80.000	504.
5	264	LPLFYTNL	80.000	505.
6	82	DVVIVRFGL	30.000	506.
7	472	GVHYIADHL	20.000	507.
8	428	HVAPSVGTL	20.000	508.
9	497	AMVIDRIFL	18.000	509.
10	453	ALLQEGELL	12.000	510.
11	103	QMMTTNVWL	12.000	511.
12	446	ASGPKAEAL	12.000	512.
13	214	EQMEQTVDL	12.000	513.
14	452	EALLQEGEL	12.000	514.
15	371	LGCVPRWLL	9.000	515.
16	385	PPVELCHPL	8.000	516.
17	289	LPSDCGEKI	8.000	517.
18	521	LPFLAGMI	8.000	518.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XV

HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - B7, 9-mers

Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
19	77	VPNTSDVVI	8.000	519.
20	139	MIWIPDIVL	6.000	520.
21	389	LCHPLRLKL	6.000	521.
22	132	SLRVPSEMI	6.000	522.
23	365	WVRGALLGC	5.000	523.
24	85	IVRFGLSIA	5.000	524.
25	396	KLSPSYHWL	4.000	525.
26	297	ITLCISVLL	4.000	526.
27	511	VCFLGTIGL	4.000	527.
28	13	KLSLWWLLL	4.000	528.
29	281	CLTVLVFYL	4.000	529.
30	277	LLISCLTVL	4.000	530.
31	157	VTHMTKAHL	4.000	531.
32	324	VIPLIGEYL	4.000	532.
33	370	LLGCVPRWL	4.000	533.
34	11	FTKLSLWWL	4.000	534.
35	296	KITLCISVL	4.000	535.
36	1	MGPSCPVEL	4.000	536.
37	299	LCISVLLSL	4.000	537.
38	517	IGLFLPFFL	4.000	538.
39	506	WLFIVCEL	4.000	539.
40	270	INLIIPCLL	4.000	540.
41	8	FLSFTKLSL	4.000	541.
42	304	LLSLTVFLL	4.000	542.
43	434	GTLCSHGHL	4.000	543.
44	342	SIVITVFVL	4.000	544.
45	305	LSLTVFLLL	4.000	545.
46	447	SGPKAEALL	4.000	546.
47	75	RPVFNTSDV	4.000	547.
48	41	LSSPSPTAL	4.000	548.
49	454	LLQEGELLL	4.000	549.
50	462	LSPHMQKAL	4.000	550.

TABLE XVI

HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - B7, 10-mers

Rank	Start	Subsequence	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a	Seq.ID#

WO 03/020954

PCT/US02/27760

	Position	Residue Listing	Molecule Containing This Subsequence)	
1	362	MPHWVRGALL	80.000	551.
2	318	IPSTSLVIPL	80.000	552.
3	5	CPVFLSFTKL	80.000	553.
4	380	MNRPPPPVEL	60.000	554.
5	156	AVTHMTKAHL	60.000	555.
6	496	VAMVIDRIFL	54.000	556.
7	190	PPDQQNCKM	20.000	557.
8	498	MVIDRIFLWL	20.000	558.
9	302	SVLLSLTVFL	20.000	559.
10	510	IVCFLGTIGL	20.000	560.
11	323	LVPLIGEYL	20.000	561.
12	257	YAFVIRRLPL	18.000	562.
13	453	ALLQEGELL	12.000	563.
14	445	GASGPKAEAL	12.000	564.
15	32	PPRAPGDPL	12.000	565.
16	369	ALLGCVPRWL	12.000	566.
17	452	EALLQEGELL	12.000	567.
18	446	ASGPKAEALL	12.000	568.
19	102	NQMMTTNVWL	12.000	569.
20	365	WVRGALLGCV	10.000	570.
21	370	LLGCVPRWLL	9.000	571.
22	384	PPVELCHPL	8.000	572.
23	264	LPLFYTNLI	8.000	573.
24	138	EMIWIPDIVL	6.000	574.
25	388	ELCHPLRLKL	6.000	575.
26	361	TMPHWVRGAL	6.000	576.
27	280	SCLTVLVFYL	4.000	577.
28	273	IIPCLLISCL	4.000	578.
29	324	VIPLIGEYLL	4.000	579.
30	276	CLLISCLTVL	4.000	580.
31	77	VPNTSDVVIV	4.000	581.
32	471	EGVHYIADHL	4.000	582.
33	298	TLCISVLLSL	4.000	583.
34	461	LLSPHMQKAL	4.000	584.
35	204	WTYDKAKIDL	4.000	585.
36	516	TIGLFLPPFL	4.000	586.
37	296	KITLCISVLL	4.000	587.
38	304	LLSLTVFLLL	4.000	588.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XVI
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – B7, 10-mers

Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
39	332	LLFTMIFVTL	4.000	589.
40	303	VLLSLTVFLL	4.000	590.
41	269	TINLIIPCLL	4.000	591.
42	268	YTINLIIPCL	4.000	592.
43	263	RLPLFYTNL	4.000	593.
44	433	VGTLCSHGHL	4.000	594.
45	75	RPVPNTSDVV	4.000	595.
46	11	FTKLISLWLL	4.000	596.
47	255	VITYAFVIRRL	4.000	597.
48	53	GSHTETEDRL	4.000	598.
49	341	LSIVITVFVL	4.000	599.
50	39	DPLSSPSPTA	3.000	600.

TABLE XVII
HLA Peptide Scoring Results – 205P1B5 – B35, 9-mers

Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	208	KAKIDLEQM	54.000	601.
2	362	MPHWVRGAL	20.000	602.
3	325	IPLIGEYLL	20.000	603.
4	274	IPCLLSCL	20.000	604.
5	264	LPLFYTNL	20.000	605.
6	289	LPSDCGEKI	16.000	606.
7	487	SSVKEDWKY	15.000	607.
8	198	KMKFGSWTY	12.000	608.
9	131	TSLRVPSEM	10.000	609.
10	110	WLKQEWSDY	9.000	610.
11	75	RPVPNTSDV	8.000	611.
12	77	VPNTSDVVI	8.000	612.
13	521	LPPFLAGMI	8.000	613.
14	33	PPRAPGDPL	6.000	614.
15	260	VIRRLPLFY	6.000	615.
16	119	KLRWNPTDF	6.000	616.
17	305	LSLTVFLLL	5.000	617.
18	181	SSCSIDVTF	5.000	618.
19	41	LSSPSPTAL	5.000	619.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XVII				
HLA Peptide Scoring Results - 205PIB5 - B35, 9-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
20	279	ISCLTVLVF	5.000	620.
21	462	LSPHMQKAL	5.000	621.
22	446	ASGPKAEAL	5.000	622.
23	468	KALEGVHYI	4.800	623.
24	385	PPVELCHPL	4.000	624.
25	123	NPTDFGNIT	4.000	625.
26	382	RPPPVVELC	4.000	626.
27	452	ELLQEGEL	3.000	627.
28	11	FTKLSLWWL	3.000	628.
29	217	EQTVDLKDY	3.000	629.
30	496	VAMVIDRIF	3.000	630.
31	9	LSFTKLSLW	2.500	631.
32	396	KLSPSYHWL	2.000	632.
33	430	APSVGT LCS	2.000	633.
34	372	GCVPRWLLM	2.000	634.
35	520	FLPPFLAGM	2.000	635.
36	280	SCLTVLVFY	2.000	636.
37	323	LVPLIGEY	2.000	637.
38	398	SPSYHWLES	2.000	638.
39	214	EQMEQTVDL	2.000	639.
40	237	TGTYNKKY	2.000	640.
41	296	KITLCISVL	2.000	641.
42	2	GPSCPVELS	2.000	642.
43	174	VPFAIYKSS	2.000	643.
44	454	LLQEGELLL	2.000	644.
45	13	KLSLWWLLL	2.000	645.
46	39	DPLSSPSPT	2.000	646.
47	232	AIVNATGTY	2.000	647.
48	488	SVKEDWKYV	1.800	648.
49	415	VVVEEDRW	1.500	649.
50	80	TSDVVIVRF	1.500	650.

TABLE XVIII				
HLA Peptide Scoring Results - 205PIB5 - B35, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XVIII				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - B35, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
1	190	FPFDQQNCKM	80.000	651.
2	325	IPLIGEYLLF	30.000	652.
3	362	MPHWVRGALL	20.000	653.
4	318	IPSTSLVIPL	20.000	654.
5	2	GPSCPVFLSF	20.000	655.
6	5	CPVFLSFTKL	20.000	656.
7	486	DSSVKEDWKY	15.000	657.
8	180	KSSCSIDVTF	10.000	658.
9	356	SPSTHTMPHW	10.000	659.
10	183	CSIDVTFPPF	10.000	660.
11	279	ISCLTVLVFY	10.000	661.
12	466	MQKALEGVHY	9.000	662.
13	75	RPVPNTSDVV	8.000	663.
14	264	LPLFYINLI	8.000	664.
15	181	SSCSIDVTF	7.500	665.
16	77	VPNTSDVVIV	6.000	666.
17	231	WAIVNATGY	6.000	667.
18	341	LSIVITVFVL	5.000	668.
19	301	ISVLLSLTVF	5.000	669.
20	53	GSHTETEDRL	5.000	670.
21	446	ASGPKAEALL	5.000	671.
22	452	BALLQEGELL	4.500	672.
23	496	VAMVIDRIFL	4.500	673.
24	61	RLFKHLFRGY	4.000	674.
25	327	LIGEYLLFTM	4.000	675.
26	36	APGDPLSSPS	4.000	676.
27	123	NPTDFGNITS	4.000	677.
28	289	LPSDCGEKIT	4.000	678.
29	445	GASGPKAEAL	3.000	679.
30	394	RLKLSPSYHW	3.000	680.
31	380	MNRPPPPVEL	3.000	681.
32	202	GSWTYDKAKI	3.000	682.
33	257	YAFVIRRLPL	3.000	683.
34	139	MIWIPDIVLY	3.000	684.
35	11	FTKLSLWWLL	3.000	685.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XVIII				
HLA Peptide Scoring Results - 205P1B5 - B35, 10-mers				
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)	Seq.ID#
36	9	LSFTKLSLWW	2.500	686.
37	252	YPDVITYAFVI	2.400	687.
38	391	HPLRLKLSPS	2.000	688.
39	263	RLPLFYTNL	2.000	689.
40	498	MVIDRIFLWL	2.000	690.
41	79	NTSDVVIVRF	2.000	691.
42	174	VPPAIYKSSC	2.000	692.
43	398	SPSYHWLESN	2.000	693.
44	204	WTYDKAKIDL	2.000	694.
45	236	ATGIYNSKKY	2.000	695.
46	130	ITSLRVFSEM	2.000	696.
47	371	LGCVPFWLLM	2.000	697.
48	32	PPPRAPGDPL	2.000	698.
49	45	SPTALPQGGS	2.000	699.
50	259	FVIRRLPLFY	2.000	700.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Table XIX: Motifs and Post-translational Modifications of 20SP1B5

5	N-glycosylation site	
	Number of matches: 3	
	1	79-82 NTSD
	2	129-132 NITS
10	3	235-238 NATG
	Protein kinase C phosphorylation site	
	Number of matches: 3	
	1	132-134 SLR
15	2	242-244 SKK
	3	488-490 SVK
	Casein kinase II phosphorylation site	
	Number of matches: 4	
20	1	54-57 SHTE
	2	56-59 TETE
	3	406-409 SNVD
	4	488-491 SVKE
25	Tyrosine kinase phosphorylation site	
	468-475 KALEGVHY	
	N-myristoylation site	
	Number of matches: 7	
30	1	25-30 GGEEAK
	2	52-57 GGSHTT
	3	89-94 GLSIAQ
	4	128-133 GNITSL
35	5	238-243 GTYNISK
	6	368-373 GALLGC
	7	434-439 GTLCSH
	Neurotransmitter-gated ion-channels signature	
40	183-197 CSIDVITFFPDQQNC	
	BLOCKS	
	Neurotransmitter-gated ion-channel between aa 168-206	
	Neurotransmitter-gated ion-channel between aa 252-296	
45	PRINTS	
	Nicotinic acetylcholine receptor signature between aa 163-181--	
	Nicotinic acetylcholine receptor signature between aa 93-109	
50	Pfam	
	Neurotransmitter-gated ion-channel ligand binding domain between aa 59-265	
	Neurotransmitter-gated ion-channel transmembrane region between aa 272-520	

WO 03/020954

PCT/US02/2760

Table XX: Frequently Occurring Motifs			
Name	avrg. % identity	Description	Potential Function
<u>zf-C2H2</u>	34%	Zinc finger, C2H2 type	Nucleic acid-binding protein functions as transcription factor, nuclear location probable
<u>cytochrome_b_N</u>	68%	Cytochrome b(N-terminal)/b6/petB	membrane bound oxidase, generate superoxide
<u>ig</u>	19%	Immunoglobulin domain	domains are one hundred amino acids long and include a conserved intradomain disulfide bond.
<u>WD40</u>	18%	WD domain, G-beta repeat	tandem repeats of about 40 residues, each containing a Trp-Asp motif. Function in signal transduction and protein interaction
<u>PDZ</u>	23%	PDZ domain	may function in targeting signaling molecules to sub-membranous sites
<u>LRR</u>	28%	Leucine Rich Repeat	short sequence motifs involved in protein-protein interactions
<u>kinase</u>	23%	Protein kinase domain	conserved catalytic core common to both serine/threonine and tyrosine protein kinases containing an ATP binding site and a catalytic site
<u>PH</u>	16%	PH domain	pleckstrin homology involved in intracellular signaling or as constituents of the cytoskeleton
<u>EGF</u>	34%	EGF-like domain	30-40 amino-acid long found in the extracellular domain of membrane-bound proteins or in secreted proteins
<u>RT</u>	49%	Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase)	
<u>ank</u>	25%	Ank repeat	Cytoplasmic protein, associates integral membrane proteins to the cytoskeleton
<u>oxidored_q1</u>	32%	NADH-Ubiquinone/plastoquinone (complex I), various chains	membrane associated. Involved in proton translocation across the membrane

WO 03/020954

PCT/US02/27760

<u>efhand</u>	24%	EF hand	calcium-binding domain, consists of a 12 residue loop flanked on both sides by a 12 residue alpha-helical domain
<u>asp</u>	79%	Retroviral aspartyl protease	Aspartyl or acid proteases, centered on a catalytic aspartyl residue
<u>Collagen</u>	42%	Collagen triple helix repeat (20 copies)	extracellular structural proteins involved in formation of connective tissue. The sequence consists of the G-X-Y and the polypeptide chains forms a triple helix.
<u>fn3</u>	20%	Fibronectin type III domain	Located in the extracellular ligand-binding region of receptors and is about 200 amino acid residues long with two pairs of cysteines involved in disulfide bonds
<u>7tm_1</u>	19%	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)	seven hydrophobic transmembrane regions, with the N-terminus located extracellularly while the C-terminus is cytoplasmic. Signal through G proteins

WO 03/020954

PCT/US02/27760

TABLE XXI: Properties of 205P1B5

Feature	Bioinformatic Program	World wide web URL	Outcome
ORF (includes stop codon)	ORF finder	ncbi.nlm.nih.gov/	See Figure 2; 555-2144
# of amino acids			529 amino acids
Transmembrane region	TM Pred	ch.embnet.org/	5 transmembrane domains
	HMMTop	enzim.hu/hmmtop/	4 transmembrane domains
	Sosui	genome.ad.jp/SOSui/	5 transmembrane domains
	TMHMM	chb.dtu.dk/services/TMHMM	5 transmembrane domains
Signal Peptide	Signal P	chb.dtu.dk/services/SignalP/	Signal sequence aa 1-26
pI	pI/MW tool	expasy.ch/tools/	pI 5.69
Molecular weight	pI/MW tool	expasy.ch/tools/	59.76 kDa
Localization	PSORT	psort.nibb.ac.jp/	plasma membrane 0.600 mitochondrial membrane 0.400
	PSORT II	psort.nibb.ac.jp/	Plasma membrane 22.2% endoplasmic reticulum 33.3%
Motifs	Pfam	sanger.ac.uk/Pfam/	Neurotransmitter-gated ion-channel
	Prints	biochem.ucl.ac.uk/	Nicotinic acetylcholine receptor signature
	Blocks	blocks.fhcrc.org/	Neurotransmitter-gated ion-channel
	Prosite	genome.ad.jp/	Neurotransmitter-gated ion-channels

5

WO 03/020954

PCT/US02/27760

CLAIMS:

1. A composition comprising:
 5 a substance that a) modulates the status of a protein of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21), or b) a molecule that is modulated by a protein of Figure 2, whereby the status of a cell that expresses a protein of Figure 2 is modulated.
2. A composition of claim 1, further comprising a physiologically acceptable carrier.
- 10 3. A pharmaceutical composition that comprises the composition of claim 1 in a human unit dose form.
4. A composition of claim 1 wherein the substance comprises an antibody or fragment thereof
 15 that specifically binds to a protein that is related to a protein of Figure 2.
5. An antibody or fragment thereof of claim 4, which is monoclonal.
6. An antibody of claim 4, which is a human antibody, a humanized antibody or a chimeric
 20 antibody.
7. A non-human transgenic animal that produces an antibody of claim 4.
8. A hybridoma that produces an antibody of claim 5.
- 25 9. A method of delivering a cytotoxic agent or a diagnostic agent to a cell that expresses a protein of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21), said method comprising:
 providing the cytotoxic agent or the diagnostic agent conjugated to an antibody or fragment thereof of claim 4; and,
 30 exposing the cell to the antibody-agent or fragment-agent conjugate.
10. A composition of claim 1 wherein the substance comprises a polynucleotide that encodes an antibody or fragment thereof, either of which immunospecifically bind to a protein of Figure 2.
- 35 11. A composition of claim 1 wherein the substance comprises a protein related to a protein of Figure 2.
12. A protein of claim 11 that is at least 90% homologous to an entire amino acid sequence shown
 40 in Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21).
13. A composition of claim 1 wherein the substance comprises:

WO 03/020954

PCT/US02/27760

- 5
- a) a peptide of eight, nine, ten, or eleven contiguous amino acids of a protein of Figure 2;
 - b) a peptide of Tables V to XVIII (SEQ ID NOS: 46 - 1711);
 - c) a peptide of Tables XXII to XLVII (SEQ ID NOS: 1712 - 12547); or,
 - d) a peptide of Tables XLVIII to LI (SEQ ID NOS: 12548 - 15017).
14. A composition of claim 1 wherein the substance comprises a CTL polypeptide or an analog thereof, from the amino acid sequence of a protein of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21).
- 10 15. A composition of claim 14 further limited by a *proviso* that the epitope is not an entire amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NOS:).
16. A composition of claim 14 wherein the substance comprises a CTL polypeptide set forth in Tables V to XVIII (SEQ ID NOS: 46-1711).
- 15 17. A composition of claim 16 further limited by a *proviso* that the polypeptide is not an entire amino acid sequence of a protein of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21).
18. A composition of claim 1 wherein the substance comprises an antibody polypeptide epitope from an amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21).
- 20 19. A composition of claim 18 further limited by a *proviso* that the epitope is not an entire amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21).
- 25 20. A composition of claim 18 wherein the antibody epitope comprises a peptide region of at least 5 amino acids of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21) in any whole number increment up to the end of said peptide, wherein the epitope comprises an amino acid position selected from:
- a) an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Hydrophilicity profile of Figure 5,
 - b) an amino acid position having a value less than 0.5 in the Hydrophobicity profile of Figure 6;
 - 30 c) an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Percent Accessible Residues profile of Figure 7;
 - d) an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Average Flexibility profile of Figure 8;
 - e) an amino acid position having a value greater than 0.5 in the Beta-turn profile of Figure 9;
 - 35 f) a combination of at least two of a) through e);
 - g) a combination of at least three of a) through e);
 - h) a combination of at least four of a) through e); or
 - i) a combination of five of a) through e).
- 40 21. A composition of claim 20 further limited by a *proviso* that the epitope is not an entire amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21).

WO 03/020954

PCT/US02/27760

22. A polynucleotide that encodes a protein of claim 11.
23. A polynucleotide of claim 22 that comprises a nucleic acid molecule set forth in Figure 2.
- 5 24. A polynucleotide of claim 22 further limited by a *proviso* that the encoded protein is not an entire amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21).
25. A polynucleotide of claim 22 wherein T is substituted with U.
- 10 26. A composition of claim 1 wherein the substance comprises a polynucleotide that comprises a coding sequence of a nucleic acid sequence of Figure 2 (SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20).
27. A polynucleotide of claim 22 that further comprises an additional nucleotide sequence that encodes an additional protein of claim 11.
- 15 28. A composition comprising a polynucleotide that is fully complementary to a polynucleotide of claim 22.
29. A composition comprising a polynucleotide that is fully complementary to a polynucleotide of claim 25.
- 20 30. A composition comprising a polynucleotide that is fully complementary to a polynucleotide of claim 27.
- 25 31. A composition of claim 1 wherein the substance comprises a) a ribozyme that cleaves a polynucleotide having a 205P1B5 coding sequence, or b) a nucleic acid molecule that encodes the ribozyme; and, a physiologically acceptable carrier.
32. A composition of claim 1 wherein the substance comprises human T cells, wherein said T cells specifically recognize a 205P1B5 peptide subsequence in the context of a particular HLA molecule.
- 30 33. A method of inhibiting growth of cancer cells that express a protein of Figure 2, the method comprising:
administering to the cells the composition of claim 1.
- 35 34. A method of claim 33 of inhibiting growth of cancer cells that express a protein of Figure 2, the method comprising steps of:
administering to said cells an antibody or fragment thereof, either of which specifically bind to a 205P1B5-related protein.
- 40

WO 03/020954

PCT/US02/27760

35. A method of claim 33 of inhibiting growth of cancer cells that express a protein of Figure 2, the method comprising steps of:
administering to said cells a 205P1B5-related protein.

5 36. A method of claim 33 of inhibiting growth of cancer cells that express a protein of Figure 2, the method comprising steps of:
administering to said cells a polynucleotide comprising a coding sequence for a 205P1B5-related protein or comprising a polynucleotide complementary to a coding sequence for a 205P1B5-related protein.

10 37. A method of claim 33 of inhibiting growth of cancer cells that express a protein of Figure 2, the method comprising steps of:
administering to said cells a ribozyme that cleaves a polynucleotide that encodes a protein of Figure 2.

38. A method of claim 33 of inhibiting growth of cancer cells that express a protein of Figure 2
15 and a particular HLA molecule, the method comprising steps of:
administering human T cells to said cancer cells, wherein said T cells specifically recognize a peptide subsequence of a protein of Figure 2 while the subsequence is in the context of the particular HLA molecule.

39. A method of claim 33, the method comprising steps of:
20 administering a vector that delivers a nucleotide that encodes a single chain monoclonal antibody, whereby the encoded single chain antibody is expressed intracellularly within cancer cells that express a protein of Figure 2.

40. A method of generating a mammalian immune response directed to a protein of Figure 2, the
25 method comprising:
exposing cells of the mammal's immune system to a portion of
a) a 205P1B5-related protein and/or
b) a nucleotide sequence that encodes said protein,
whereby an immune response is generated to said protein.

30 41. A method of generating an immune response of claim 40, said method comprising:
providing a 205P1B5-related protein that comprises at least one T cell or at least one B cell epitope;
and,
contacting the epitope with a mammalian immune system T cell or B cell respectively, whereby the T
35 cell or B cell is activated.

42. A method of claim 41 wherein the immune system cell is a B cell, whereby the induced B cell generates antibodies that specifically bind to the 205P1B5-related protein.

40 43. A method of claim 41 wherein the immune system cell is a T cell that is a cytotoxic T cell (CTL), whereby the activated CTL kills an autologous cell that expresses the 205P1B5-related protein.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

44. A method of claim 41 wherein the immune system cell is a T cell that is a helper T cell (HTL), whereby the activated HTL secretes cytokines that facilitate the cytotoxic activity of a cytotoxic T cell (CTL) or the antibody-producing activity of a B cell.

5

45. A method for detecting, in a sample, the presence of a 205P1B5-related protein or a 205P1B5-related polynucleotide, comprising steps of:
contacting the sample with a substance of claim 1 that specifically binds to the 205P1B5-related protein or to the 205P1B5-related polynucleotide, respectively; and,
10 determining that there is a complex of the substance with the 205P1B5-related protein or the substance with the 205P1B5-related polynucleotide, respectively.

15

46. A method of claim 45 for detecting the presence of a 205P1B5-related protein in a sample comprising steps of:
contacting the sample with an antibody or fragment thereof either of which specifically bind to the 205P1B5-related protein; and,
determining that there is a complex of the antibody or fragment thereof and the 205P1B5-related protein.

20

47. A method of claim 45 further comprising a step of:
taking the sample from a patient who has or who is suspected of having cancer.

25

48. A method of claim 45 for detecting the presence of a protein of Figure 2 mRNA in a sample comprising:
producing cDNA from the sample by reverse transcription using at least one primer;
amplifying the cDNA so produced using 205P1B5 polynucleotides as sense and antisense primers, wherein the 205P1B5 polynucleotides used as the sense and antisense primers serve to amplify a 205P1B5 cDNA; and,
detecting the presence of the amplified 205P1B5 cDNA.

30

49. A method of claim 45 for monitoring one or more 205P1B5 gene products in a biological sample from a patient who has or who is suspected of having cancer, the method comprising:
determining the status of one or more 205P1B5 gene products expressed by cells in a tissue sample from an individual;
35 comparing the status so determined to the status of one or more 205P1B5 gene products in a corresponding normal sample; and,
identifying the presence of one or more aberrant gene products of 205P1B5 in the sample relative to the normal sample.

40

50. The method of claim 49 further comprising a step of determining if there are one or more elevated gene products of a 205P1B5 mRNA or a 205P1B5 protein, whereby the presence of one or more

WO 03/020954

PCT/US02/27760

elevated gene products in the test sample relative to the normal tissue sample indicates the presence or status of a cancer.

5

51. A method of claim 50 wherein the cancer occurs in a tissue set forth in Table I.

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Figure 1

```
1   GATCTTNCCT ACCGGGAGG GATGGATGGT TGGATACAGG TGGCTGGGCT ATTCCATCCA
61  TMTGGAAGCA CATTGAGCC TCCAGGCTTC TCCTTGACGT CATTCTCTC CTTCCTTGT
121 GCAAAATGGC TCTGACCCAG CCGGCCCCCA GGAAGTCTGG CAGAGCTGAG AGCCATGGCC
181 TGNAGGGGCT CCATATGTCC CTACGGGTGC AGNAGGCAAA CAAGAAAGAC CATCCTGAGC
241 TGCTNCTGAC CCACCTCAAA CTCATTTCAT TTGGCCTGTC CTCCTCCC
```

PCT/US02/27760

Figure 2A. The cDNA (SEQ ID. NO. :) and amino acid sequence (SEQ ID. NO. :) of 20SP1B5 v.1. The start methionine is underlined. The open reading frame extends from nucleic acid 555-2144 including the stop codon.

1 gaggagacacacagagcctgtgtgtgttgtgtgtgtgagccctcattccctctctggggccac
61 cctctggggtttcaacctgcagaatcgtctgtgtctggggctgctggggctgtctcgaatgcac
121 ctcgatgaagccgctctgtgctctgcagagctgggacacgcctgaagaaacccacctctctgc
181 agagctgtcccaagctgtccctcgggagagcaaatcctctcatgtaagtcttctgtcgaat
241 gggggtgtctctcaaaacccaactcttcaagctctctgttgacatgaagtgaagtgaactga
301 gctctattctgtacctcctcaactcattcttgggggtgacttttgtcagtcggcgaagatct
361 ccaagcgcagctggtgtctctgtcgaattcttaaatgactcgttttctctgttgaaccacagat
421 tcggtgggtgagagagacatctcgcaagatcgacagcaaatctcaacagatcaacagacgacg
481 tctgtcggggacatggtccatggtgcacccacacgaagccgtgaactcgaactcctcga
1 MGSPSCPVFLSFTKLS
541 gctcagggagagacctTGGCGCCCTCTCTCTGTGTCTGTCTGCTCTCTTCAAAAGCTCAGCC
61 W W L L L T P A G G E B E A K R P P P R A
121 TGTGTGTGGCTCTTCAACCCAGCAGCTGGAGAGAGAACTAAGCGGCCCATCTCCAGCG
181 P G D P L L S S P S P T A A L P Q G G S H T
241 CTCCTGGAGACCCATCTCTCTCCATCTCCACGGCATCTGC3CAGGAGAGCTTCGCATA
301 E T E D R L F K H L F R G Y N N R W A R P
361 CGAGACTGGAGACCGGCTCTTCAACACCTCTCTCGGGGGCTCAACCGCTAGGCGCGCC
421 V P N T S D V I V I R F G L S A G G C G C C C
481 CGGTGCCCATCTTCAGACGCTGTGATGTGTGCGCTTGGGTGTCTCGATCTCACTAC
541 W V B Q W S
601 TCGATTGTGATGAGAGAACTAATGATGACCAACCAAGCTTGTGCTAARACAGAGATGGA
661 D Y K L N N P T D F G M I T S L R V P
721 CGCACTACAACCTGCGCTGGAACCCCACTGATTTGGCAACATACACATCTCTCAGGTC
781 C T S E M I N I P D I V L Y N N A D G G A P T
841 CTTCTGAGATGATCTGAGATCCCCGACATGTCTCTACAACAATGCAGATGGGAGATTG
901 V T H M T K A H L F S C T G T V H W V P D
961 CAGTGACCCCATGACCAAGGCCACCTCTCTTCTCAGGCACTGTGCACTTGGGTGCCCC
1021 A I Y K S S C S I D V T F P F P D Q N
1081 CGGCGATCTACAAGACCTCTCGCAGCATCTGACCTACCTTCTCCCTCTGCAGCAGAGA
1141 C K M K G S G W T Y D K A K I C I L L E Q M
1201 ACTCGACAGATGAAGTTTGGCTCTCGGATCTATGACAGGACCAAGATGACACTGAGCAGA
1261 E Q T V L K D Y W E S G E W A I V N A
1321 TGGAGCACTGTGCACTGGAAGCACTACTGGGAGCGGGGAGTGGGCCATGTGCTCAATG
1381 T G T Y N S K K Y D C C A B I Y P D V T
1441 CCACGGSGCACTCAACAGCAAGAAATGAGACTGTGCGCGCGAGATCTACCCGACATCA
1501 Y A F V I R I R R L P T Y T I N L I I P C
1561 CTTACGCTCTCGTCACTCCGCGCTGCTGCTCTTCTACACACATAA C T G A T C T C C C T
1621 L L I S L T V L V F Y Y L P S D C G E K
1681 GCTGCTCATCTCTGCTCATCTGTCTGTGCTTCTACTGTGCCCTCGACTTGGCGAGAG
1741 I T L T I S V L L S L T V L F L L I T B
1801 AGATCAGCTGTACATTTGGVLSCTGVCTACCTCAGCGTCTCTCTCTGTGTCATCTACTG
1861 I I F P S T S L V I P L I G E Y L L F T M
1921 AGATCATCTCGCTCCACTCTCGTGTCTCTCCGCTCATCGGAGAGTCACTGTGTCTACCA
1981 T G T V T L S I I T V V L N T
2041 TGATCTGTGCTCTCTGCTCTGCTCACTCAGGCTTGTGTGCTCAATGTGCACACCGCT
2101 S H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H
2161 CCCCAGCACCACCACTGACCTCCCCATGGTGGGGGGGCGCTTCTGGGCTGTGGTGGCCC
2221 W L M L N R P P P P P V E L L C H P L R L K
2281 GGTGCTCTTGATGAACCGCGCCCAACCCCTGGAGCTCTGCAACCCCTTACGCTTGA
2341 L S P S Y H W L L S N V D A E R E V V V
2401 AGCTCAGCCCCCTTATCACTCTGTGGAGACCACTGGATCTCCGAGAGAGAGAGAGGTG
417 V E E D R W A C A G H V A P S V G T L
1801 TGGTGGAGAGGAGAGACAGATGGGCACTGTGAGCTCATGTGCGCCCCCTCTGTGGGACACC
437 C S H G H L H S G A S G P K A E A L L

PCT/US02/27760

3/19

PCT/US02/27760

[illegible]

WO 03/020954

PCT/US02/27760

1981 TTGCCGACCACCTGCGGCTCTGAGGATGCTGACTCTTCGGTGAAGGAGGACTGGAAGTATG
497 A M V I D R I F L W L F I I V C F L G T
2041 TTGCCAIGGTCATCGACAGGAICTTCCTCTGGCTGTITATCATCGTCTGCTTCTTGGGGA
517 I G L F L P P F L A G M I *
2101 CCATCGGCTCTTTCTGCTCCGTTCCCTAGCTGGAAIGATCTGActgcaacctccctcgag
2161 ctggctcccaggsgcaaaagggagggtttcttggatgtggaagggtttgaacaatgkttag
2221 atttggagatgagcccaagtgccaggsgaacaagccaggtgaggtgggaggttgagagag
2261 ccagggtgaggtctctcctaagtcaggctggggttgaagtttgaggtctgtccgagtttgca
2341 ggggtctgagctgtatggccagcagsgggttaataagggtcttccggaaggsgagga
2401 ggggaggcaggcctgcacctgatgtggaggtacaggcagatcttccctacggggaggag
2461 atggatgggttgatacaggtgggtgggtatccatccatctggaagcaatttgagcct
2521 ccaggctctctcttgacgtcattctctctctctctctctctctgcaaaatggctctgaccagc
2581 cggcccccaggaggtctggcagagctgagagccatggcctgcagggtcccatatgtccc
2641 tacgcgtgcagcaggcaacaaga

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Figure 3

Figure 3A. Amino acid sequence of 205P1B5 v.1 (SEQ ID. NO. : ____). The 205P1B5 v.1 protein has 529 amino acids.

```

1  MGPSCPVFLS  FTKLSLWLL  LTPAGGEAK  RPPFRAPGDP  LSSPSPTALP  QGGSHTETED
61  RLPKHLFRGY  NRWARPVPNT  SDVVIVRFGL  SIAQLIDVDE  KNQMMTTNVW  LKQEWSDYKL
121  RWNPFDFGNI  TSLRVPSEMI  WIPDIVLYNN  ADGEFAVTHM  TKAHLFSTGT  VHWVPPAIYK
181  SSSCIDVTFF  PFDQQNCKMK  FGSWTYDKAK  IDLEQMEQTV  DLKDYWESGE  WAIVNATGTY
241  NSKKYDCCAE  IYPDVTYAFV  IRRLPLEFYTI  NLIIPCLLIS  CLTVLVFYL  P  SDGGEKITLC
301  ISVLLSLTVF  LLLITEIIPS  TSLVIPLIGE  YLLFTMIFVT  LSIVITVFVL  NVHHRSPSTH
361  TMPHWVRGAL  LGCVPRWLLM  NRPPPPVELC  HPLRLKLSPS  YHWLESNVDA  EEREVVVEEE
421  DRWACAGHVA  PSVGTLCSHG  HLHSGASGPK  AEALLQEGEL  LLSPHMQKAL  EGVHYIADHL
481  RSEDADSSVK  EDWKYVAMVI  DRIFLWLFII  VCFLGTIGLF  LPPFLAGMI

```

Figure 3B. Amino acid sequence of 205P1B5 v.2 (SEQ ID. NO. : ____). The 205P1B5 v.2 protein has 529 amino acids.

```

1  MGPSCPVFLS  FTKLSLWLL  LTPAGGEAK  RPPFRAPGDP  LSSPSPTALP  QGGSHTETED
61  RLPKHLFRGY  NRWARPVPNT  SDVVIVRFGL  SIAQLIDVDE  KNQMMTTNVW  LKQEWSDYKL
121  RWNPFDFGNI  TSLRVPSEMI  WIPDIVLYNN  ADGEFAVTHM  TKAHLFSTGT  VHWVPPAIYK
181  SSSCIDVTFF  PFDQQNCKMK  FGSWTYDKAK  IDLEQMEQTV  DLKDYWESGE  WAIVNATGTY
241  NSKKYDCCAE  IYPDVTYAFV  IRRLPLEFYTI  NLIIPCLLIS  CLTVLVFYL  P  SDGGEKITLC
301  ISVLLSLTVF  LLLITEIIPS  TSLVIPLIGE  YLLFTMIFVT  LSIVITVFVL  NVHHRSPSTH
361  TMPHWVRGAL  LGCVPRWLLM  NRPPPPVELC  HPLRLKLSPS  YHWLESNVDA  EEREVVVEEE
421  DRWACAGHVA  PSVGTLCSHG  HLHSGASGPK  AEALLQEGEL  LLSPHMQKAL  EGVHYIADHL
481  RSEDADSSVK  EDWKYVAMVI  DRIFLWLFII  VCFLGTIGLF  LPPFLAGMI

```


WO 03/020954

PCT/US02/27760

Figure 4

Figure 4: Alignment of 205P1B5 with cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2

Score = 1014 bits (2622), Expect = 0.0
Identities = 529/529 (100%), Positives = 529/529 (100%)

```

205P1B5: 1  MGPSCPVFLSFTKLSLWLLLTTPAGGEEAKRPPPRAPGDPSSPSPTALPQGGSHTEDED 60
                MGPSCPVFLSFTKLSLWLLLTTPAGGEEAKRPPPRAPGDPSSPSPTALPQGGSHTEDED
Sbjct: 1  MGPSCPVFLSFTKLSLWLLLTTPAGGEEAKRPPPRAPGDPSSPSPTALPQGGSHTEDED 60

205P1B5:61  RLFKHLFRGYNRWARFVNTSDVVIVRPGLSIAQLIDVDEKNQMMTTNVWLKQEWSDYKL 120
                RLFKHLFRGYNRWARFVNTSDVVIVRPGLSIAQLIDVDEKNQMMTTNVWLKQEWSDYKL
Sbjct: 61  RLFKHLFRGYNRWARFVNTSDVVIVRPGLSIAQLIDVDEKNQMMTTNVWLKQEWSDYKL 120

205P1B5:121  RWNPTDFGNITSLRVFSEMTWIPDIVLYNNADGEFAVTHMTKAHLFSTGTGVHVPPIAYK 180
                RWNPTDFGNITSLRVFSEMTWIPDIVLYNNADGEFAVTHMTKAHLFSTGTGVHVPPIAYK
Sbjct: 121  RWNPTDFGNITSLRVFSEMTWIPDIVLYNNADGEFAVTHMTKAHLFSTGTGVHVPPIAYK 180

205P1B5:181  SSCSIDVTFFFPDQQNCKMKFGSWTYDKAKIDLEQMEQTVDLKDYWESGEWAIVNATGY 240
                SSCSIDVTFFFPDQQNCKMKFGSWTYDKAKIDLEQMEQTVDLKDYWESGEWAIVNATGY
Sbjct: 181  SSCSIDVTFFFPDQQNCKMKFGSWTYDKAKIDLEQMEQTVDLKDYWESGEWAIVNATGY 240

205P1B5:241  NSKKYDCCAEIYPDVTYAFVIRRLPLEYTTINLIIPCLLISCLTVLVFPLPSDCGKKTLC 300
                NSKKYDCCAEIYPDVTYAFVIRRLPLEYTTINLIIPCLLISCLTVLVFPLPSDCGKKTLC
Sbjct: 241  NSKKYDCCAEIYPDVTYAFVIRRLPLEYTTINLIIPCLLISCLTVLVFPLPSDCGKKTLC 300

205P1B5:301  ISVLLSLTVFLLLIITEIIPSTSLVIPLIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFLNVHHRSPSTH 360
                ISVLLSLTVFLLLIITEIIPSTSLVIPLIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFLNVHHRSPSTH
Sbjct: 301  ISVLLSLTVFLLLIITEIIPSTSLVIPLIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFLNVHHRSPSTH 360

205P1B5:361  TMPHNVRGALLGCVPRWLLAMRPPPPVELCHPLRLKLSPSYHMLSNVDAEREVVEEE 420
                TMPHNVRGALLGCVPRWLLAMRPPPPVELCHPLRLKLSPSYHMLSNVDAEREVVEEE
Sbjct: 361  TMPHNVRGALLGCVPRWLLAMRPPPPVELCHPLRLKLSPSYHMLSNVDAEREVVEEE 420

205P1B5:421  DRWACAGHVAPSVGTLCSHGHLMSGASGPKAEALLQEGELLSPHMQKALBGVHYIADHL 480
                DRWACAGHVAPSVGTLCSHGHLMSGASGPKAEALLQEGELLSPHMQKALBGVHYIADHL
Sbjct: 421  DRWACAGHVAPSVGTLCSHGHLMSGASGPKAEALLQEGELLSPHMQKALBGVHYIADHL 480

205P1B5:481  RSEEDADSSVKEDMKYVAMVIDRIPLMLFIIVCFLTIGLFLPPFLAGMI 529
                RSEEDADSSVKEDMKYVAMVIDRIPLMLFIIVCFLTIGLFLPPFLAGMI
Sbjct: 481  RSEEDADSSVKEDMKYVAMVIDRIPLMLFIIVCFLTIGLFLPPFLAGMI 529

```

WO 03/020954

PCT/US02/27760

Figure 5: 205P1B5 Hydrophilicity profile
(Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828)

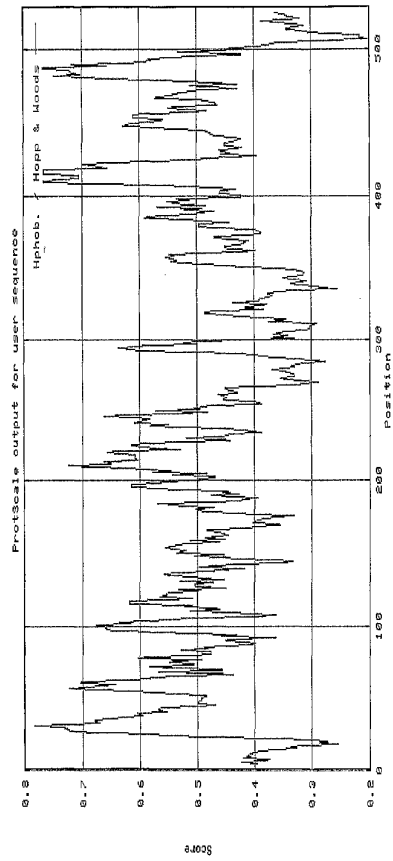
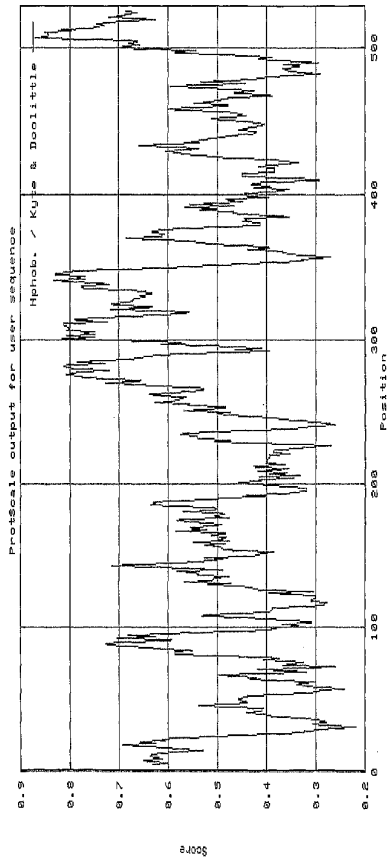


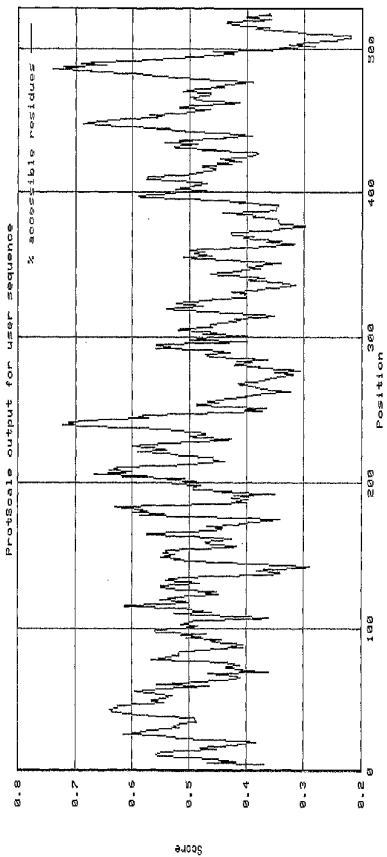
Figure 6: 205P1B5 Hydropathicity Profile
(Kyle J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132)



WO 03/020954

PCT/US02/27760

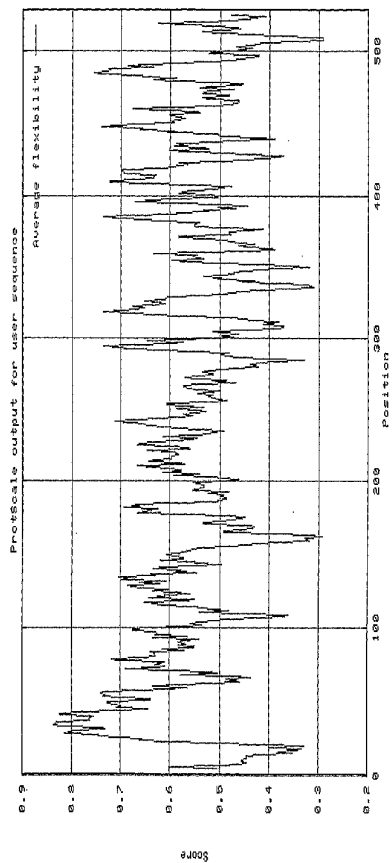
Figure 7: 205P1B5 % Accessible Residues Profile
(Janin J., 1979, Nature 277:491-492)



WO 03/020954

PCT/US02/27760

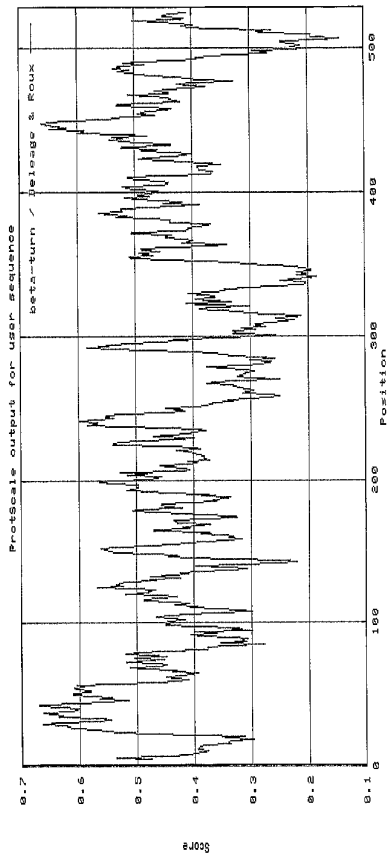
Figure 8: 205P1B5 Average Flexibility Profile
(Baskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988.
Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255)



WO 03/020954

PCT/US02/27760

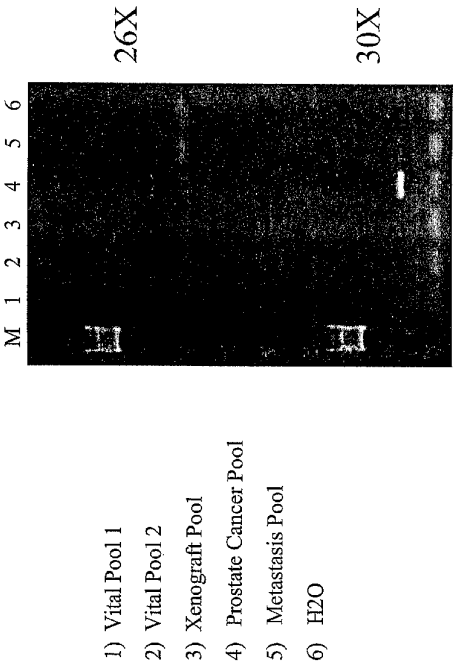
Figure 9: 205P1B5 Beta-turn Profile
(Deleage, G., Roux B. 1987. Protein Engineering 1:289-294)



WO 03/020954

PCT/US02/27760

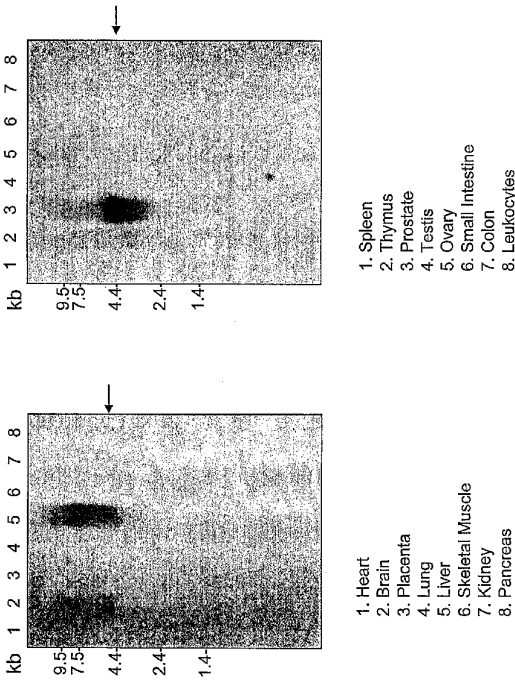
Figure 10 RT-PCR analysis of 205P1B5 expression



WO 03/020954

PCT/US02/27760

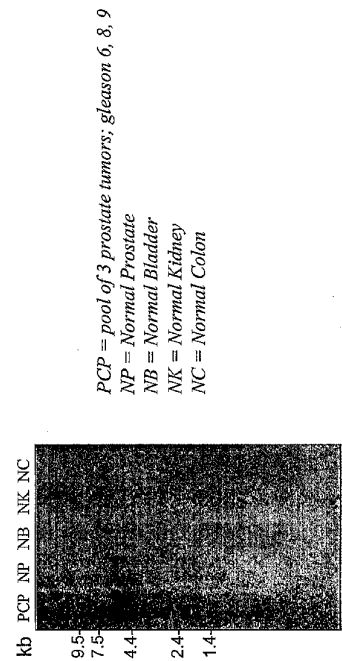
Figure 11 Expression of 205P1B5 in Normal Tissues



WO 03/020954

PCT/US02/27760

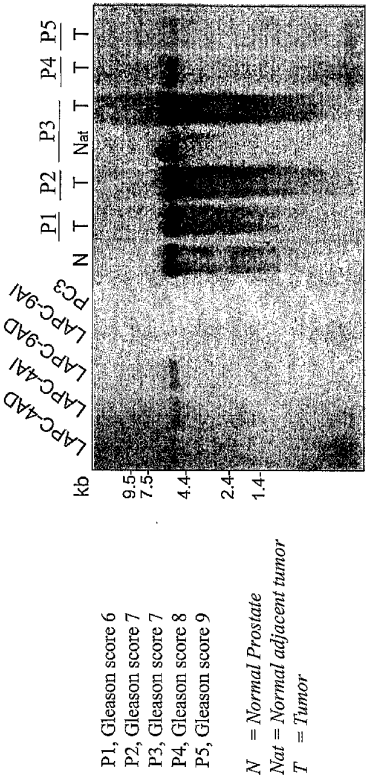
Figure 12 Expression of 205P1B5 in Human Patient Cancer Specimens



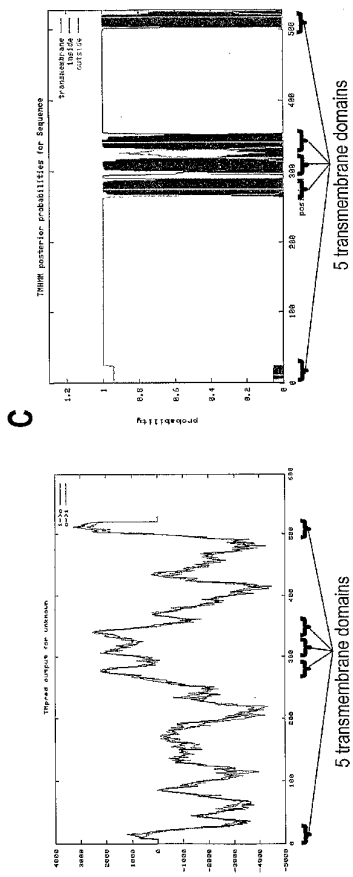
WO 03/020954

PCT/US02/27760

Figure 13 Expression of 205P1B5 in Prostate Cancer Xenografts and Prostate Cancer Patient Specimens



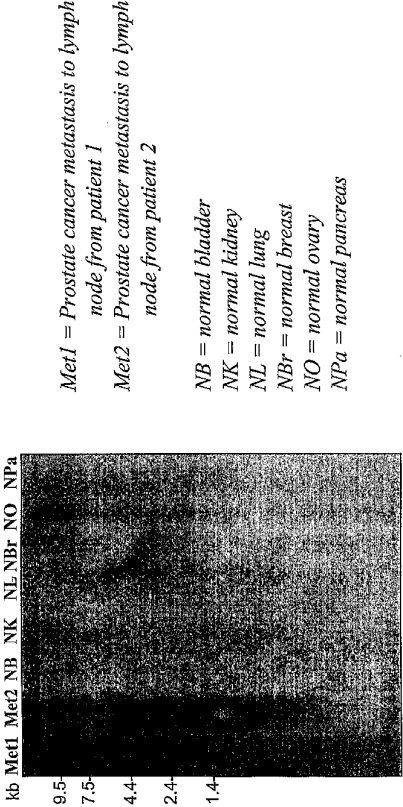
A



WO 03/020954

PCT/US02/27760

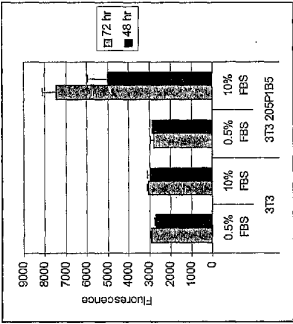
Figure 15:
Expression of 205P1B5 in Prostate Cancer Metastasis Specimens



WO 03/020954

PCT/US02/27760

Figure 16:
Expression of 205P1B5 Enhances Proliferation of 3T3 Cells



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/020954 A3

(51) International Patent Classification: **A61K 39/395**,
C07K 14/52

(74) Agents: MURASHIGE, Kate, H. et al.; Morrison & Foer-
ster LLP, 3811 Valley Centre Drive, Suite 500, San Diego,
CA 92130-2332 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2002/027760

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

(22) International Filing Date: 30 August 2002 (30.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/316,664 31 August 2001 (31.08.2001) US

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

(71) Applicant (*for all designated States except US*): AGEN-
SYS, INC. [US/US]; 1545 17th Street, Santa Monica, CA
90404 (US).

Published:

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): CHALLITA-EID,
Pla, M. [LB/US]; 15745 Morrison Street, Encino, CA
91436 (US); RATTANO, Arthur, B. [US/US]; 10807
Cushdon Avenue, Los Angeles, CA 90064 (US); FARIS,
Mary [US/US]; 2538 Almaden Court, Los Angeles,
CA 90077 (US); HUBERT, Rene, S. [CA/US]; 1644
North Occidental Boulevard, Los Angeles, CA 90026
(US); JAKOBOVITS, Aya [US/US]; 3135 Hutton Drive,
Beverly Hills, CA 90210 (US).

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
28 October 2004

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



WO 2003/020954 A3

(54) Title: 205P1B5 IN TREATMENT AND DETECTION OF CANCER

(57) Abstract: A novel gene (designated 205P1B5) and its encoded protein are described. While 205P1B5 exhibits tissue specific expression in normal adult tissue, it is aberrantly expressed in prostate cancer. Consequently, 205P1B5 provides a diagnostic, prognostic, prophylactic and/or therapeutic target for cancer. The 205P1B5 gene or fragment thereof, or its encoded protein or a fragment thereof, can be used to elicit an immune response.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/27760
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/395; C07K 14/52 US CL : 424/130.1, 133.1, 135.1, 141.1; 530/387.1, 387.3, 388.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/130.1, 133.1, 135.1, 141.1; 530/387.1, 387.3, 388.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,801,232 (ELLIOTT et al) 01 September 1998 columns 3, 25-28.	1-6
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family.		
Date of the actual completion of the international search 24 August 2004 (24.08.2004)		Date of mailing of the international search report 17 SEP 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer MISOOK YU, Ph.D. <i>J. Whitefield</i> Telephone No. 571-272-1600 <i>for</i>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/27760

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the epitope sequences had been taught by Elliott et al., (1996, J. Mol. Neurosci. Vol. 7, pages 217-228).

Please elect the full length protein and one epitope as one species. In other words, the full-length protein, and one epitope are considered as one species.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Dialog (155), West (USPT), sequence databases

Search terms: SEQ ID NOs 3, 5, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, human nicotinic cholinergic receptor alpha 2, antibody.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/27760
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☒	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-6
Remark on Protest		
	☐	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	☐	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/27760

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

his application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-6, drawn to antibody to the protein shown in Fig. 2.

Group II, claim(s) 7, drawn to transgenic animal.

Group III, claim(s) 8, drawn to hybridoma.

Group IV, claim(s) 9, drawn to method of delivering agent.

Group V, claim(s) 10, 22-30, drawn to polynucleotide.

Group VI, claim(s) 11-21, 32, drawn to the protein shown in Fig. 2, and epitopes from the protein.

Group VII, claim(s) 31, drawn to catalytic ribozyme.

Group VIII, claim(s) 33, and 34, drawn to method of inhibiting cancer cells using antibody.

Group IX, claim(s) 35, 40, 41-44 partially, drawn to method of inhibiting cancer cells using protein.

Group X, claim(s) 36, 38, drawn to method of inhibiting cancer cells using antisense.

Group XI, claim(s) 37, drawn to method of inhibiting cancer cells using a catalytic ribozyme.

Group XII, claim(s) 38, and 39, drawn to method of inhibiting cancer cells using vector encoding an antibody.

Group XIII, claim(s) 41-44 partially, drawn to method of inhibiting cancer cells using nucleotide encoding a 205P1B5-related protein.

Group XVI, claim(s) 45-50 partially, drawn to method of detecting nucleic acid encoding 205P1B5-related protein.

Group XV, claim(s) 45-50 partially, drawn to method of detecting 205P1B5-related protein.

The inventions listed as Groups I-XVI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of claim 1, the protein shown at Figure 2 i.e. human alpha-2 nicotinic acetylcholine receptor had been taught by Elliott et al., (1996, J. Mol. Neurosci. Vol. 7, pages 217-228). Since claim 1 does not contribute over the art, unity is lacking between protein, polynucleotides, and first method of using the first mentioned product in the first claim.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

All of the epitopes in the claims i.e., SEQ ID NOs: 2-21, 46-15017 are different species.

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

1-51.

The following claim(s) are generic: 1-51.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/395	C 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	E 4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395	L 4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 39/395	T 4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/82	A 6 1 K 48/00	
C 0 7 K 16/30	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 5/10	C 0 7 K 14/82	
C 1 2 N 9/00	C 0 7 K 16/30	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/574	C 1 2 Q 1/68	A
	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/574	D
	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 レイタノ, アーサー ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 6 4, ロス アンジェルス, クッシュドン アベニ
ュー 1 0 8 0 7

(72)発明者 ファリス, メリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 7 7, ロス アンジェルス, アルマデン コート
2 5 3 8

(72)発明者 ヒュバート, レニー エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 2 6, ロス アンジェルス, ノース オクシデンタ
ル ブルバード 1 6 4 4

(72)発明者 ジャコボビッツ, アヤ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 2 1 0, ビバリー ヒルズ, ハットン ドライブ 3
1 3 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 CA04 CA11 DA02 EA02 EA04 FA02
FA06 GA01 GA11 HA08 HA12 HA17
4B050 CC03 CC07 DD11 EE10 LL01
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR42
QR50 QR55 QR62 QR77 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01
4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA05 DA14
4B065 AA90X AA90Y AB01 AB02 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44 CA45
4C084 AA02 AA13 BA01 BA22 BA23 CA53 ZB21 ZB26
4C085 AA03 AA13 AA14 BB17 CC21 DD62 DD88 EE01
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 CA41 DA76 EA20 EA51
FA74